



HAL
open science

Étude de la régulation de la triglycéridémie chez l'homme par des variants codants de LMF1 et non codants d'APOC3 et LMF1

Marine Dancer

► **To cite this version:**

Marine Dancer. Étude de la régulation de la triglycéridémie chez l'homme par des variants codants de LMF1 et non codants d'APOC3 et LMF1. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1126 . tel-01635476

HAL Id: tel-01635476

<https://theses.hal.science/tel-01635476>

Submitted on 15 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° D'ordre NNT : 2017LYSE1126

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

N° accréditation ED205

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Biochimie – Biologie moléculaire

Soutenue publiquement le 07/07/2017, par :
Marine Serveaux Dancer

**Etude de la régulation de la
triglycéridémie chez l'homme par des
variants codants de *LMF1* et non
codants d'*APOC3* et *LMF1***

Devant le jury composé de :

Pr Laurence Duvillard – PU-PH – Université de Dijon – CHU de Dijon –
Rapporteuse

Pr Isabelle Creveaux – PU-PH – Université de Clermont-Ferrand – CHU Clermont
Ferrand - Rapporteuse

Pr Richard W. James – PU – Université de Genève – CHU de Genève - Rapporteur

Pr René Valéro – PU-PH – Université Aix en Provence – CHU Marseille –
Examineur

Hubert Vidal – DR INSERM – UCBL Président du jury

Dr Sybil Charriere – MCU-PH – UCBL - HCL Co-encadrante

Pr Philippe Moulin - PU-PH - UCBL – HCL Directeur de thèse

Co-encadrant : Dr Christophe Marcais

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Merci aux membres du jury d'accepter de juger ce travail.

Au Pr Hubert Vidal, pour m'avoir accueilli au sein de son unité, et permis de jouir des locaux et des installations à ma convenance.

Au Pr Philippe Moulin, pour avoir été mon directeur de thèse pendant ces trois dernières années, soyez assuré de mon respect.

Au Pr René Valéro, pour me faire l'honneur de juger ce travail.

Au Pr Laurence Duvillard et Pr Richard William James, pour avoir étudié ce manuscrit et m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs.

Au Pr Isabelle Creveaux, pour me faire l'honneur d'être rapporteur et j'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de collaborer dans le futur.

Au Dr Sybil Charrière, pour m'avoir encadrée tout au long de ces trois années, merci pour tout le temps que tu m'as consacré et je sais qu'il est précieux.

Aux Dr Mathilde Di Filippo et Oriane Marmontel pour m'avoir accueillie toujours avec le sourire dans votre service et m'avoir aidée, merci aussi à toute votre équipe qui est géniale, et merci pour tous vos conseils avisés.

Aux membres du laboratoire Carmen, merci à tous pour votre accueil, votre sympathie, votre écoute, votre temps, avec un merci particulier à JJ, Stéphanie, Aurélie et Florian qui ne se sont pas lassés de m'écouter râler.

Aux membres du laboratoire de biochimie, biologie moléculaire du CBS, merci à tous pour votre temps, votre écoute et pour tout ce qu'on a pu partager tout au long de ces trois années, vous êtes tops et il fut très agréable de travailler à vos côtés.

Au Pr Joëlle Goudable, merci de m'avoir fait l'honneur d'être ma tutrice tout au long de mon internat, d'avoir pris le temps de m'écouter et de m'avoir aidé à prévoir ma future carrière, recevez toute ma reconnaissance.

A tous mes amis et ma famille, sans qui ce travail acharné n'aurait sûrement jamais vu le jour. Merci pour votre soutien, vos échanges, votre écoute, vos encouragements.

A ma petite famille que j'aime tant,

Merci Adrien pour m'avoir laissé tranquille sur l'ordi de la maison toutes ces soirées et avoir su me reconforter dans les moments les plus difficiles.

Merci Claudia pour avoir su me faire oublier tous mes tracas tu es MON rayon de soleil, et je suis très fière de toi.

Merci petite soeur – mini nous n°2, pour m'avoir laissé manipuler et travailler jusqu'à la fin.

Résumé français

L'hyperchylomicronémie est une maladie rare et complexe impliquant plusieurs gènes qui sont eux-mêmes fortement régulés par plusieurs mécanismes et dont les voies métaboliques sont étroitement dépendantes de facteurs environnementaux. La survenue de la pathologie due à la présence de variants ou d'une association de variants sur ces gènes n'est pas toujours clairement définie. Ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes mal élucidés dans le développement des hyperchylomicronémies et la régulation du métabolisme des triglycérides. Nous avons essayé d'appréhender certains mécanismes causals dans la survenue de l'hyperchylomicronémie en lien avec la présence de variants sur les gènes régulateurs *APOC3* et *LMF1* du métabolisme des triglycérides.

Le gène *APOC3* présente le variant SstI (rs5128) en région 3' non codante associée significativement à l'hypertriglycéridémie dans notre cohorte, nous avons cherché à caractériser sa régulation post-transcriptionnelle éventuelle par des microARN hépatiques ou intestinaux. Nos résultats ne confirment pas l'hypothèse d'une régulation du variant SstI du gène *APOC3* par un microARN hépatique ou intestinal ciblant directement l'extrémité 3'UTR du gène *APOC3*.

Le gène *LMF1*, nouveau gène candidat pour étudier les mécanismes des hyperchylomicronémies, est encore peu investigué. Nous avons mis en place son diagnostic génétique au sein du laboratoire ainsi qu'une technique in vitro permettant d'évaluer l'impact de la présence de certains variants codants de *LMF1* sur l'activité post héparinique de la lipoprotéine lipase (LPL) par mesure de la lipolyse des triglycérides des VLDL. Nous avons mis en évidence des activités LPL significativement diminuées suggérant une dysfonction de *LMF1* en présence des variants p.Gly172Arg (rs201406396), p.Arg354Trp (rs143076454), p.Arg364Gln (rs35168378), et des deux variants non-sens déjà décrits p.Tyr439Ter (rs121909397) et p.Trp464Ter (rs587777626). Ces travaux permettent de confirmer l'effet fonctionnel des variants *LMF1* sur la régulation de la sécrétion de la LPL. Nous avons également retrouvé dans notre cohorte de 385 patients 18 variants sur la région 3' non codante du gène *LMF1*. Pour les trois variants : c*231C>A (rs75476513), c*512G>A (rs117039680), et c*530G>A (rs139657279), les résultats in vitro suggèrent une régulation post-transcriptionnelle par

les microARN. Ce qui pourrait ainsi expliquer le mécanisme de l'association de ces variants non traduits à l'hypertriglycéridémie.

Ainsi, des interrelations des multiples gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides et leurs régulations à plusieurs niveaux simultanés modulent le phénotype d'hyperchylomicronémie. Il est nécessaire d'étudier tous les mécanismes complexes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie afin de mieux appréhender la physiopathologie et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clefs :

APOC3 – *LMF1* – Variation génétique – SNP – Lipide – Dyslipidémie – Triglycéride – microARN – Chylomicron – Hyperchylomicronémie

Résumé Anglais

Hyperchylomicronemia is a rare and complex disease involving several genes which are themselves highly regulated by several mechanisms and whose metabolic pathways are closely dependent on environmental factors. The occurrence of this disease due to the presence of variants or a combination of variants on these genes is not always clearly defined. This suggests the intervention of other ill-defined mechanisms in the development of hyperchylomicronemia and the regulation of triglyceride metabolism. We have tried to understand certain causal mechanisms in the occurrence of hyperchylomicronemia in relation to the presence of variants on the *APOC3* and *LMF1* known regulatory genes of triglyceride metabolism.

APOC3 gene carries the SstI variant (rs5128) in the 3' untranslated region significantly associated with hypertriglyceridemia in our cohort. We sought to characterize its possible post-transcriptional regulation by hepatic or intestinal microRNA. Our results obtained in vitro do not support the hypothesis of a regulation of the SstI variant of the *APOC3* gene by a hepatic or intestinal microRNA directly targeting the 3'UTR of *APOC3* gene.

LMF1 gene, a new candidate gene for studying the mechanisms of hyperchylomicronaemias, is still under investigation. We have established its genetic diagnosis in the laboratory and set up an in vitro method to evaluate the impact of *LMF1* coding variants by measuring the release of post-heparin lipoprotein lipase (LPL) activity. We found decreased LPL activities suggesting a *LMF1* dysfunction in the presence of variants p.Gly172Arg (rs201406396), p.Arg354Trp (rs143076454), p.Arg364Gln (rs35168378), and the two nonsense variants already described p.Tyr439Ter (rs121909397) and p.Trp464Ter (rs587777626). This study confirms the functional effect of *LMF1* variants on the regulation of LPL secretion. In addition, we found 18 variants on the 3' untranslated region of *LMF1* gene. For three variants : c*231C>A (rs75476513), c*512G>A (rs117039680), and c*530G>A (rs139657279), in vitro results suggest a post-transcriptional regulation by microRNA. These findings are an involvement of these untranslated variants in the occurrence of hypertriglyceridemia.

Thus, complex interrelations of multiple genes involved in triglyceride metabolism and their simultaneous multi-level regulation modulate the phenotype of hyperchylomicronemic patients. It is necessary to study all the complex mechanisms involved in the regulation of triglyceridemia in order to better understand pathophysiology of hyperchylomicronemia and to develop new therapeutic targets.

Keywords:

APOC3 - *LMF1* - Genetic variation - SNP - microRNA - Triglyceride - Chylomicron - Hyperchylomicronemia - TG Lipolysis

SOMMAIRE

SOMMAIRE	9
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX.....	17
INTRODUCTION.....	18
PARTIE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	20
1. Métabolisme des lipoprotéines.....	21
1.1. Généralités	21
1.2. Métabolisme des lipoprotéines.....	23
1.3. Métabolisme des lipoprotéines riches en TG (LRTG)	24
1.3.1. Synthèse des lipoprotéines riches en TG	25
1.3.2. Métabolisme des CM.....	27
1.3.3. Métabolisme des VLDL.....	30
2. Physiopathologie des hypertriglycéridémies (HTG).....	32
2.1. Diagnostic et classification des dyslipidémies.....	32
2.2. Physiopathologie des hyperchylomicronémies.....	36
2.2.1. Formes monogéniques – mutations délétères	42
2.2.2. Formes polygéniques	43
2.2.3. Gène <i>LPL</i>	45
2.2.3.1. Mutations délétères du gène <i>LPL</i>	45
2.2.3.2. Polymorphismes de la <i>LPL</i>	48
2.2.4. Gène <i>APOC2</i>	48
2.2.4.1. Mutations délétères du gène <i>APOC2</i> :.....	48
2.2.4.2. Polymorphismes de l' <i>APOC2</i>	50
2.2.5. Gène <i>APOA5</i>	50
2.2.5.1. Mutations délétères du gène <i>APOA5</i> :.....	50
2.2.5.2. Polymorphismes de l' <i>APOA5</i>	54
2.2.6. Gène <i>GPIHBP1</i>	54
2.2.6.1. Mutations délétères du gène <i>GPIHBP1</i>	54
2.2.7. Gène <i>LMF1</i>	56
2.2.8. Polymorphismes de l' <i>APOE</i>	56
2.2.9. Polymorphismes de l' <i>APOC3</i>	58

2.2.10.	Polymorphismes de l' <i>APOB</i>	58
2.2.11.	Causes secondaires.....	60
3.	Rôle de l'apolipoprotéine C-III dans le métabolisme des TG et physiopathologie des HTG	62
3.1.	Rôle Physiologique et régulation d'ApoC-III.....	62
3.1.1.	Régulation de la lipolyse.....	63
3.1.2.	Rôle intra-hépatique.....	65
3.2.	Mutations délétères d' <i>APOC3</i> induisant une hypotriglycémie.....	69
3.2.1.	Mutations codantes.....	69
3.2.2.	Mutations introniques, de sites d'épissages de l' <i>APOC3</i>	70
3.3.	Variants associés à une hypertriglycémie	70
3.3.1.	Variants situés dans le promoteur	70
3.3.2.	Variants situés dans la région codante.....	71
3.3.3.	Variants associés à une hypertriglycémie situés dans la région 3'UTR	71
3.3.3.1.	Le variant SstI	71
3.3.3.2.	Le variant BbvI	72
4.	Rôle du Lipase Maturation Factor 1 (Lmf1) dans le métabolisme des TG	75
4.1.	Découverte du gène <i>LMF1</i> et rôles physiologiques	75
4.2.	Structure de la protéine Lmf1	78
4.3.	Variants de <i>LMF1</i> associés à une hypertriglycémie	80
4.3.1.	La mutation Y439X (<i>LMF1</i> , Exon 9 c.1317C>G, p.Tyr439Ter, rs121909397).....	80
4.3.2.	La mutation W464X (<i>LMF1</i> , Exon 9 c.1391G>A, p.Trp464Ter, rs587777626).....	81
4.3.3.	La mutation Y460X (<i>LMF1</i> , Exon 9 c.1380C>G, p.Tyr460Ter).....	82
4.4.	Autres variants retrouvés sur le gène <i>LMF1</i>	83
5.	Régulation épigénétique par les microARN (miR).....	86
5.1.	Les microARN.....	87
5.2.	Nomenclature des microARN	88
5.3.	Synthèse des microARN.....	88
5.4.	Régulation de l'expression des microARN.....	91
5.5.	Mécanisme d'action de régulation des ARNm par les microARN	91
5.6.	Implication de certains microARN dans le métabolisme des lipides	92
5.7.	Implication de variants 3'UTR dans la régulation des ARNm par les microARN	95
6.	Enjeux du travail	97
Partie 2: Présentation des travaux		99

Article 1: Lack of evidence for a liver or intestinal miRNA regulation involved in the hypertriglyceridemic effect of <i>APOC3</i> 3'UTR variant SstI (199)	100
Discussion Article 1.....	109
Etude des variants situés sur la 3'UTR du gène <i>LMF1</i> , et leur potentielle régulation par des microARN.....	114
Matériels et méthodes	116
Population étudiée	116
Analyse de la 3'UTR de <i>LMF1</i>	116
Études in silico	116
Constructions luciférasas contenant la région 3'UTR du gène <i>LMF1</i>	117
Dosage de l'activité luciférase après transfection cellulaire	118
Résultats	119
Analyse de la 3'UTR de <i>LMF1</i>	119
Etudes bio-informatique de l'impact des variants sur le gain d'un site de fixation d'un microARN.....	120
Vérification in vitro de l'impact fonctionnel des variants sur la liaison des microARN	124
Discussion	125
Article2: New rare genetic variants of <i>LMF1</i> gene associated with hyperchylomicronemia.....	128
Discussion Article 2.....	159
Case Report : Identification d'une délétion homozygote de l'exon 6 du gène <i>LMF1</i> chez un patient hyperchylomicronémique	163
Introduction.....	163
Cas clinique.....	163
Méthodes	164
Mesure activité des lipases	164
Analyse des gènes candidats	164
Analyse fonctionnelle de <i>Lmf1</i>	165
Résultats	165
Discussion	170
Partie 3 : Discussion synthétique	172
Etudes sur la régulation par les microARN des variants des régions 3'UTR des gènes <i>LMF1</i> et <i>APOC3</i>	173
Perspectives des études de régulation par les microARN.....	177
Etude fonctionnelle des variants codants du gène <i>LMF1</i>	178
Conclusions - Perspectives	180

Références bibliographiques	182
Annexes	198
Annexe 1 : Correspondances code génétique – acides aminés	198
Annexe 2 : Nomenclature des variants	199
Annexe 3 : Séquences mutées des 3'UTR de <i>LMF1</i> étudiées.....	200
Annexe 4 : Etudes in silico de microARN candidats en présence de variants 3'UTR de <i>LMF1</i>	206
Annexe 5 : Mail de soumission de l'Article 2 présenté dans ce manuscrit	214

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide Aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AG	Acide Gras
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANGPTL	Angiopoïétine Like Protéine
APO	Apolipoprotéine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNInc	ARN non codants longs
ARNm	ARN messenger
ASO	Oligonucléotides Antisens
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
CT	Cholestérol Total
CM	Chylomicron
DAG	Diacyglycérol
DGAT	Diacyglycérol Transferase
dHPLC	denaturing High Performance Liquide Chromatography
DT2	Diabète de type 2
EAL	Exploration des Anomalies Lipidiques
FCS	Familial Chylomicronemia Syndrome
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1
GWAS	Genome Wide Association Study
HDL	High Density Lipoprotein
HDL-c	HDL cholestérol
HGMD	Human Gene Mutation Database
HGVS	Human Genome Variation Society
HLP	Hyperlipoprotéinémie
HSPG	Héparane Sulfate ProtéoGlycane
HTG	Hypertriglycéridémie
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KO	Knock Out
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-c	LDL cholestérol
LDL-R	Récepteur de LDL
LE	Lipase Endothéliale
LH	Lipase Hépatique
LPL	Lipoprotéine Lipase
LPLD	LPL Deficiency
LMF1	Lipoprotein Maturation Factor 1
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein

LRTG	Lipoprotéines Riches en Triglycérides
MCFS	Multifactorial Chylomicronemia Syndrome
MCM	Hyperchylomicronémie Multifactorielle
MG	Mono-acyl-Glycérol
miR, miRNA	MicroARN
MTP	Microsomal Transfert Protein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTG	Normotriglycériémie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Phospholipide
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
RE	Réticulum Endoplasmique
TG	Triglycéride
UTR	Untranslated Region
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wild Type

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un triglycéride, d'un glycérol et d'AG, adaptée d'après (10)	21
Figure 2 : Représentation de la structure d'une lipoprotéine, adaptée d'après (12)	22
Figure 3 : Représentation des voies endogène et exogène du métabolisme des lipoprotéines, adaptée d'après (13)	24
Figure 4 : Représentation de l'action de la MTP, adaptée d'après (16).....	25
Figure 5 : Représentation de l'édition de l'ARNm d'ApoB, l'édition ayant lieu exclusivement dans l'intestin, adaptée d'après (21)	27
Figure 6 : Représentation de l'action de la LPL, adaptée d'après (23).....	28
Figure 7 : Régulation de la LPL, adaptée d'après (8)	29
Figure 8 : Représentation schématique de l'action de la CETP, adaptée d'après (32)	30
Figure 9 : Représentation synthétique du métabolisme des LRTG, adaptée d'après (4)	31
Figure 10 : Représentation des interactions gène-environnement en présence d'hyperchylomicronémie, adaptée d'après (48).....	37
Figure 11 : Algorithme pour le diagnostic du syndrome d'hyperchylomicronémie familiale et d'hyperchylomicronémie multifactorielle schéma, adapté d'après (49) et (51)	39
Figure 12 : Principe du traitement par oligonucléotides antisens, adapté d'après (53).....	41
Figure 13 : Représentation du gène <i>LPL</i> avec ses variants associés à une déficience en LPL, adaptée d'après (45,50,63)	47
Figure 14 : Schéma représentant la concentration en TG mettant en relation la cause probable, adapté d'après (11)	59
Figure 15 : Représentation des causes d'HTG selon la concentration en TG plasmatique à jeun, adaptée d'après (2)	60
Figure 16 : Représentation du cluster contenant le gène <i>APOC3</i> - position 11q23, adaptée d'après (102)	62
Figure 17 : Représentation du métabolisme des LRTG et du rôle de l'ApoC-III, adaptée d'après (118)	65
Figure 18 : Impact de la concentration plasmatique de l'ApoC-III sur le métabolisme des TG, le diabète et les maladies cardiovasculaires, adapté d'après (104)	68
Figure 19 : Représentation de la protéine Lmf1 chez la souris et de la protéine cld, adaptée d'après (148)	76
Figure 20 : Représentation de l'activité des lipases après co-transfection de l'ADNc de <i>LMF1</i> et de <i>LPL</i> dans des cellules déficientes en <i>LMF1</i> , cellules de souris cld/cld, adaptée d'après (150)	76
Figure 21 : Représentation du taux d'ARNm de Lmf1 dans différents tissus, adaptée d'après (148) ..	78
Figure 22 : Représentation de Lmf1 et de son interaction avec les lipases, adaptée d'après (8,145,151)	79
Figure 23 : Représentation de la troncation Y439X sur la protéine Lmf1 retrouvée chez un patient, adaptée d'après (148)	81
Figure 24 : Représentation des deux mutations délétères décrites sur <i>LMF1</i> , adaptée d'après (157) ..	82
Figure 25 : Représentation de l'analyse fonctionnelle de différents variants retrouvés sur le gène <i>LMF1</i> , adaptée d'après (3)	83

Figure 26 : Représentation de la formation des miR adaptée d'après (165).....	90
Figure 27 : Représentation d'un polymorphisme situé en 3'UTR de l'ARNm du gène <i>PLIN4</i> modulant l'action d'un microARN adaptée d'après (139).....	95
Figure 28 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail	115
Figure 29 : Représentation de l'activité luciférase (% normalisé sur le pEZX-wt) des différentes transfections par des vecteurs contenant la 3'UTR de <i>LMF1</i> mutée et représentation de l'activité luciférase de notre contrôle interne (vecteur <i>APOA5</i>) (% normalisé sur le pEZX-T).....	124
Figure 30 : Représentations de différents résultats de séquençages du gène <i>LMF1</i> chez notre patient p.Arg364Gln rs35168378, p.Leu 454Leu, rs116726395, p.Arg510Arg rs200676184 c.*231C>A rs75476513, tous homozygotes	167
Figure 31 : Représentation schématique de la délétion homozygote du patient sur le gène <i>LMF1</i> NM_022773.2.....	168
Figure 32 : Représentations des migrations des PCR long range chez notre patient mettant en évidence la délétion homozygote sur <i>LMF1</i>	169
Figure 33 : Représentation du séquençage de la délétion homozygote sur le gène <i>LMF1</i> chez notre patient	170
Figure 34 : Représentation de la structure secondaire de la 3'UTR d' <i>APOC3</i> via Freiburg RNA Tools-LocARNA – Alignement and Folding.....	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes classes de lipoprotéines et de leurs compositions, adapté d'après (13,14)	23
Tableau 2 : Classification de Fredrickson des dyslipidémies primitives, adaptée d'après (38,39)	34
Tableau 3 : Bases génétiques responsables de l'hyperlipoprotéïnémie de type I, adapté d'après (2,4,56,63)	43
Tableau 4 : Loci associés au taux plasmatique de TG associés à ou indépendamment d'autres traits lipidiques, adapté d'après (2,64).....	44
Tableau 5 : Mutations décrites sur le gène <i>APOC2</i> comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI.....	49
Tableau 6 : Variants décrits sur le gène <i>APOA5</i> comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI	53
Tableau 7 : Variants décrits sur le gène <i>GPIHBP1</i> comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI.....	56
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des mutations codantes sur le gène <i>APOC3</i> induisant une perte de fonction d'ApoC-III	69
Tableau 9 : Mutations introniques délétères retrouvés sur le gène <i>APOC3</i>	70
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variants retrouvés sur <i>LMF1</i> associés à une HTG lorsque le contraire n'est pas indiqué dans la colonne Données	85
Tableau 11 : MicroARN impliqués dans le métabolisme des lipides.....	94
Tableau 12 : Classification des variants rapportés dans la base SNP de Pubmed sur la région 3'UTR d' <i>APOC3</i> , 5007 personnes ont été analysées sur cette 3'UTR sous 1000 Genomes toutes origines ethniques confondues sauf pour le rs201402310 (662 patients)	111
Tableau 13 : Synthèse des données d'analyse de la 3'UTR de <i>LMF1</i> dans notre cohorte de patients.....	119
Tableau 14 : Scores de prédiction pour le variants c*231C>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA.....	121
Tableau 15 : Scores de prédiction pour le variants c*512G>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA.....	122
Tableau 16 : Scores de prédiction pour le variants c*530G>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA.....	123

INTRODUCTION

L'hyperchylomicronémie est caractérisée par une hypertriglycéridémie (HTG) sévère (≥ 15 mmol/L) associée à une persistance anormale des chylomicrons (CM) dans le plasma à jeun (1). Elle peut se compliquer principalement de pancréatite aigüe et d'une augmentation du risque de complications cardiovasculaire ischémique (2). Elle peut être monogénique, avec une prévalence d'environ 1/1'000'000, et une transmission récessive dans la situation du FCS (Familial Chylomicronemia Syndrome). Ou elle peut être oligo/polygénique lors d'une coexistence de différents variants sur les gènes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie associés ou non à plusieurs facteurs comme le syndrome métabolique, le diabète de type 2 (DT2), les médicaments, l'alcool, les écarts diététiques... La plupart des cas sont polygéniques avec une influence des facteurs environnementaux conduisant à des hyperlipidémies de type V sporadiques (2).

L'exploration des HTG sévères se focalise actuellement sur l'analyse génétique des 6 gènes candidats déterminants dans la régulation de la lipolyse intravasculaire des lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) : *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3*, *LMF1* et *GPIHBP1*. Le gène *APOE* qui régule la clairance hépatique des LRTG est également considéré. Lors d'une hyperchylomicronémie d'allure primitive, moins de 50% des cas sont expliqués par cette analyse (3). Et environ 30% des cas n'ont ni variants rares ni SNP (Single Nucleotide Polymorphism) communs affectant les gènes candidats classiques (4). Ce qui suggère que des mécanismes restent encore non-identifiés dans le développement d'hyperchylomicronémie.

La grande fréquence de formes non expliquées par des mutations délétères des gènes classiquement impliquées dans le métabolisme des triglycérides (TG) et l'association fréquente des HTG modérées ou sévères à des polymorphismes dont certains situés en région non codante 3'UTR sans fonctionnalité établie, a conduit l'équipe à s'intéresser à d'autres pistes de régulation de ces gènes. L'hypothèse d'une implication potentielle des microARN dans la physiopathologie des hypertriglycéridémies sévères a ainsi été émise. La découverte des microARN en 1993 (5) participant à la régulation post-transcriptionnelle en interagissant avec les régions 3' non codante des ARNm permettrait d'expliquer certains cas d'HTG (6,7). Les microARN sont impliqués dans de nombreuses

voies de régulation et en particulier dans celle du métabolisme des lipoprotéines. Des polymorphismes ou SNP localisés sur la région d'appariement de l'ARNm-cible, peuvent modifier la liaison des microARN induisant une création ou suppression de site diminuant ou augmentant ainsi l'expression des gènes.

Nous nous sommes intéressés à cette régulation sur le gène *APOC3*, inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme clef de la lipolyse intravasculaire, et inhibiteur de la recapture hépatique des LRTG. En effet nous avons émis l'hypothèse que des polymorphismes de la région 3'UTR du gène *APOC3* pourraient causer la perte d'un site de liaison de microARN, avec pour conséquence une augmentation de l'expression du gène *APOC3*, majorant une inhibition de la LPL et donc conduisant à l'aggravation d'une hypertriglycémie.

Nous nous sommes également intéressés au gène *LMF1*. Il code pour une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique jouant un rôle essentiel dans la maturation post-transcriptionnelle des lipases lors de l'assemblage des monomères inactifs et/ou dans la stabilisation de leur structure homodimérique permettant l'activation catalytique des lipases vasculaires : la LPL, la lipase hépatique (LH) et la lipase endothéliale (LE) (8). Nous avons, après séquençage de notre cohorte de patients ayant des antécédents documentés d'hyperchylomicronémie, analysé l'ensemble des variants retrouvés sur ce gène et essayé de déterminer leur impact fonctionnel. En parallèle, nous nous sommes intéressés aux polymorphismes de sa région 3' non codante qui pourraient induire un gain de fixation d'un microARN, diminuant son expression et donc l'activité catalytique sur la LPL.

Dans une première partie nous présenterons une revue de la littérature consacrée au métabolisme des LRTG et aux variants impliqués dans l'HTG. Le rôle des gènes *APOC3* et *LMF1* et leurs implications dans les HTG seront plus particulièrement développés pour mieux appréhender le contexte de notre travail.

Dans une deuxième partie nous détaillerons nos travaux sur la mise en place du séquençage systématique du gène *LMF1* pour le démantèlement des hyperchylomicronémies, et sur l'implication des microARN sur les variants de la 3'UTR du gène *APOC3* et du gène *LMF1*.

Puis dans une troisième partie nous discuterons des résultats obtenus.

PARTIE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Métabolisme des lipoprotéines

1.1. Généralités

Les lipides du grec *lipos* « gras » sont des molécules hydrophobes. On distingue les lipides simples constitués d'une seule espèce moléculaire (acide gras (AG), cholestérol) des lipides complexes constitués d'un assemblage d'AG avec d'autres molécules, comme les triglycérides (TG). Les TG sont formés de trois AG et d'un glycérol unis par une liaison ester (C-O) (Figure 1) (9).

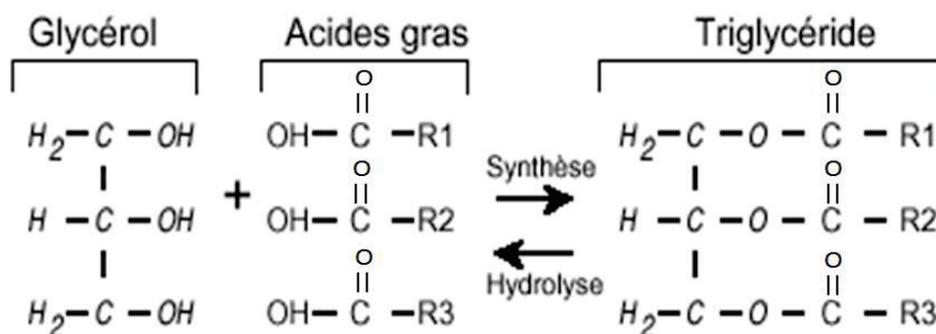


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un triglycéride, d'un glycérol et d'AG, adaptée d'après (10)

R1, R2 et R3 sont des chaînes carbonées de longueur et de saturation variables

Les TG n'étant pas solubles dans le plasma, ils doivent se complexer à différentes protéines plasmatiques : les apolipoprotéines par des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, hydrophobes, Van der Waals) à des phospholipides, et à du cholestérol libre et estérifié afin d'être transportés au niveau plasmatique (milieu aqueux) et distribués dans l'organisme. Ainsi ils vont former des complexes solubles : les lipoprotéines (11). Les lipoprotéines sont des complexes moléculaires sphériques organisés afin de rendre les lipides solubles. En surface se trouvent les protéines hydrophiles, les phospholipides amphipatiques et le cholestérol non estérifié constituant la monocouche hydrophile; à l'intérieur de la sphère on trouve du cholestérol estérifié et les TG qui constituent le noyau

hydrophobe, la proportion des différents constituants est variable selon la classe de la lipoprotéine (Figure 2) (11).

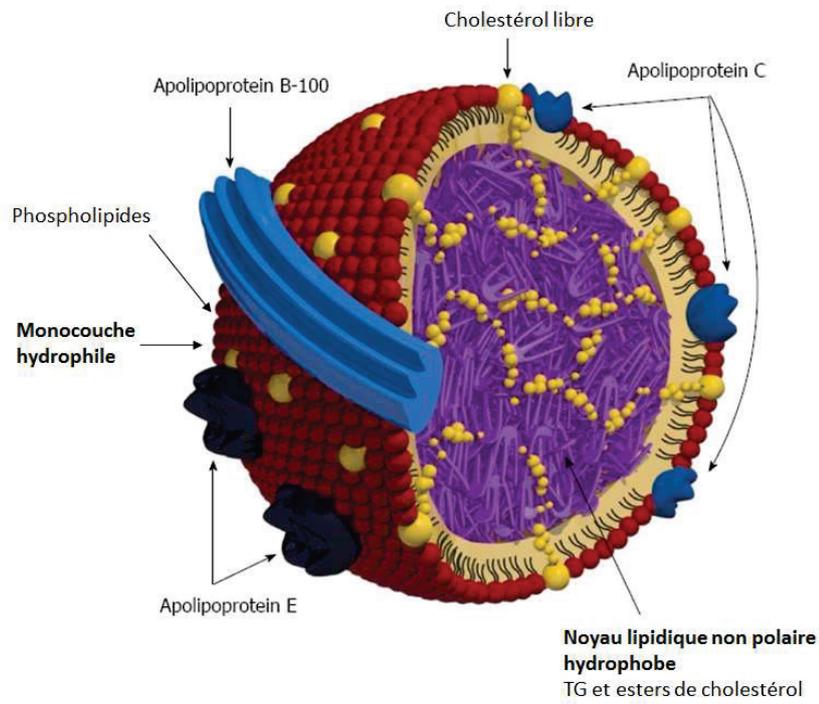


Figure 2 : Représentation de la structure d'une lipoprotéine, adaptée d'après (12)

Les lipoprotéines sont divisées en 5 classes (Tableau 1):

- Chylomicrons (CM)
- Very Low Density Lipoprotein (VLDL)
- Intermediate Density Lipoprotein (IDL)
- Low Density Lipoprotein (LDL)
- High Density Lipoprotein (HDL)

La classification est faite en fonction de la densité des particules liées à leur composition en apolipoprotéines (Apo), cholestérol, TG et phospholipide (PI) (Tableau 1).

	LIPOPROTEINE	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
	Densité g/mL	<0,094	0,940-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
	Taille nm	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
	Apolipoprotéine majeure	ApoB-48	ApoB-100	ApoB-100	ApoB-100	ApoA-I
	Autres constituants	Esters de rétinol, Apo A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III	Vitamine E, Apo E, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III	Vitamine E, Apo E, C-I, C-II, C-III	Vitamine E	Apo A-II, A-IV, E, C-III, LCAT, CETP
% MASSE TOTALE DE LA LIPOPROTEINE	Protéines	2	8	19	22	55
	Cholestérol	5	19	38	50	17
	Phospholipides	7	18	19	22	25
	Triglycérides	86	55	23	42	3

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes classes de lipoprotéines et de leurs compositions, adapté d'après (13,14)

LCAT : lécithine-cholestérol acyltransférase ; CETP : Cholesterylester transfer protein

1.2. Métabolisme des lipoprotéines

Il existe 3 voies dans le métabolisme des lipoprotéines :

- La voie exogène, elle correspond au métabolisme des chylomicrons. Le catabolisme des chylomicrons aboutit à la formation de résidus ou remnants appauvris en TG qui seront captés par le foie.
- La voie endogène : métabolisme des Very Low Density Lipoprotein (VLDL). La lipolyse intravasculaire des VLDL conduit à la production des Low Density Lipoprotein (LDL) qui seront captées par le foie ou par les tissus périphériques.
- Le transport inverse du cholestérol : métabolisme des High Density Lipoprotein (HDL) qui permet le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Cette voie ne sera pas développée dans ce travail n'étant concernée qu'indirectement par les altérations de la lipolyse.

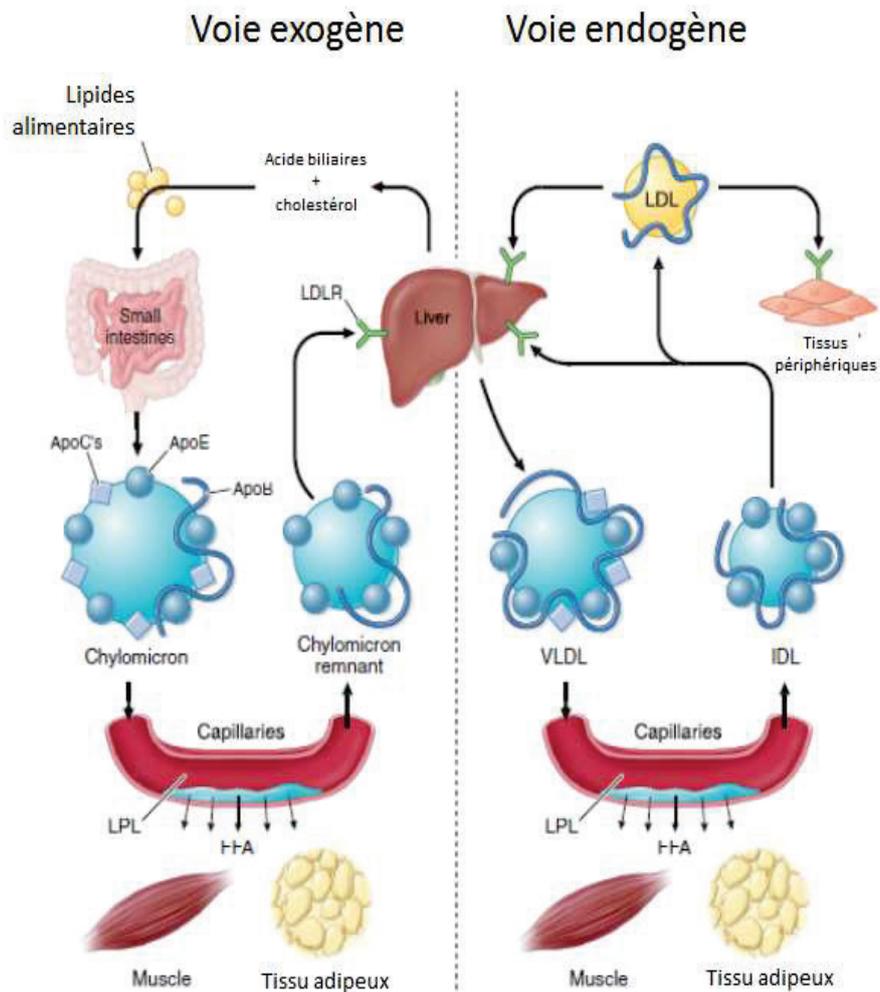


Figure 3 : Représentation des voies endogène et exogène du métabolisme des lipoprotéines, adaptée d'après (13)

Pour résumer, les lipoprotéines assurent le transport du cholestérol, des AG et des vitamines liposolubles du foie ou de l'intestin vers les tissus périphériques (VLDL, LDL, CM) et le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (HDL) (13).

1.3. Métabolisme des lipoprotéines riches en TG (LRTG)

On distingue dans les lipoprotéines riches en TG (LRTG) : les chylomicrons et les VLDL, elles sont synthétisées respectivement dans l'intestin (CM) et dans le foie (VLDL). Les LRTG jouent un rôle essentiel dans le transport des AG aux tissus comme source

d'énergie pour le cœur et le muscle squelettique et permettent leur stockage au niveau du tissu adipeux.

1.3.1. Synthèse des lipoprotéines riches en TG

Les LRTG : CM et VLDL sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique respectivement dans l'entérocyte et l'hépatocyte, par l'assemblage d'une vésicule contenant une molécule d'ApoB et une vésicule lipidique. La microsomal triglyceride transfer protein (MTP) codée par le gène *MTPP* a un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des LRTG. La MTP est une protéine chaperonne intracellulaire qui stabilise le polypeptide ApoB et favorise le transfert des lipides de la membrane du RE sur l'ApoB afin de lui permettre d'acquérir une conformation appropriée. A ce stade une lipoprotéine intermédiaire est créée. Une dernière étape de maturation est nécessaire où la lipoprotéine intermédiaire va fusionner avec une vésicule lipidique produite par la MTP et formera donc une lipoprotéine mature. La MTP est exprimée dans les hépatocytes et entérocytes, elle promeut ainsi l'assemblage des LRTG des voies endogène (VLDL) et exogène (CM) (Figure 4) (15).

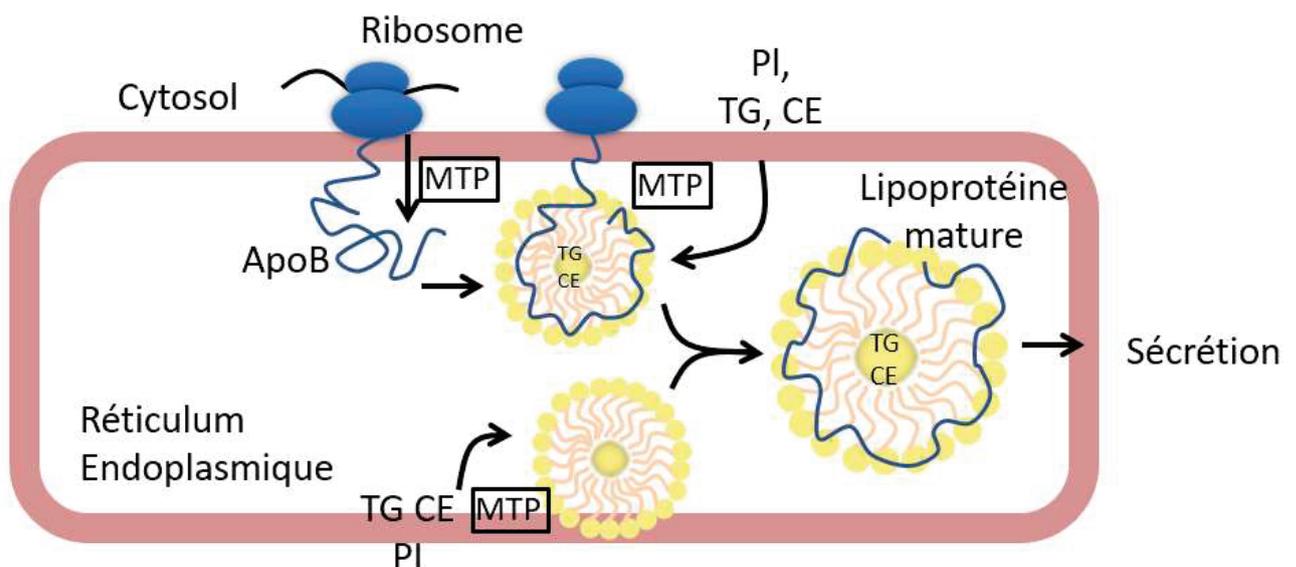


Figure 4 : Représentation de l'action de la MTP, adaptée d'après (16)

Des études d'inhibition du gène *MTPP* ont montré que la fonction de la MTP dans l'assemblage des CM est essentielle pour l'absorption des TG. En absence de suffisamment de lipides ou de MTP, le polypeptide ApoB naissant est dégradé intracellulairement (17). En présence de mutations sur *MTPP*, plus de trente décrites, cas dans l'abetalipoprotéïnémie, maladie autosomique rare, on observe un défaut de lipidation de l'ApoB ce qui induit une diminution de sécrétion de CM et VLDL (18,19). Des inhibiteurs de la MTP comme le lomitapide sont en développement dans le traitement d'hypercholestérolémie familiale homozygote (20).

Le gène *APOB* code pour deux protéines différentes chez l'homme :

- L'apolipoprotéine B100 (ApoB-100) est une protéine de 4 536 acides aminés qui est synthétisée exclusivement dans le foie.
- L'apolipoprotéine B48 (ApoB-48) est une protéine de 2 152 acides aminés, synthétisée dans l'intestin.

Le mécanisme d'édition de l'ARN messager (ARNm) permet la synthèse de ces deux protéines à partir du même gène *APOB*. Le terme édition de l'ARN désigne différents mécanismes entraînant des changements de la séquence d'un ARN par rapport à la séquence génomique. L'édition du transcrit ApoB se fait via une réaction de désamination spécifique affectant une seule cytidine (C6666) dans un triplet CAA. Cette étape de désamination produit une uridine et introduit donc un codon stop UAA au milieu du cadre de lecture. Dans le foie, le transcrit dirige vers la synthèse de l'ApoB-100 sans édition. Dans l'intestin, le transcrit est édité et produit l'ApoB-48 ; la protéine se retrouve ainsi tronquée par la présence d'un codon stop en milieu de séquence, elle correspond à 48% de la protéine totale (ApoB-100) d'où son nom (Figure 5) (21).

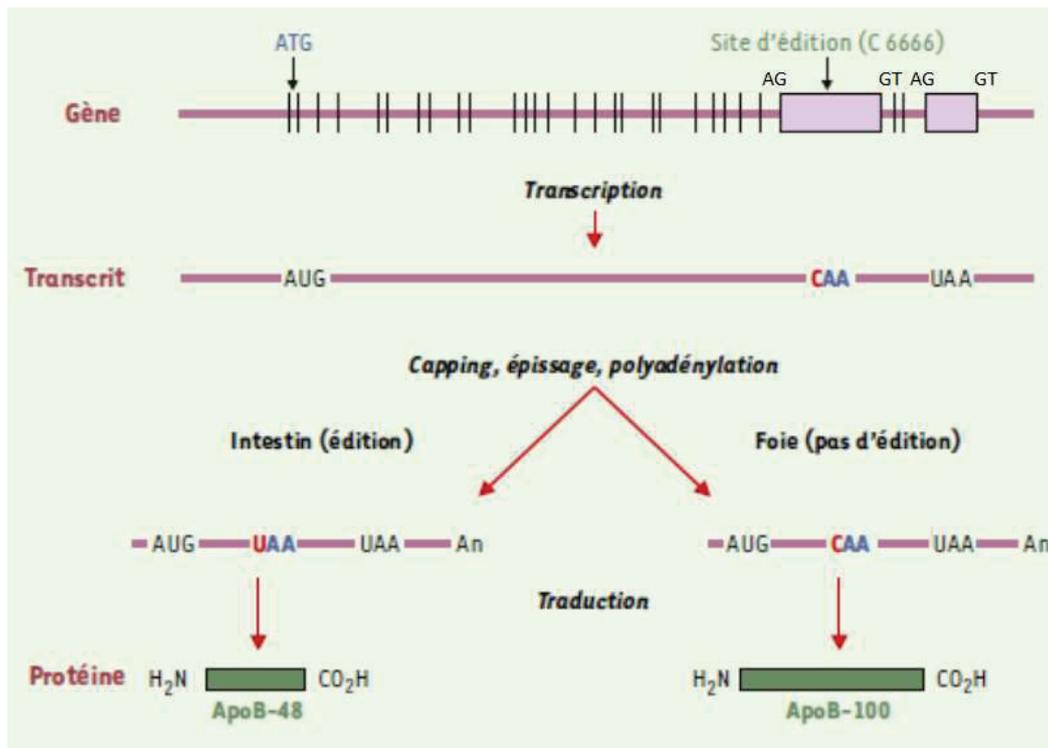


Figure 5 : Représentation de l'édition de l'ARNm d'ApoB, l'édition ayant lieu exclusivement dans l'intestin, adaptée d'après (21)

1.3.2. Métabolisme des CM

Après absorption, les TG d'origine alimentaire sont hydrolysés dans l'intestin par la lipase pancréatique en 2-mono-acyl-glycérol (2-MG) et AG. Ces molécules peuvent être absorbées par les entérocytes (cellules épithéliales intestinales). Dans l'entérocyte, le 2-MG et les AG sont réestérifiés en TG par la diacylglycerol acyltransferase (DGAT). Comme vu précédemment, les CM sont synthétisés au niveau des entérocytes par l'assemblage de TG et d'une ApoB-48. Au niveau du réticulum endoplasmique des molécules d'ApoA-IV sont ensuite ajoutées à ces vésicules et les stabiliseraient permettant une meilleure lipidation. Puis les CM transitent au niveau de l'appareil de Golgi où ils acquièrent des molécules d'ApoA-I pour ensuite être largués dans la lymphe puis dans la circulation sanguine (22). Lieu où les TG des CM seront hydrolysés en AG et glycérol par la lipoprotéine lipase (LPL), ce qui permet la libération d'AG (Figure 6). Les AG se fixeront à l'albumine et seront absorbés par les cellules hépatiques ainsi que par les tissus périphériques. Après hydrolyse les CM sont appelés CM remnants.

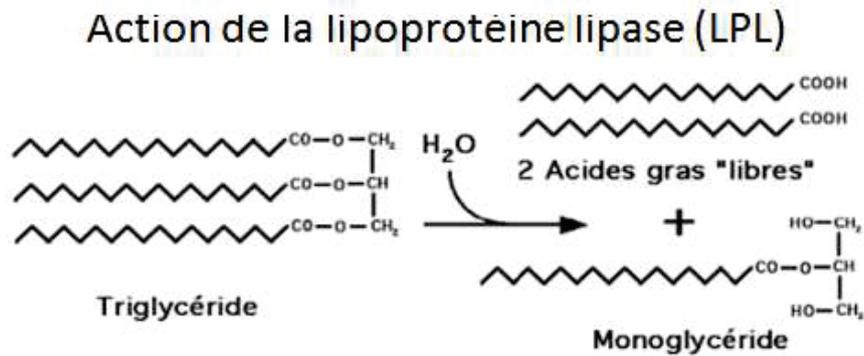


Figure 6 : Représentation de l'action de la LPL, adaptée d'après (23)

La **Lipoprotéine lipase** (LPL), enzyme clef de la lipolyse, codée par le gène *LPL* situé sur le bras court du chromosome 8 (10 exons), est composée de 475 acides aminés dont les 27 premiers correspondent au peptide signal. Elle est principalement synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique des cellules parenchymateuses du tissu adipeux, du cœur et du muscle squelettique (24). Après une maturation post-transcriptionnelle, facilitée par une protéine chaperonne du RE : la lipase maturation factor 1 (Lmf1) (25), la LPL est transportée des espaces sous endothéliaux jusqu'à la surface des capillaires grâce à la protéine glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein1 (Gpihbp1). La LPL est active sous forme d'homodimères et après l'action de son cofacteur : l'ApoC-II. La dissociation des dimères inactive l'enzyme. La LPL est constituée de deux domaines principaux : un large domaine N terminal contenant l'activité catalytique (triade catalytique) et un domaine C terminal à l'origine des propriétés de liaisons spécifiques au substrat et à l'héparine (26). L'héparine ne joue pas de rôle direct dans l'activité catalytique de la LPL mais elle inhiberait la liaison entre la LPL et l'ApoB. La LPL accrochée à la paroi vasculaire peut être détachée par l'héparine. Afin de mesurer l'activité de la LPL une injection d'héparine est réalisée en amont de la prise de sang chez les patients (27).

L'activité de la LPL est fortement régulée transcriptionnellement, post-transcriptionnellement et par le biais de protéines activatrices ou inhibitrices. Elle est activée par l'ApoA-V, l'ApoC-II et est inhibée par de fortes concentrations en AG, par l'ApoC-III, par les angiopoïétines : angiopoietin-like protein 3 et 4 (ANGPTL3, ANGPTL4) (Figure 7) (28).

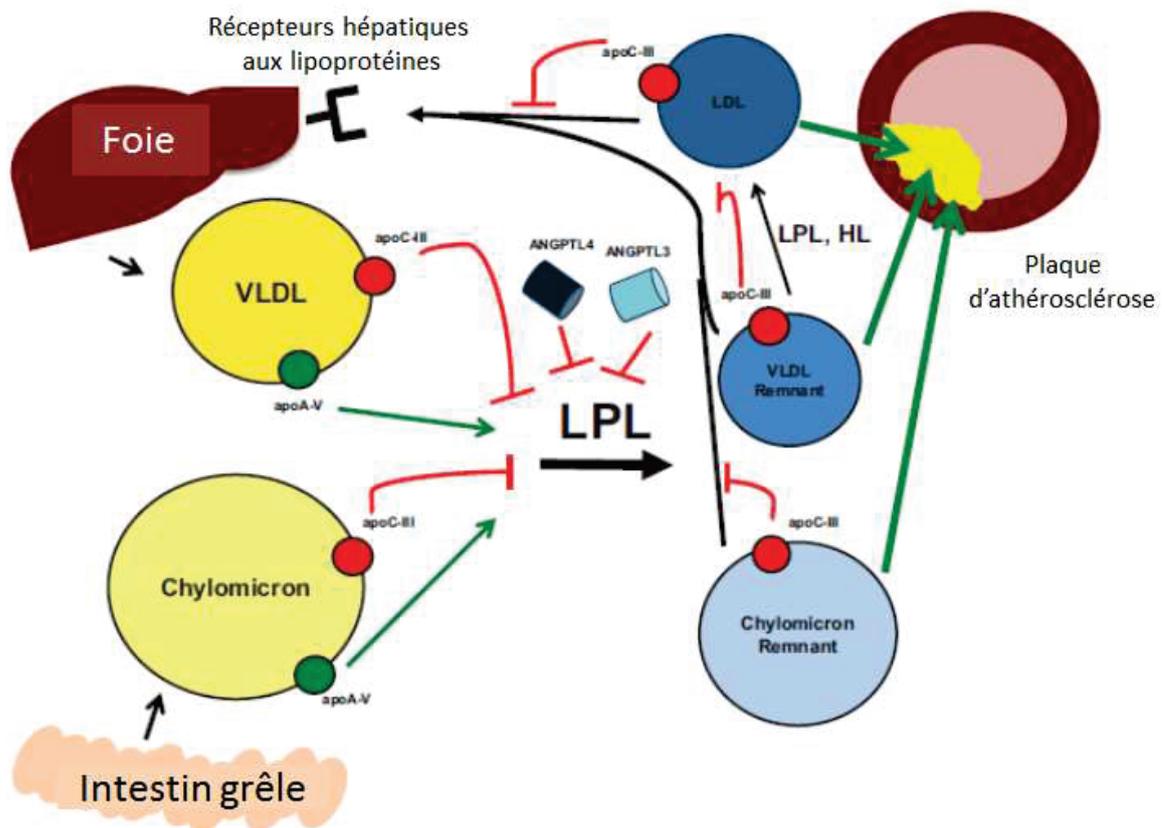


Figure 7 : Régulation de la LPL, adaptée d'après (8)

Les CM contiennent des TG, du cholestérol, des phospholipides et des apolipoprotéines : l'ApoB-48, l'ApoA-I et l'ApoA-IV comme nous venons de le voir. Ils acquièrent ensuite l'ApoE et les apolipoprotéines C (ApoC-I, C-II, C-III) provenant d'échanges avec les HDL dans la circulation.

Les HDL sont les plus petites et plus denses lipoprotéines plasmatiques. Elles comprennent différentes sub-populations de différentes tailles, mobilités, compositions protéiques, lipidiques... (29)

Les HDL échangent des TG contre des esters de cholestérol avec les lipoprotéines riches en TG (LRTG), les Intermediate Density Lipoprotein (IDL), les LDL, et les remnants. Cet échange est favorisé par la cholesteryl ester transfer protein (CETP). La CETP est une glycoprotéine plasmatique qui promeut le transfert d'ester de cholestérol des HDL à d'autres lipoprotéines contenant l'ApoB et de TG provenant des LRTG aux HDL. Cet échange permet de réduire la concentration en cholestérol dans les HDL (Figure 8). La protéine est produite dans le foie et le tissu adipeux (30). Elle permet ainsi le transport

inverse du cholestérol qui peut être recapté par le foie et le remodelage des lipoprotéines avec un enrichissement en cholestérol conduisant aux LDL (31).

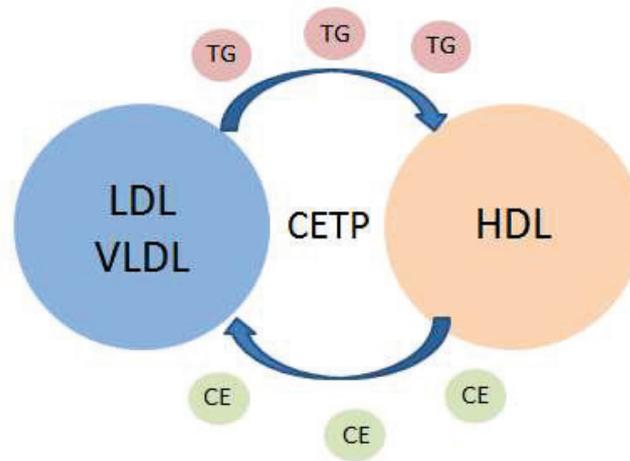


Figure 8 : Représentation schématique de l'action de la CETP, adaptée d'après (32)

Les CM sont ensuite recaptés par le foie via la liaison de l'ApoE à des récepteurs hépatiques : le récepteur aux LDL (LDL-R) et le LDL receptor related protein (LRP). La liaison de l'ApoE se fait aussi avec des protéoglycanes héparanes sulfates de surface (HSPG) ; les remnants sont internalisés par endocytose.

1.3.3. Métabolisme des VLDL

Les VLDL sont synthétisées au niveau hépatique. L'homologue de l'ApoB-48 des CM est l'ApoB-100. Les TG sont synthétisés dans le foie après capture des AG liés à l'albumine, ou des AG de CM ou VLDL remnants ou par lipogenèse. Dans le réticulum endoplasmique il y aurait association d'une particule lipidique à l'ApoC-III qui fusionnerait avec la vésicule contenant l'ApoB-100. Cette nouvelle vésicule transite vers l'appareil de Golgi où elle va acquérir des molécules d'ApoA-I et d'Apo-E puis elle va pouvoir être exportée (33).

Comme pour les CM, après hydrolyse par la LPL dans la circulation sanguine, les VLDL sont transformées en IDL, puis en LDL après action de la lipase hépatique. La lipase

hépatique, exprimée dans le compartiment vasculaire hydrolyse les TG essentiellement des lipoprotéines IDL et HDL en AG, les AG pourront être resynthétisés en TG dans le foie (34). Les LDL représentent le produit final du catabolisme des VLDL. Elles sont captées par les cellules périphériques. Environ 50 % des VLDL sont transformées en LDL, le reste est capté par le foie sous forme de remnants de VLDL ou d'IDL grâce à la liaison de l'ApoE au LDL-R ou au LRP (même mécanisme que pour les CM remnants). Les LDL se fixent aux LDL-R via l'ApoB-100 et peuvent être internalisées et dégradées par le foie ou les tissus périphériques.

Les VLDL contiennent des TG, du cholestérol et des apolipoprotéines : l'ApoB-100, l'ApoA-I, l'ApoE. Elles acquièrent ensuite les apolipoprotéines C (ApoC-I, C-II, C-III) provenant d'échanges avec les HDL dans la circulation via l'action de la CETP (même mécanisme que pour les CM) ainsi que des esters de cholestérol.

Les LDL contiennent peu de TG et beaucoup de cholestérol estérifié due à l'action des lipases, des phospholipides, des protéines, et une seule molécule d'ApoB-100.

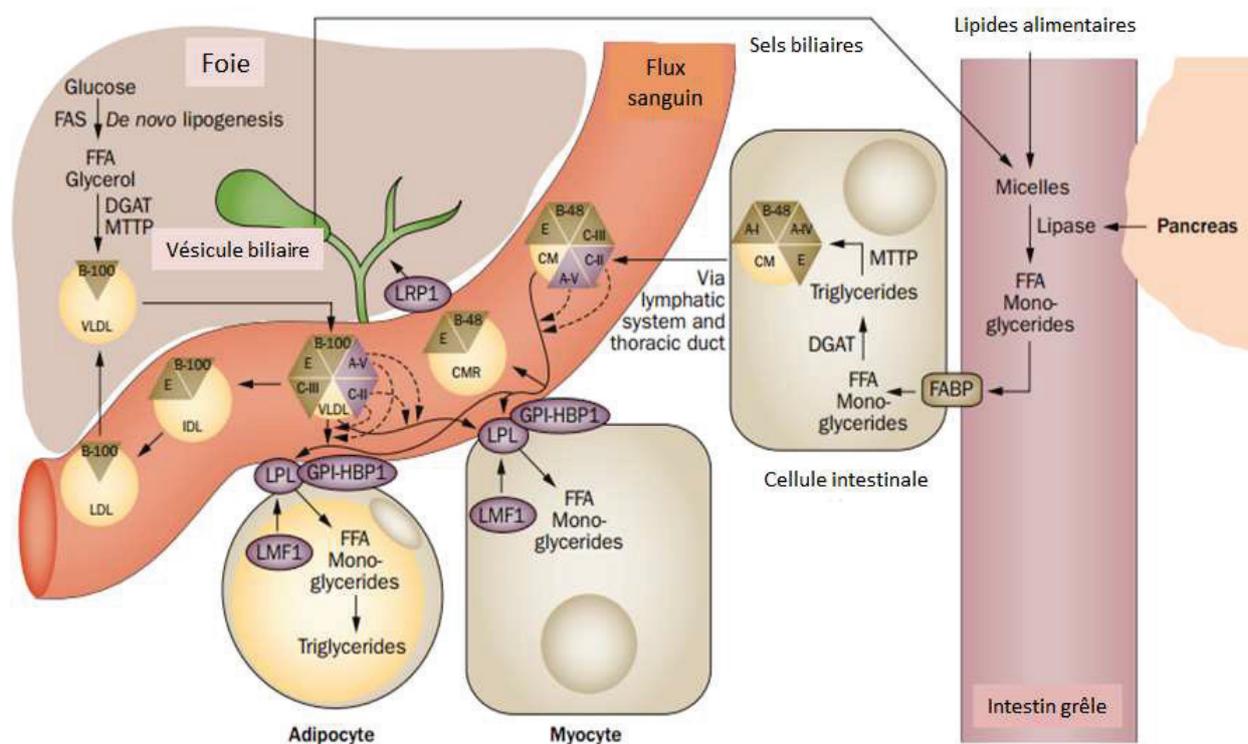


Figure 9 : Représentation synthétique du métabolisme des LRTG, adaptée d'après (4)

2. Physiopathologie des hypertriglycéridémies (HTG)

La concentration plasmatique en TG est la résultante de l'équilibre entre les différentes voies métaboliques des TG :

- L'absorption intestinale des graisses alimentaires et la synthèse des CM
- La synthèse hépatique des VLDL
- La lipolyse des LRTG et leur remodelage
- La recapture et l'élimination hépatique des VLDL, des CM remnants, et des IDL

La valeur normale physiologique des TG plasmatiques chez l'adulte est comprise entre 0.4 et 1.7 mmol/L ou 0.35 et 1.50 g/L (35). Les CM sont normalement absents du sérum à jeun, leur demi-vie est très courte.

2.1. Diagnostic et classification des dyslipidémies

Le dépistage d'une dyslipidémie repose sur une exploration d'une anomalie lipidique (EAL) chez un patient à jeun depuis 12 heures. Tous les adultes doivent être dépistés en cas de facteur de risque cardiovasculaire (36). En cas de valeur anormale une confirmation est indispensable sur un 2^{ème} dosage. L'EAL comprend :

- La concentration totale du cholestérol
- Le dosage des TG
- Le dosage du cholestérol HDL (HDLc)
- Le calcul du cholestérol LDL (LDLc) calculé selon la formule de Friedewald ci-dessous (formule non applicable si la concentration en TG est supérieure à 3,4g/L) :

$$LDL\text{-Cholestérol (en g/L)} = (\text{Cholestérol total}) - (\text{Cholestérol HDL}) - (\text{Triglycérides}) / 5$$

- L'aspect du sérum à jeun

Les valeurs de référence dépendent de l'âge, du sexe. Chez un patient adulte sans facteur de risque, le bilan est considéré comme normal si :

- Cholestérol total : 1.6 - 2.0 g/L ou 4.1-5.2 mmol/L
- LDLc < 1,60 g/l ou 4.1 mmol/L
- TG < 1,50 g/l ou 1.70 mmol/L
- HDLc > 0,40 g/l ou 1mmol/L
- Aspect du sérum : clair

Après des techniques d'ultracentrifugation d'un sérum normal, à jeun, les lipoprotéines se répartissent selon un gradient de concentration saline en trois principales zones de densité : les VLDL (<15% des lipoprotéines du plasma), les LDL (55%) et les HDL (30%). Les CM ont une densité inférieure à celle des VLDL que l'on peut observer en conditions physiologiques normales en période postprandiale. La différence de densité est due à la composition des lipoprotéines, plus le complexe contient des protéines plus la densité est importante et plus il contient de lipides plus la densité est faible (37).

Lors de ce bilan lipidique une ou plusieurs anomalies peuvent être détectées. Les dyslipidémies peuvent être soit primitives, soit secondaires.

Les hyperlipoprotéïnémies secondaires sont d'origines multiples et doivent toujours être recherchées en premier devant une anomalie lipidique : elles sont dues à des affections endocriniennes (diabète sucré, hypothyroïdie...), des maladies rénales, hépatiques, pancréatiques, des obstructions biliaires, l'alcoolisme, l'obésité, la prise médicamenteuse, l'alimentation...

Les dyslipidémies primitives sont classées en 5 types selon la classification de Fredrickson (Tableau 2) selon les résultats de l'EAL.

	Aspect du sérum à jeun	Cholestérol	TG	Lipoprotéines	Athérogénicité	Fréquence	Type
I	Lactescent	↑	↑↑↑	CM	-	<1%	Hypertriglycéridémie majeure
II a	Clair	>2,5g/l	N	LDL	+++	10%	Hypercholestérolémie
II b	Opalescent	↑	↑	VLDL + LDL	+++	40%	Dyslipidémie mixte
III	Opalescent	↑	↑↑↑	IDL	+++	<1%	Dyslipidémie mixte
IV	Trouble	N	↑↑↑	VLDL	+	45%	Hypertriglycéridémie
V	Opalescent	↑	↑↑↑	VLDL + CM	+	5%	Hypertriglycéridémie majeure

Tableau 2 : Classification de Fredrickson des dyslipidémies primitives, adaptée d'après (38,39)

- Hyperlipoprotéinémie de type IIa

L'hyperlipoprotéinémie de type IIa ou hypercholestérolémie pure est caractérisée par une augmentation du taux de cholestérol total et du LDLc. Elle peut être soit monogénique à expression autosomique co-dominante dont la prévalence de l'hétérozygotie est estimée entre 1/300 et 1/500 soit, le plus souvent polygénique sporadique. Elle résulte principalement d'une mutation du récepteur aux LDL (LDLR) empêchant la recapture hépatique des lipoprotéines LDL. Mais elle peut aussi être due à une mutation de l'*APOB* résultant d'une anomalie structurale de sa protéine altérant la liaison LDLR – ApoB ; ou encore plus rarement elle peut résulter de la présence d'une mutation gain de fonction de *PCSK9* (Protein convertase subtilisin kexin type 9) : PCSK9 étant un inhibiteur du recyclage hépatique des LDLR à la surface cellulaire, ce qui induit une diminution du nombre de LDLR à la surface hépatique (19,20).

- Hyperlipoprotéinémie de type IIb

L'hyperlipoprotéinémie de type IIb ou hyperlipidémie mixte est caractérisée par un taux élevé de cholestérol et de TG sous la forme de VLDL et LDL, avec un sérum trouble. Elle est athérogène. Sa fréquence est d'environ 1 à 2% dans la population adulte, elle représente environ 40% des dyslipidémies primitives. Elle résulte d'une surproduction hépatique des VLDL due à une augmentation de synthèse de l'ApoB-100 (25,26).

- Hyperlipoprotéinémie de type III

L'hyperlipoprotéinémie de type III ou dysbetalipoprotéinémie est caractérisée par un taux élevé de cholestérol et de TG sous la forme d'IDL, de pré-beta VLDL, avec un sérum

trouble. Elle résulte le plus souvent d'un génotype E2E2 du gène *APOE* : contrairement à la forme sauvage ApoE-3, l'ApoE-2 est moins bien reconnue par les récepteurs hépatiques engendrant une diminution de l'affinité des remnants CM et VLDL aux récepteurs (ralentissement du catabolisme des IDL) et une diminution de leur clairance hépatique. Mais elle peut aussi résulter d'une mutation rare hétérozygote ou homozygote de l'*APOE* comme l'ApoE-2-Christchurch (44).

- Hyperlipoprotéïnémie de type IV

L'hyperlipoprotéïnémie de type IV ou hypertriglycéridémie endogène est caractérisée par un taux élevé de TG sous la forme de VLDL, avec un sérum trouble à lactescent et un taux normal de cholestérol. Elle est souvent asymptomatique. Elle résulte d'une augmentation de synthèse des VLDL (+/- défaut de leur catabolisme). Elle s'exprime en présence de facteurs favorisants : obésité, diabète... Elle semble être d'origine polygénique, résultante d'un excès de variants rares associés dans les gènes codants pour les acteurs clefs de la lipolyse.

- Hyperlipoprotéïnémie de type V

L'hyperlipoprotéïnémie de type V ou hypertriglycéridémie endogène est caractérisée par une hypertriglycéridémie majeure généralement >10mmol/L, sous la forme de CM et VLDL après 12h de jeûne, un sérum lactescent avec anneau crémeux. Elle est associée au développement d'hépatosplénomégalie et un risque augmenté de pancréatite aiguë. Elle est peu athérogène. C'est la forme de révélation la plus fréquente des hyperchylomicronémies de l'adulte. Ces hyperchylomicronémies sont associées à des mutations délétères des gènes de la lipolyse des TG monogéniques (FCS) ou à des associations de variants, polygéniques. Cette hyperlipoprotéïnémie sera plus détaillée dans la partie 2.2 Physiopathologie des hyperchylomicronémies de ce manuscrit.

- Hyperlipoprotéïnémie de type I

L'hyperlipoprotéïnémie de type I est un type rare et sévère d'hypertriglycéridémie, caractérisée par un taux élevé de TG sériques sous la forme de particules de CM après 12h de jeûne. Elle est associée au développement d'un lipemia retinalis, une

hépatosplénomégalie et un risque augmenté de pancréatite aiguë. Elle est non athérogène. Elle comprend exclusivement les formes familiales d'hyperchylomicronémies, les plus représentatives étant le déficit en lipoprotéine lipase (LPL) avec une fréquence des homozygotes estimée entre 1/500'000 et 1/1million (45). Son expression est généralement précoce, pédiatrique. Cette hyperlipoprotéïnémie sera plus détaillée dans la partie 2.2 Physiopathologie des hyperchylomicronémies de ce manuscrit. Cependant ce phénotype est souvent dégradé en hyperlipoprotéïnémie de type V, car chez l'enfant l'activité de la lipase hépatique permet l'élimination des VLDL.

2.2. Physiopathologie des hyperchylomicronémies

L'hyperchylomicronémie est caractérisée par une hypertriglycémie sévère >10 mmol/L due à la présence de chylomicrons à jeun. En effet la demi-vie des CM est de l'ordre de 5 minutes ainsi ils sont absents dans le plasma en conditions normotriglycémiques voir hypertriglycémiques modérées après 12h de jeûne. Lorsque la concentration en TG dépasse 1000 mg/dL il y a une accumulation préférentielle des CM, aggravant l'HTG (2). Cependant la symptomatologie est très variable et la majorité des patients ayant une concentration de 20'000 – 30'000 mg/dL en TG sont asymptomatiques (45,46). Ainsi, elle est souvent découverte de manière fortuite. Sa complication principale est la pancréatite aiguë (environ 20% des cas) et dans une moindre mesure l'athérome. On peut observer le développement de lésions cutanées connues sous le nom de xanthomes éruptifs, une apparence laiteuse des vaisseaux sanguins rétiens (lipémie rétinienne), une douleur abdominale et / ou une hypertrophie du foie et / ou de la rate soit une hépatosplénomégalie (47).

Lorsque l'hyperchylomicronémie est associée à des xanthomes éruptifs, une lipémie rétinienne, ou des symptômes abdominaux on parle de syndrome d'hyperchylomicronémie, parfois compliqué de pancréatite (46).

Au sein des hyperchylomicronémies, on va trouver d'une part des formes monogéniques avec des mutations délétères des principaux gènes impliqués dans la lipolyse intravasculaire des TG : *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1*, et d'autre part des

formes polygéniques avec des associations de variants ou polymorphismes de ces mêmes gènes et d'autres gènes du métabolisme des TG qui perturbent la production et le catabolisme des LRTG par effet cumulatif. Les hyperchylomicronémies constituent par ailleurs un modèle de pathologie associant des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques : l'expression clinique des anomalies génétiques étant fortement influencée par l'environnement en particulier nutritionnel et les pathologies associées augmentent les facteurs de susceptibilité de présenter une HTG (Figure 10) (2,48).

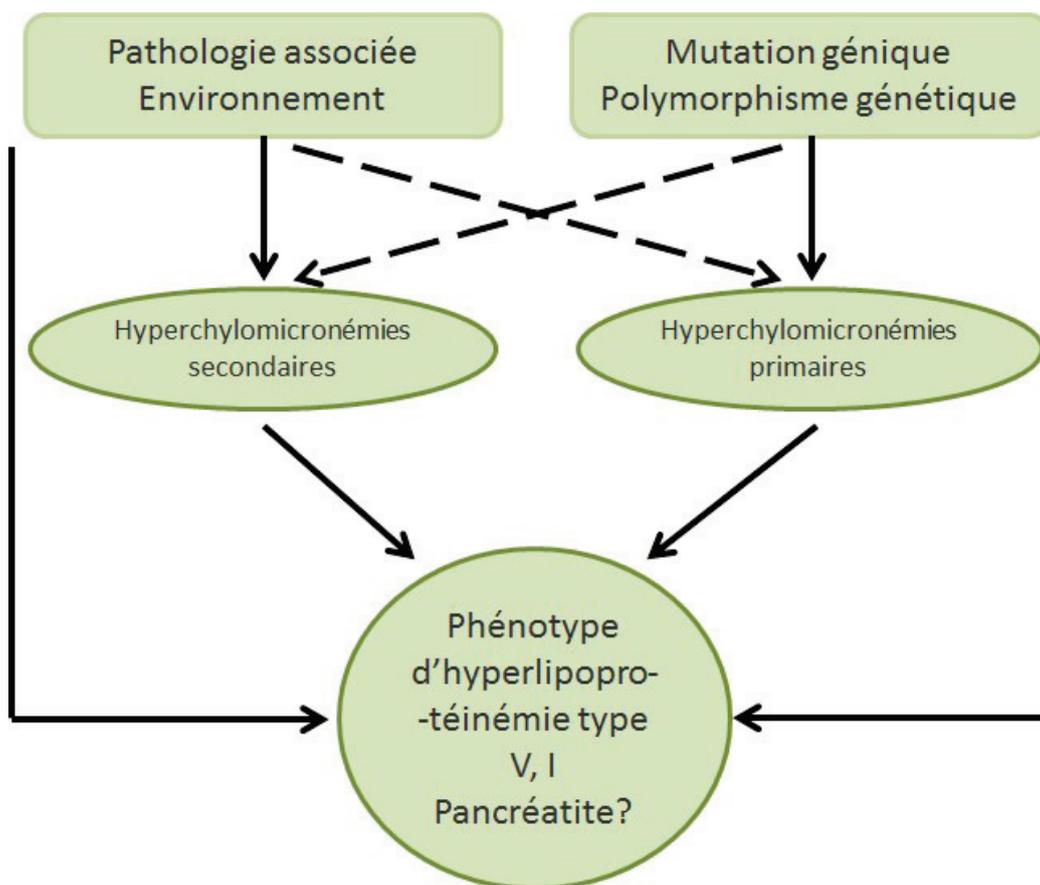


Figure 10 : Représentation des interactions gène-environnement en présence d'hyperchylomicronémie, adaptée d'après (48)

Les hyperchylomicronémies affectent environ un adulte sur 600. 95% sont atteints d'une prédisposition héréditaire polygénique et seulement 5% présentent une transmission autosomique récessive monogénique (1,38). De ce fait environ un individu sur 1 million est atteint d'une hyperchylomicronémie due à une mutation monogénique ou hétérozygote composite (40). La plus fréquente est la déficience LPL familiale (LPLD) ou encore hyperlipoprotéinémie de type I, affection héréditaire très rare où la fonction de

la LPL est impactée induisant une hyperchylomicronémie (47) causée par une anomalie du système LPL-ApoC-II (cas rares pédiatriques) (45). La prévalence d'une personne sur un million est peut être sous-estimée du fait du diagnostic car la reconnaissance et le diagnostic corrects de la maladie sont difficiles en raison de sa rareté et du manque de spécificité des signes et des symptômes, et des nombreux cas asymptomatiques (49). Les individus avec une mutation à l'état hétérozygote peuvent ou non présenter une HTG.

On parle de syndrome d'hyperchylomicronémie familiale (FCS ou Familial chylomicronemia syndrome) en présence d'une perturbation de la LPL, ce sont des hyperlipoprotéïnémies de type I ou de type V.

On parle de syndrome d'hyperchylomicronémie multifactorielle ou MCM ou Multifactorial chylomicronemia syndrome (MCFS) lorsqu'il y a coexistence de facteurs génétiques et secondaires et/ou environnementaux (diabète, syndrome métabolique, alcoolisme, grossesse, médicaments...) (50), ce sont des hyperlipoprotéïnémies de type V. La prévalence est beaucoup plus importante que la FCS. La plupart des patients présentent une forme familiale d'HTG modérée co-existante avec une HTG secondaire. Cependant le risque de pancréatite est plus important en présence d'un déficit complet en LPL ou FCS comparé à un MCM (51).

Le diagnostic de l'hyperchylomicronémie basé sur la biochimie, confirmé par l'analyse génétique (Figure 11) peut être complété en dosant l'activité LPL post-héparinique qui est retrouvée abaissée. Le dosage de la LPL (LPL masse) par ELISA est également utilisé.

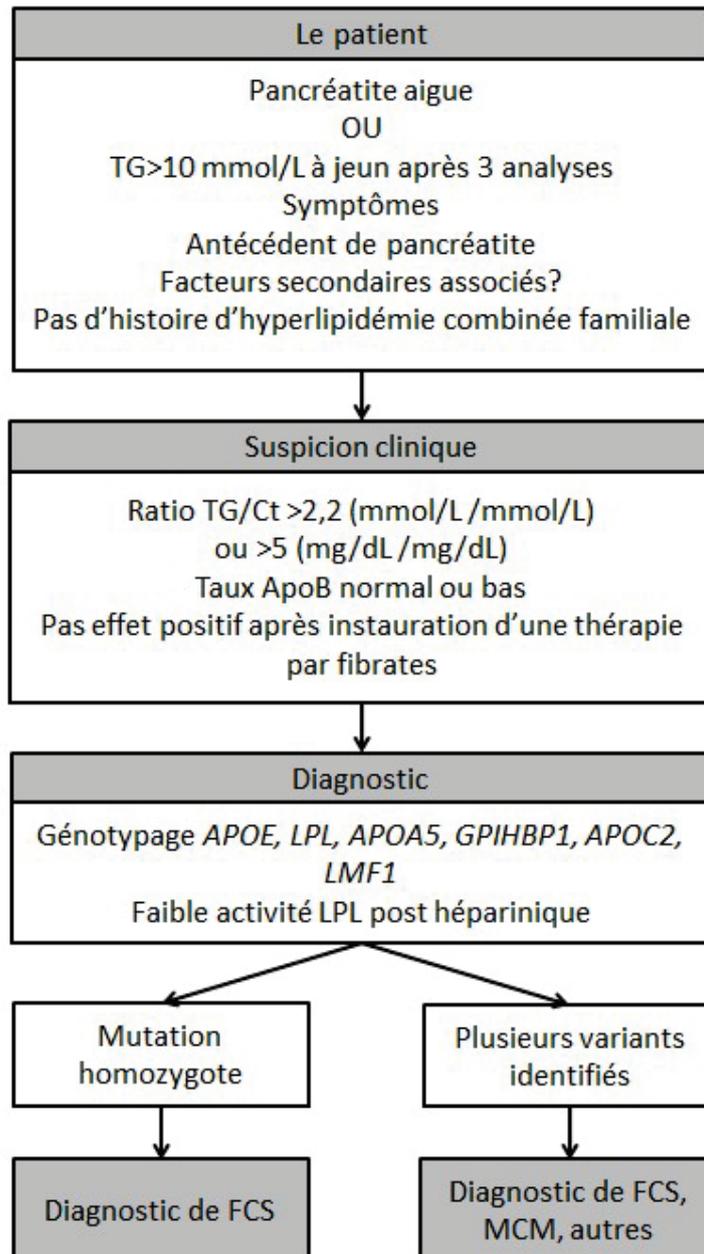


Figure 11 : Algorithme pour le diagnostic du syndrome d'hyperchylomicronémie familiale et d'hyperchylomicronémie multifactorielle schéma, adapté d'après (49) et (51)
Ct correspond au cholestérol total, FCS au syndrome d'hyperchylomicronémie familiale et MCM à l'hyperchylomicronémie multifactorielle

Le traitement des hyperchylomicronémies vise à réduire le taux de TG. Il comprend des modifications du mode de vie afin de favoriser la perte de poids avec un changement d'habitudes alimentaires, de l'activité physique, couplé à des médicaments dont les fibrates, les acides gras polyinsaturés oméga-3. La pancréatite aiguë peut être traitée par une insulinothérapie en milieu hospitalier afin d'abolir l'hyperchylomicronémie (46).

Cependant ces traitements restent limités, tout comme le régime alimentaire, il y a un réel besoin de développer de nouvelles thérapeutiques (52).

Plusieurs types de thérapies géniques sont déjà disponibles ou en cours de développement clinique afin de traiter les désordres liés aux lipides et le risque associé. Les thérapies géniques traitent la pathologie par modulation de l'expression génique dans des tissus spécifiques. La modulation est réalisée par introduction dans des cellules de transgènes exogènes : des séquences d'ADN, des oligonucléotides antisens (ASO), des petits ARN interférents (SiARN), des microARN (MiR), ou des ARN non codants longs (lncRNA) et leurs vecteurs. Il existe donc 6 techniques afin d'obtenir cette modulation :

- Remplacement du gène par introduction d'un gène compétent
- Supplémentation génique, augmentant l'expression du gène cible
- Altération de l'expression génique en clivant l'ARN codant, affectant la transcription
- Altération de l'expression génique en coupant ou remplaçant la partie mutée du gène
- Altération de l'expression génique en ciblant les ARN non codants (microARN) affectant la signalisation ou l'épissage alternatif
- Edition du génome, technique CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), introduisant des changements spécifiques (insertion, délétion) dans le génome de l'hôte au niveau de la cible

Dans le traitement de l'hyperchylomicronémie on retrouve des oligonucléotides antisens (ASO) ciblant l'ARNm du gène *APOC3* (gène décrit dans la partie 3. Rôle de l'apolipoprotéine C-III dans le métabolisme des TG et physiopathologie des HTG de ce manuscrit). Les ASO sont des séquences courtes d'ADN simple brin (environ 20-30 nucléotides) qui sont construits afin d'être complémentaires d'une séquence d'un ARNm cible. Une fois inséré dans les cellules, les ASO se lient par appariement de bases à l'ARNm cible, ce qui induit le recrutement d'une ribonucléase (RNase H) qui catalyse le clivage de la cible conduisant par la suite à l'inhibition de la synthèse protéique codée correspondante (Figure 12) (53).

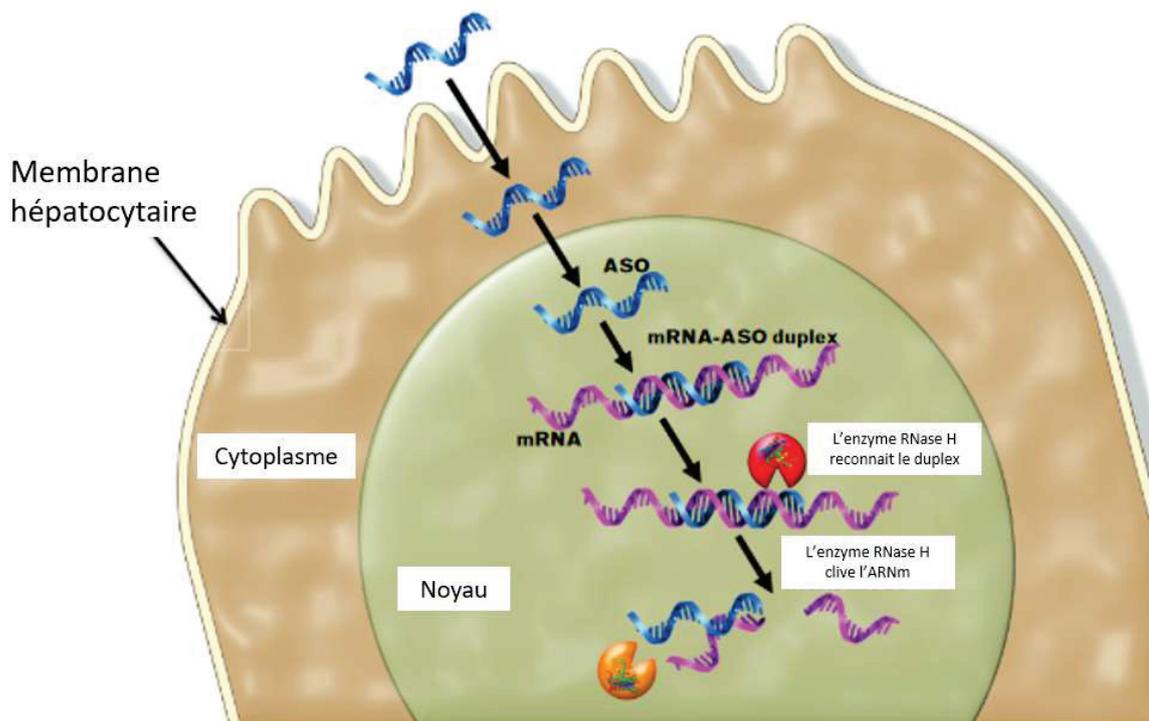


Figure 12 : Principe du traitement par oligonucléotides antisens, adapté d'après (53)

Une étude clinique de phase I a montré que les ASO anti-ApoC-III ou Volanesorsen, deuxième génération d'ASO, engendreraient une réduction dose-dépendante et prolongée d'ApoC-III plasmatique induisant une diminution des TG plasmatiques (53,54).

La thérapie génique Glybera (alipogène tiparvovec, AAV1-LPL S447X) est un AAV (virus adéno-associé) non répliquable de sérotype 1 conçu pour libérer et exprimer le gène *LPL* présentant la mutation S447X (55), mutation gain de fonction chez les patients déficients en *LPL*. Glybera cible spécifiquement les patients ayant une mutation inactivant le gène *LPL* et ne convient pas aux patients ayant d'autres formes de syndrome d'hyperchylomicronémie. Ainsi, tous les patients doivent être génotypés avant traitement. Les résultats des études sur Glybera suggèrent une administration intramusculaire qui est généralement bien tolérée et est associée à une réduction de l'incidence de pancréatite (ou douleurs abdominales associées) et une amélioration clinique jusqu'à 5 ans après une seule administration dans une proportion significative de patients, même si le taux de TG revient à son taux initial après 16-26 semaines post-traitement (54,56,57). Bien que positive à ce jour, le ratio bénéfice-risque global des thérapies à base de gènes doit encore être documenté à long terme chez d'autres patients et conditions (53).

Les lncRNA sont des ARN non codants de plus de 200 nucléotides, leur importance physiologique est moins documentée que celle des microARN. Quelques lncRNA représentent une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'hyperchylomicronémie, dans le développement d'ASO. Il a été observé récemment qu'une diminution de lncRNA dans le foie augmente l'expression d'ApoC-II, engendrant une meilleure activation de la LPL réduisant le taux de TG dans un modèle de souris (53).

2.2.1. Formes monogéniques – mutations délétères

Les formes monogéniques sont rares et résultent d'une mutation engendrant une perte de fonction d'un gène clef impliqué dans la lipolyse intravasculaire. Elles se révèlent généralement précocement souvent dans l'enfance et sont dues à des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites des gènes de la *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *LMF1* ou *GPIHBP1* induisant la perte de fonction d'une protéine impliquée dans le catabolisme des lipoprotéines riches en TG affectant directement ou indirectement la fonction de la LPL menant à l'HTG. Ce sont donc des maladies autosomiques récessives. Le phénotype est très variable et peut aller d'un état normotriglycéridémique à une HTG sévère, cependant souvent de simple porteurs hétérozygote ont un taux de TG normal (2,40,58–60).

Pour résumer, l'hyperlipoprotéïnémie de type I (HLP1) est principalement due à une mutation rare homozygote ou double hétérozygote engendrant une perte de fonction de la LPL (HLP1A). Cependant, quelques mutations sur d'autres loci codant pour des protéines impliquées dans l'activité, l'assemblage, ou le transport de la lipoprotéine lipase, ont été identifiées chez des patients atteints d'hyperchylomicronémie familiale sans mutations LPL. Les gènes concernés sont *APOC2* (HPL1B), *GPIHBP1* (HLP1D), *LMF1* (déficit en lipase combinée) ou *APOA5* (hyperchylomicronémie tardive), mais également la présence dans le sérum d'autoanticorps anti-LPL circulante (HLP1C), maladie auto-immune, à hérédité autosomique pseudo dominante, retrouvés dans des maladies rhumatoïdes comme le lupus érythémateux systémique (Tableau 3) (50,54,61,62).

Gène	Prévalence homozygote approximative	Âge de survenue	Nombre de mutations décrites (Source HGMD database)
<i>LPL</i>	1/1 million (95% des cas)	petite enfance / enfance	179
<i>APOC2</i>	< 20 familles (2,5% des cas)	Enfance / adolescence	19
<i>APOA5</i>	< 10 familles (1,5% des cas)	adulte	66
<i>GPIHBP1</i>	< 5 familles (0,5% des cas)	petite enfance / enfance / adulte	19
<i>LMF1</i>	< 5 familles (0,5% des cas)	adulte	11

Tableau 3 : Bases génétiques responsables de l'hyperlipoprotéïnémie de type I, adapté d'après (2,4,56,63)

HGMD est la Human Gene Mutation Database, base rassemblant les variants génétiques connus (publiés) responsables de pathologies, de Cardiff à l'institut génétique médicale.

2.2.2. Formes polygéniques

Comme vu précédemment seulement 5 à 10% (4) des personnes atteintes d'hyperchylomicronémie ont une mutation homozygote ou hétérozygote composite expliquant l'apparition de la pathologie (FCS) et parmi les hyperchylomicronémies primitives seulement 30%-50% des malades ont une mutation codante homozygote susceptible d'expliquer le phénotype. Plus communément, des études ont montré que les cas d'hyperchylomicronémies à révélation tardive sans facteurs secondaires orientent vers une étiologie génétique complexe constituée de multiples variants génétiques. L'expression phénotypique des HTG polygéniques comprend une grande variabilité de concentration de TG plasmatique (entre 3,5 et 10 mmol/L). Elles décompensent parfois en hyperlipoprotéïnémies de type V, la présence de CM à jeun est une caractéristique et cette forme présente également une augmentation concomitante de VLDL. Les formes polygéniques sont le résultat d'interactions complexes entre la génétique et l'environnement. Elles sont liées à l'accumulation de :

- Plusieurs variants fonctionnels de prédisposition comprenant des variants rares à l'état hétérozygote (dans 10% des cas mutations hétérozygotes du gène *LPL* mais également sur les gènes *APOC2*, *APOB*, *APOA5*, *LMF1*, *GPIHBP1*...) ayant un effet important sur le métabolisme des TG
- Des variants communs ayant un effet faible, ces derniers sont appelés SNP (Single Nucleotide Polymorphism), plus de 40 loci ont été identifiés dans

des études d'association (GWAS : Genome Wide Association Study), ils sont associés à une variation plasmatique des TG et parfois également à une variation des lipoprotéines plasmatiques (Tableau 4)

- Facteurs secondaires et environnementaux

TG	TG et HDL-C	TG, LDL-C, HDL-C, et C-total	TG, LDL-C et C-total	TG, LDL-C, et HDL-C	TG et C-total	TG, HDL-C et C-total
<i>MET</i>	<i>RSPO3</i>	<i>CETP</i>	<i>ANGPTL3</i>	<i>PIGV-NROB2</i>	<i>GCKR</i>	<i>LIPC</i>
<i>AKR1C4</i>	<i>FTO</i>	<i>TRIB1</i>	<i>MIR148A</i>		<i>NAT2</i>	
<i>PDXDC1</i>	<i>VEGFA</i>	<i>FADS1-2-3</i>	<i>LRAP1</i>			
<i>MPP3</i>	<i>PEPD</i>	<i>APOA5</i>	<i>TIMD4</i>			
<i>INSR</i>	<i>GALTNT2</i>		<i>CILP2</i>			
<i>MSL2L1</i>	<i>IRS1</i>					
<i>KLHL8</i>	<i>PLTP</i>					
<i>MAP3K1</i>	<i>MLXIPL</i>					
<i>TYW1B</i>	<i>LPL</i>					
<i>PINX1</i>	<i>LRP1</i>					
<i>JMJD1C</i>						
<i>CYP26A1</i>						
<i>CAPN3</i>						
<i>FRMD5</i>						
<i>CTF1</i>						
<i>PLA2G6</i>						
<i>CREB3L3</i>						
<i>ZHX3</i>						

Tableau 4 : Loci associés au taux plasmatique de TG associés à ou indépendamment d'autres traits lipidiques, adapté d'après (2,64)
Le C correspond à l'abréviation du cholestérol

L'accumulation de variants contribue à l'héritabilité de traits complexes sur le phénotype lipidique des individus concernés. En résumé la présence de SNP crée un état de fond de prédisposition pouvant interagir avec d'autres variants hétérozygotes rares ou avec des facteurs secondaires non génétiques, débouchant sur l'expression d'un phénotype d'HTG plus extrême. C'est le cas, par exemple, de l'allèle S2 du SNP SstI du gène *APOC3* qui présente une forte association avec l'HTG. Ce variant est situé sur la région 3' non codante ou 3'UTR (UnTranslated Region) du gène *APOC3*. Cependant, la présence de ces variants de prédisposition représente des facteurs de susceptibilités génétiques qui

s'exprimeront ou seront exacerbés en présence de facteurs secondaires non génétiques comme le style de vie, la consommation d'alcool... (2,4,50,54,56,58,65-67).

2.2.3. Gène LPL

2.2.3.1. Mutations délétères du gène LPL

Les mutations dans le gène *LPL* (NM_000237.2) représentent plus de 90% des cas de FCS rapportés dans la littérature, elles présentent des phénotypes variables et plus de 180 mutations ont été identifiées (4,49,50). Pour rappel, la prévalence d'une mutation homozygote sur le gène *LPL* est d'environ 2 pour 1 million. Au vu du nombre de mutations identifiées il est difficile d'être exhaustif, la figure 13 représente les mutations les plus décrites.

Les mutations les plus délétères, engendrant la perte de fonction de la protéine LPL, sont situées dans le domaine catalytique hautement conservé. Ce domaine est une triade catalytique responsable de l'hydrolyse des TG. Il se situe au niveau des résidus Ser159, Asp183, et His268. Les mutations impactant le site Asp183 sont délétères, aucun autre variant n'a été identifié sur les deux autres résidus (58,63).

La plupart des variants délétères faux-sens concernent les exons 5 et 6 du gène *LPL*, ces mutations seraient à l'origine d'une instabilité de l'homodimère de la protéine LPL et donc de la déficience en LPL. ApoC-II, activateur de la LPL se fixe au niveau des résidus Lys174-175 de la LPL, aucun variant n'est décrit sur ces résidus. GPIHBP1 se fixe sur les résidus 430 à 434 et sur la partie carboxy-terminale : résidus 443 à 462. Il existe deux variants sur ces sites de fixation répertoriés non délétères sur l'activité de la LPL Exon 9 c.1334G>A p.Cys445Tyr, rs118204079 et c.1342G>A p.Glu448Lys, rs149089920, la nomenclature utilisée tout au long de ce manuscrit est rapportée en Annexe 2. Les sites de liaison des lipides et de l'héparine se trouvent au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. Quelques variants délétères ont été identifiés dans cette région (63).

Les patients avec des mutations d'insertion, de délétion, non-sens ou du site d'épissage sont généralement incapables de produire la protéine LPL, ce sont donc des variants délétères. En revanche, de nombreuses mutations faux-sens délétères produisent une masse de protéine LPL. Sur les 63 mutations délétères faux-sens signalées dans l'étude de Rodrigues et al (63), 39 ont été rapportées comme étant associées à une protéine inactive dans le plasma post-héparinique ou dans des cellules cultivées, et 3 ont été associées à l'impossibilité de mettre en évidence la présence de la protéine ; les 21 autres restent à étudier (63).

Une mutation homozygote impliquant le codon start du gène *LPL* a été décrite chez un patient ayant une HTG sévère et des pancréatites récurrentes, il s'agit de la mutation Exon 1 c.3G>C, p.Met1Ile. Elle entraîne une réduction de 98% de l'activité de la protéine en raison de la réduction de son expression. Cette mutation était associée à une autre mutation chez ce patient: Exon6 c.805G>A, p.Glu269Lys, rs761886494 à l'état hétérozygote cette dernière isolément engendre une activité LPL fortement diminuée mais une masse normale contrairement à la mutation p.Met1Ile (68).

Les variants retrouvés dans la région promotrice du gène présentent différents niveaux d'activité LPL. Les substitutions en positions c.-267T>G (T-79G) et c.-283G>T (G-95T) rs80351041 n'impactent pas l'activité. La substitution en c.-227T>C (T-39C) induit une réduction de 85% de l'activité LPL, une réduction de 70-75% est associée à la mutation c.-241G>T (G-53T), une réduction de 40 à 50% associée à c.-281T>G (T-93G), rs1800590, et une réduction de 20-50% est associée à l'insertion CC : c.-176_175insCC, rs1466978295. Le variant c.-16A>G a été retrouvé chez des patients HTG (58,69,70).

La mutation Exon 5 c.644G>A p.Gly215Glu, rs118204057 est une des plus fréquente, notamment dans la population québécoise, et engendre une augmentation de 80% du taux de TG (71). Cette dernière a été retrouvée associée à une nouvelle mutation chez un patient hétérozygote composite : Exon 5 c.720G>C p.Gln240His, chez ce patient on retrouve une HTG sévère qui s'améliore après restriction alimentaire (60).

Les mutations à l'état hétérozygote, comme par exemple c.506G>A p.Gly169Glu, rs118204063 et c.680T>C p.Val227Ala, rs528243561 situées dans les exons 4 et 5 respectivement conduisent à des augmentations de concentration de TG plasmatique (58).

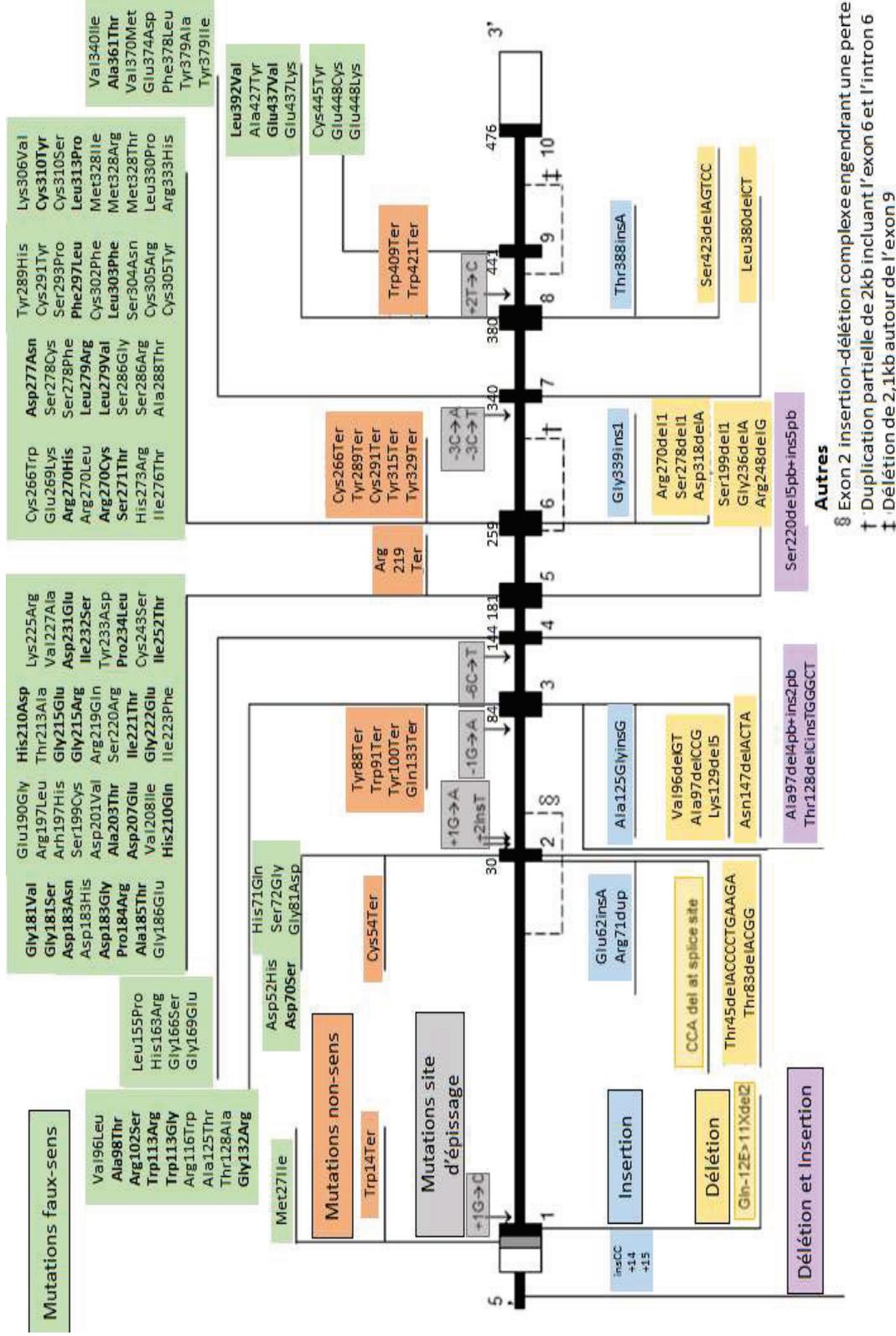


Figure 13 : Représentation du gène LPL avec ses variants associés à une déficience en LPL, adaptée d'après (45,50,63)

Les mutations faux-sens en gras représentent les mutations associées à une LPL inactive dans des études in vivo ou in vitro. Seules les mutations Met27Ile, Cys243Ser et Cys266Trp ont été rapportées comme étant associées à l'absence de protéine LPL. Chaque nombre indique la position de l'acide aminé impacté.

2.2.3.2. Polymorphismes de la LPL

Plusieurs variants de la LPL sont associés à l'augmentation de concentration de TG même s'ils n'impactent pas significativement la fonction de la LPL. L'association d'une mutation hétérozygote à des conditions environnementales et/ou génétiques peut être en faveur d'une hyperchylomicronémie.

Les variants communs codants c.106G>A p.Asp36Asn D9N, rs1801177 ; c.953A>G p.Asn318Ser N291S, rs268 et c.1421C>G p.Ser474Term S447X, rs328 du gène *LPL* ont une prévalence respective de 7%, 14% et 9.3% chez les patients atteints d'hypertriglycémie sévère, d'après une étude. D9N et N291S seraient associés à une augmentation de TG, cependant leur rôle causal est minime mais ils agiraient en synergie avec d'autres variants. Le variant S447X comme présenté précédemment entraîne une hypotriglycémie, il est utilisé dans la thérapie génique Glybera mais sa fonctionnalité est débattue l'effet hypotriglycémiant pourrait correspondre à des déséquilibres de liaisons avec des variants modulant la liaison des microARN (7). D'autres polymorphismes non codants tels que c.1322+483T>G LPL-HindIII rs320, c.1323-90T>G rs327 et c.*1671T>C rs13702 sont également associés à une hypotriglycémie. Pour ce dernier, rs13702 situé sur la région 3'UTR, la suppression du site de liaison du microARN hsa-miR-410 en présence de l'allèle mineur engendre une augmentation de l'expression de la LPL. Tous ces effets sont indépendants les uns des autres (63,72,73).

2.2.4. Gène APOC2

2.2.4.1. Mutations délétères du gène APOC2 :

Les mutations délétères du gène *APOC2* (NM_000483.4) représentent une cause monogénique d'hyperchylomicronémie, une dizaine seulement de mutations sont décrites sur ce gène comme délétères dans une vingtaine de famille (Tableau 5) (50,74).

Le gène *APOC2* est situé sur le chromosome 19 dans le cluster *APOE-C1-C4-C2*. Ce gène est principalement exprimé dans le foie mais son expression a également été

démontrée dans l'intestin et le pancréas. Le gène *APOC2* est composé de quatre exons codant pour l'apolipoprotéine C-II (ApoC-II), une protéine de 79 acides aminés, et de 8.8 kDa. L'extrémité N-terminale de la protéine comporte le domaine de liaison aux lipides, qui n'a aucun effet sur l'activité LPL, alors que l'hélice en C-terminale agit comme un activateur de la LPL. L'ApoC-II est donc un cofacteur de la LPL. Le résidu le plus important de la protéine est la leucine en position 94, elle dirige les lipides vers le site actif LPL en coopération avec d'autres résidus hydrophobes hautement conservés au cours de l'évolution. La protéine se retrouve à la surface des HDL, des CM et des VLDL (50,58,75).

Mutations sur la partie codante
Exon 2, c.1A>G, p.Met1Val, rs120074112
Exon 2, c.10C>T, p.Arg4Term, rs202190413
Exon 3, c.122A>C, p.Lys41Thr, rs120074114
Exon 3, c.142T>C, p.Trp48Arg, rs120074115
Exon 3, c.177C>T, p.Tyr59Term, rs120074111
Exon 3, c.177C>G, p.Tyr59Term, rs120074111
Exon 3, c.178G>A, p.Glu60Lys, rs5122
Exon 4, c.255C>A, p.Tyr85Term, rs120074116
Exon 4, c.274C>T, p.Gln92Term, rs199563828
Exon 4, c.281T>C, p.Leu94Pro, CM062426
Mutations impactant le site d'épissage
IVS2 (Intron2) c.55+1G>C, rs111628497
IVS2-30G>A, c.56-30G>A, rs114780592
Mutation régulatrice
c-13-9A>G, rs773976394
Petites délétions / insertions
Exon 3, c.70del p.Gln24Asnfs*17
Exon 3, c.118del p.Val40*39
Exon 4, c.270delT p.Asp91Thrfs*7
Exon 4, c.274dup p.Gln92Profs*28 rs756916028
Large délétion de 7.5kb dans la région promotrice impactant l'exon 1 et le gène <i>APOC4</i> (76)

Tableau 5 : Mutations décrites sur le gène *APOC2* comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI

Généralement, ces mutations (Tableau 5) réduisent la synthèse efficace de la protéine ApoC-II ou engendrent une protéine non fonctionnelle ou ayant une activité diminuée ce qui diminue l'activation de la LPL et donc induit une HTG. Chez les souris transgéniques, une corrélation positive a été trouvée entre la concentration élevée en TG et la concentration plasmatique d'ApoC-II (58).

Les porteurs hétérozygotes des mutations décrites dans le Tableau 5 ont des profils lipidiques normaux, avec la plupart du temps des concentrations en TG plus élevées que chez des sujets sains (77,78).

2.2.4.2. Polymorphismes de l'APOC2

Comme pour le gène *LPL*, plusieurs variants sont associés à l'augmentation de concentration de TG et l'association d'une mutation hétérozygote du gène *APOC2* à des conditions environnementales et/ou génétiques peut être en faveur d'une hyperchylomicronémie. Par exemple, la mutation Exon3 c.178G>A p.Glu60Lys, rs5122 ou encore Exon 3 c.122A>C p.Lys41Thr, rs120074114 dont leur effet pourrait être en synergie avec des variants du gène *APOE*.

2.2.5. Gène APOA5

2.2.5.1. Mutations délétères du gène APOA5 :

Le gène *APOA5* (NM_052968.4) appartient au cluster *APOA1-A4-C3-A5*, situé sur le bras long du chromosome 11. Il possède quatre exons codant pour l'apolipoprotéine A-V (ApoA-V). Il code pour une protéine de 366 acides aminés dont les 23 premiers correspondent au peptide signal et de 39 kDa. Son expression est principalement dans le foie, elle est également détectée dans l'intestin. Elle circule à la surface des VLDL, des HDL et des CM, avec environ une molécule d'ApoA-V pour 20-25 particules de LRTG. L'apolipoprotéine A-V est un cofacteur de la LPL. Elle stabiliserait le complexe lipolytique entre LPL et LRTG ce qui activerait ainsi la lipolyse intravasculaire des TG. Cette fonction serait due à sa capacité à faciliter l'interaction entre les héparanes sulfates et l'ApoC-II sur les LRTG ce qui assisterait ensuite l'interaction entre ApoC-II et la LPL à la surface de l'endothélium vasculaire. L'ApoA-V est également impliquée dans la diminution de la synthèse et / ou la sécrétion des VLDL et des CM (79). Il existe une relation inverse entre

l'expression de l'ApoA-V et la synthèse intestinale des CM. L'ApoA-V diminuerait la sécrétion des triglycérides-VLDL par diminution de la lipidation de l'ApoB, de façon dose dépendante (80). L'ApoA-V pourrait guider les triglycérides vers la formation de gouttelettes lipidiques diminuant ainsi la production des VLDL (81). L'ApoA-V est également ligand pour les récepteurs de lipoprotéines LDLR et LRP-1 au niveau hépatique ainsi elle stimulerait l'endocytose des lipoprotéines (82). Donc l'ApoA-V stabilise le complexe enzymatique de la lipoprotéine lipase et favorise la lipolyse. Chez des souris Knock Out pour le gène *APOA5* on observe une augmentation des concentrations plasmatiques des TG, et une diminution lors de la surexpression du gène *APOA5*. Plusieurs domaines actifs ont été identifiés sur cette protéine avec notamment une liaison aux lipides au niveau des résidus 192 à 238 et 301 à 343, un domaine d'activation de la LPL au niveau des résidus 192 à 238 ainsi qu'un domaine de liaison à l'héparine au niveau des résidus 186 à 227. Plusieurs mutations rares ont été décrites dans ce gène : une cinquantaine de variants faux-sens et non-sens, moins d'une dizaine de variants affectant l'épissage, moins de dix mutations régulatrices, une dizaine de petites délétions/insertions, et peu de gros réarrangements. Quelques familles (trois) sont décrites comme portant une mutation homozygote, d'autres familles sont décrites avec des mutations hétérozygotes composites associées à des polymorphismes du même gène (4,50,58,72,83). Les mutations homozygotes sont à l'origine de l'hyperchylomicronémie. Les variants communs d'ApoA-V affectent fortement les concentrations plasmatiques de TG. Les patients hétérozygotes ont une grande variabilité dans leur concentration plasmatique de TG dont beaucoup ont une concentration normale ; la variabilité est plus en faveur d'une augmentation des TG chez les patients présentant des variants communs homozygotes (58). La plupart des polymorphismes du gène *APOA5* sont en déséquilibre de liaison et on distingue différents haplotypes :

- L'haplotype *APOA5**1 correspond à l'état sauvage
- L'haplotype *APOA5**2 est défini par la présence des allèles rares des variants suivants:
 - c.-644C>T (- 1131T>C), rs662799
 - c.-3A>G (-3G>A), rs651821

- c.162-43A>G (SNP2), rs2072560
- c.*158C>T (1891T>C, SNP1), rs2266788

Cet haplotype est associé à une hypertriglycémie (84,85). Tous les variants sont en fort déséquilibre de liaison ainsi la présence du variant -1131T>C signe la présence de l'haplotype APOA5*2. La présence de l'allèle mineur de cette substitution (-1131T>C, rs662799) est associée à une augmentation d'environ 15% de la concentration en TG et également une augmentation significative du risque de maladies cardiovasculaires (58). Les deux polymorphismes (rs662799 et rs651821) augmentent les concentrations plasmatiques de TG de façon indépendante et sont associés à un risque accru d'obésité notamment chez les enfants chinois (86). De plus dans la population asiatique il y a une augmentation de la prévalence de la substitution Exon 4 c.553G>T, p.Gly185Cys, rs2075291 chez les patients hypertriglycémiques par rapport aux témoins, variant non répertorié dans la population caucasienne (58).

L'allèle mineur du variant rs2266788 situé sur la 3'UTR montre également une forte association avec la concentration de TG plasmatique seul et en haplotype. Cet allèle peut engendrer une création ou suppression de site pour un microARN. La liaison du microARN hsa-miR-3201 en présence de l'allèle sauvage engendre un retard de dégradation de la protéine ApoA-V et donc augmente la concentration de son ARNm. Cependant la suppression du site de liaison en présence de l'allèle muté conduit à une diminution de l'ARNm d'ApoA-V. Ce variant est également le site de liaison pour le microARN hsa-miR-485-5p en présence de l'allèle muté qui empêche l'expression efficace de la protéine (58).

- L'haplotype APOA5*3 porte une sérine au codon 19 substituée par un tryptophane : c.56C>G, p.Ser19Trp, S19W, rs3135506, retrouvé chez 40 à 60% des patients hyperlipoprotéinémiques de type IIb, III, IV et V versus 15% chez les normotriglycémiques (74). Ce variant S19W situé dans le peptide signal diminue la synthèse de la protéine ApoA-V. Il est également associé à une augmentation du taux de TG (58).

Les variants rs662799, rs3135506, rs2075291 sont associés à l'HTG avec des concentrations plasmatiques plus élevées de TG et augmentent le risque de survenue d'infarctus du myocarde, cependant on observe une grande variabilité interethnique (83).

Les mutations faux-sens, non-sens et introniques répertoriées sur ce gène et associées à une HTG sont citées dans le tableau 6 suivant.

Variants situés dans la partie codante	
	Exon 3 c.56C>G, p.Ser19Trp, S19W, rs3135506
	Exon 3 c.154G>A, p.Glu52Lys, rs755144803
	Exon 4 c.197A>G, p.Asn66Ser
	Exon 4 c.283C>T, p.Gln95Term, rs756437615
	Exon 4 c.289C>T, p.Gln97Term, rs201079485
	Exon 4 c.398C>G, p.Thr133Arg
	Exon 4 c.415C>T, p.Gln139Term, rs121917821
	Exon 4 c.434A>G, p.Gln145Arg, rs368739905
	Exon 4 c.442C>T, p.Gln148Term
	Exon 4 c.457G>A, p.Val153Met, rs3135507
	Exon 4 c.553G>T, p.Gly185Cys, rs2075291
	Exon 4 c.756G>C, p.Gln252His
	Exon 4 c.758T>C, p.Leu253Pro, rs781206581
	Exon 4 c.763G>A, p.Glu255Lys, rs746869568
	Exon 4 c.764A>G, p.Glu255Gly, rs543375884
	Exon 4 c.811G>T, p.Gly271Cys
	Exon 4 c.883C>T, p.Gln295Term, rs765011895
	Exon 4 c.902G>C, p.Arg301Pro
	Exon 4 c.913C>T, p.Gln305Term
	Exon 4 c.941T>G, p.Leu314Arg
	Exon 4 c.944C>T, p.Ala315Val, rs143292359
	Exon 4 c.962A>T, p.His321Leu, rs201201147
Variants situés dans le site d'épissage	
	c.-977T>C, rs10750097
	c.-644C>T (- 1131T>C), rs662799
	c.-3A>G (-3G>A), rs651821
	c.49+1G>A IVS2+1G>A
	c.49+5G>C IVS2+5G>C
	c.161+3G>C IVS3+3G>C
	c.162-43G>A, rs2072560
	c.*158C>T (1891T>C), rs2266788
Délétions et Insertions	
	Exon 4 c.295_297del, p.Glu99del
	Exon 4 c.427del, p.Arg143Alafs*57 rs777046568
	Exon 4 c.694_705del, p.Ser232_Leu235del
	Exon 4 c.724del, p.Leu242Cys fs*55
	Exon 4 c.926_928del, p.Glu309del
	Exon 4 c.980_981del, p.Glu327Valfs*19
	Exon 4 c.990_993del, p.Asp332Valfs*5, rs774150500
	Exon 4 c.995_998del, p.Asp332Valfs*5

Tableau 6 : Variants décrits sur le gène APOA5 comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI

2.2.5.2. Polymorphismes de l'APOA5

Plusieurs polymorphismes du gène *APOA5* sont fortement associés à l'hypertriglycémie et sont plus fréquemment retrouvés chez les patients présentant une hyperchylomicronémie. Ces polymorphismes sont regroupés en haplotypes comme décrits précédemment. Les mutations répertoriées dans le Tableau 6 et retrouvées à l'état hétérozygote prédisposent à un développement d'hyperchylomicronémie qui peut se révéler après association à d'autres variants ou facteurs environnementaux. Par exemple le polymorphisme S19W est associé à des mutations hétérozygotes de la LPL ou aux isoformes E2 ou E4 de l'ApoE ou encore à des conditions environnementales telles qu'une obésité, un diabète... Ces associations induisent l'expression du phénotype d'HTG.

2.2.6. Gène GPIHBP1

2.2.6.1. Mutations délétères du gène GPIHBP1

Le gène *GPIHBP1* (NM_178172.5) est situé sur le bras long du chromosome 8, il code pour la protéine glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (Gpihbp1) composée de 4 exons, de 184 acides aminés, de 28 kDa. La protéine Gpihbp1 est exprimée à la surface luminaire de l'endothélium capillaire dans le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Elle est composée d'un domaine acide, d'un motif Ly6 riche en cystéine (10 cystéines) et d'une partie appelée GPI anchor ou ancre GPI qui permet son ancrage à la membrane plasmique et qui peut être clivée. Le domaine acide est impliqué dans la liaison de Gpihbp1 avec la LPL, les CM, et ApoA-V. Tandis que le domaine Ly6 est essentiel pour la liaison à la LPL, dû à sa conformation particulière composée par ses ponts disulfures. Cette protéine possède plusieurs fonctions. Elle sert de plate-forme pour la LPL et ses substrats afin d'accroître l'efficacité de l'hydrolyse des TG, elle aide l'ancrage des CM à la surface endothéliale et donc améliore la lipolyse. Elle est nécessaire pour le transport de la LPL depuis son site de sécrétion

(cellules parenchymateuses) à la lumière des capillaires. Les souris Knock Out (KO) pour ce gène présentent des HTG majeures avec accumulation de CM et VLDL. Une quinzaine de familles ont été décrites avec une mutation ou une délétion homozygotes dans ce gène, avec notamment la mutation délétère Exon 2 c.166G>C p.Gly56Arg, rs587777636, homozygote, ou Exon 3 c.194G>C p.Cys65Ser, rs587777638 et Exon 3 c.202T>G p.Cys68Gly, rs587777639 hétérozygotes composite. Une quinzaine de mutations faux-sens et non-sens, une petite, et quelques grosses délétions ont été décrites pour ce gène. La plupart des hétérozygotes présentent un profil lipidique normal (Tableau 7) (4,44,58,65,67,87-90).

Il a été récemment démontré que seuls les monomères *Gpihbp1* sont capables de se lier à la LPL et que les mutations dans le domaine Ly6 conduisent à la production de di- et / ou de multimères qui sont incapables de se lier à la LPL. Cependant, la mutation Exon 4 c.326G>C p.Trp109Ser ne provoque pas de multimérisation, et pourtant montre une capacité réduite à lier la LPL. Ce qui suggère que la position de la mutation peut jouer un rôle direct dans la liaison avec la LPL (91).

Un polymorphisme dans le promoteur du gène *GPIHBP1* (c.-469G>A, rs72691625) a été associé à une hypertriglycémie, en particulier chez les porteurs homozygotes, avec un effet additif significatif en présence de mutation perte de fonction du gène *LPL* (58).

La plupart des mutations délétères retrouvées sur le gène *GPIHBP1* concernent les exons 3 et 4 qui codent pour le domaine Ly6 qui est essentiel pour la liaison de *Gpihbp1* à la LPL (89).

Le polymorphisme Exon 1 c.41G>T p.Cys14Phe, rs11538389 (C14F), situé dans le peptide signal est plus fréquemment retrouvé chez les patients présentant une hyperchylomicronémie, le changement d'acide aminé diminuerait la capacité de transfert de la LPL à la surface des cellules (92). Cependant il n'induit pas à lui seul une HTG.

Mutations de la partie codante
Exon 1, c.3G>C p.Met1Ile (93)
Exon 1, c.42C>A p.Cys14Term
Exon 2, c.166G>C p.Gly56Arg, rs587777636
Exon 3, c.194G>A p.Cys65Tyr, rs587777638
Exon 3, c.194G>C p.Cys65Ser, rs587777638
Exon 3, c.202T>G p.Cys68Gly, rs587777639
Exon 3, c.203G>A p.Cys68Tyr
Exon 3, c.266G>T p.Cys89Phe, rs587777640
Exon 3, c.267C>A p.Cys89Term, rs776388699
Exon 3, c.286G>A p.Gly96Arg, rs373101330
Exon 3, c.323C>G p.Thr108Arg, rs752728823
Exon 4, c.344A>C p.Gln115Pro, rs587777637
Exon 4, c.431C>T p.Ser144Phe, rs78367243
Exon 4, c.523G>C p.Gly175Arg, rs145844329
Délétions / Insertions
Délétion de 17499pb, du gène entier (94)
Large délétion du chromosome 8 comprenant le gène entier (95)
Délétion homozygote des exons 3 et 4 (96)

Tableau 7 : Variants décrits sur le gène *GPIHBP1* comme associés à l'HTG, d'après les bases de données HGMD, Alamut et NCBI

2.2.7. Gène *LMF1*

Ce gène sera détaillé dans la partie 4. Rôle du Lipase Maturation Factor 1 (Lmf1) dans le métabolisme des TG de ce manuscrit.

2.2.8. Polymorphismes de l'*APOE*

Le gène *APOE* (NM_001302691.1) situé sur le chromosome 19 est composé de quatre exons. Il code pour l'apolipoprotéine E (ApoE) protéine de 317 acides aminés ayant un PM de 34.2 kDA et une concentration plasmatique <94 mg/L. Pour rappel, au cours de la lipolyse, l'ApoE est échangée entre les VLDL et les HDL, elle permet la liaison des lipoprotéines aux héparanes sulfates des protéoglycanes et cette liaison permet l'internalisation des remnants riches en ApoE. Elle possède trois isoformes communes (E2, E3 et E4) définies par deux SNP : Exon 4 c.388T>C p.Cys130Arg, rs429358 pour ϵ_4 , Exon 4 c.526C>T p.Arg176Cys, rs7412 pour ϵ_2 , et ϵ_3 est considéré comme sauvage.

Chaque isoforme diffère par un seul acide aminé. ApoE-2 diffère de l'isoforme ApoE-3 (forme la plus fréquente) par un changement d'une arginine au codon 176 en une cystéine et ApoE-4 par un remplacement d'une cystéine au codon 130 par une arginine. La variabilité de l'ApoE est associée à des différences de cholestérolémie ; l'ApoE-4 est associée à des concentrations plus élevées et l'ApoE-2 à des concentrations plus basses. Cependant, une association avec des concentrations de TG plasmatiques a également été rapportée. Les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ sont associés à des concentrations de TG plasmatiques plus élevées qui peuvent être influencées par les facteurs environnementaux, le sexe, l'état hormonal...

Le génotype APOE2E2, prévalence d'environ 1%, est associé au développement de la dysbetalipoprotéinémie familiale ou hyperlipoprotéinémie de type III lorsqu'il est associé à des facteurs génétiques et/ou environnementaux additionnels. Des phénotypes dyslipidémiques semblables sont décrits lors de rares mutations de l'*APOE*. Le variant $\epsilon 2$ (génotype E2/E3 ou E2/E2) est souvent retrouvé comme facteur génétique de prédisposition dans les hyperchylomicronémies. Le génotype rare E2E4 est également un cofacteur génétique associé à la survenue d'hyperchylomicronémie. En plus des polymorphismes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, il existe au moins 23 SNP sur le gène *APOE*. De plus, du fait de sa localisation géographique au sein du génome (cluster *APOE/C1/C4/C2*) *APOE* est en déséquilibre de liaison avec d'autres variants notamment avec certains de l'apolipoprotéine C-I (ApoC-I). En effet, le gène *APOC1* est situé à côté du gène *APOE*, sur le chromosome 19. Il code pour l'ApoC-I constituant des lipoprotéines riches en TG et il interagit avec la plupart des récepteurs des lipoprotéines. Un polymorphisme de sa région promotrice (insertion c.-371_-370insCGTT, rs11568822) est en déséquilibre de liaison avec des polymorphismes du gène *APOE*. L'allèle de l'insertion rs11568822 d'ApoC-I est principalement associé aux allèles E2 et E4, et l'allèle sauvage est associé à E3. Il est possible que le phénotype HTG observé en présence des variants de l'*APOE* puisse être exacerbé en présence de ce polymorphisme de l'ApoC-I, en effet les concentrations plasmatiques les plus élevées sont observées chez les porteurs homozygotes de l'allèle d'insertion rs11568822. Ainsi, les conséquences phénotypiques des variants de l'ApoE dépendent du contexte génétique associé (58,59,97,98).

2.2.9. Polymorphismes de l'APOC3

Les polymorphismes retrouvés sur le gène *APOC3* seront décrits dans la partie 3. Rôle de l'apolipoprotéine C-III dans le métabolisme des TG et physiopathologie des HTG de ce manuscrit.

2.2.10. Polymorphismes de l'APOB

Ce locus joue un rôle plus particulièrement dans métabolisme du LDL cholestérol. Les mutations décrites sur ce gène engendrent des hypercholestérolémies ou des hypobétalipoprotéïnémies. Cependant, le variant Exon 29 c.13013G>A p.Ser4338Asn, rs1042034 est associé à une diminution de concentration de TG tandis que le variant rs4635554 (g.21166787T>G) situé à environ 120kb en amont du gène *APOB* est associé à un risque d'HTG (26,38,41,55).

Dans notre cohorte de patients hyperchylomicronémiques environ 50% ont une susceptibilité majeure génique (mutation hétérozygote, haplotype *APOA5*), et 65% présentent une susceptibilité mineure (présence d'un variant ou association de variants prédisposant à la maladie).

Pour résumer, les formes primaires causées par des mutations monogéniques ou hétérozygote composite des gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *LMF1*, et *GPIHBP1* sont le plus souvent des hyperlipoprotéïnémies rares ayant un phénotype sévère de type V, exceptionnellement de type I (40). Le phénotype est moins sévère cliniquement et biochimiquement chez les patients ayant une mutation dans *APOC2*, *APOA5*, *LMF1* ou *GPBHP1* que chez les patients ayant une mutation homozygote sur la *LPL* (74). Tandis que les hyperlipoprotéïnémies sporadiques de type V correspondant aux MCM ont un phénotype moins sévère. Elles sont préférentiellement de cause polygéniques, et les gènes impliqués sont le plus fréquemment : *LPL*, *APOA5*, *APOB*, *LMF1*, *GPIHBP1*, *APOC2*, et *APOE*

souvent associées à des influences environnementales ou causes secondaires (Figures 14 et 15) (50).

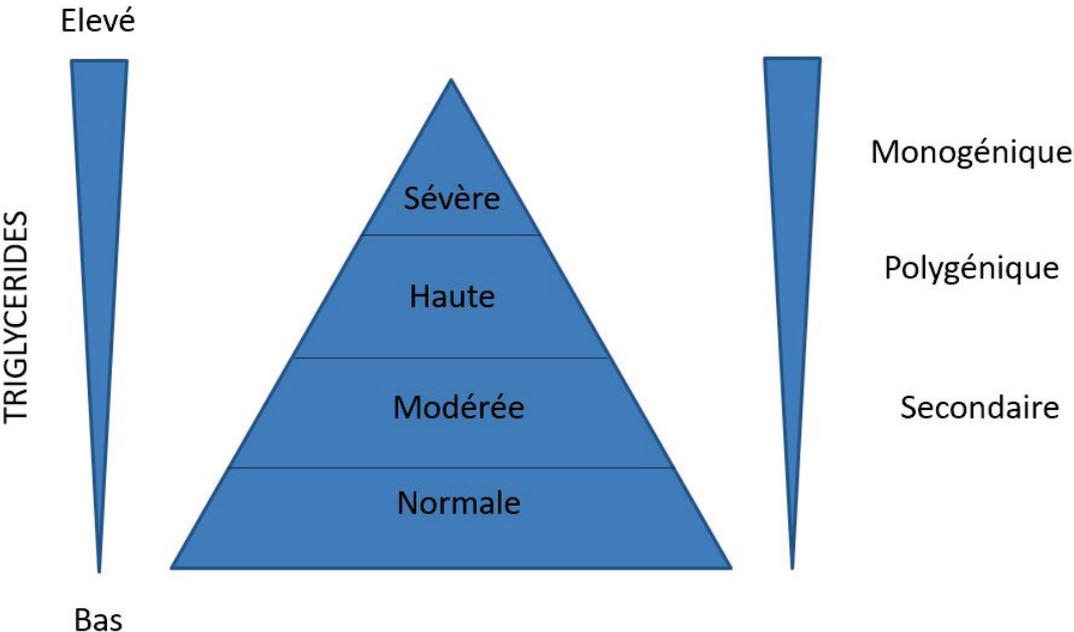


Figure 14 : Schéma représentant la concentration en TG mettant en relation la cause probable, adapté d'après (11)

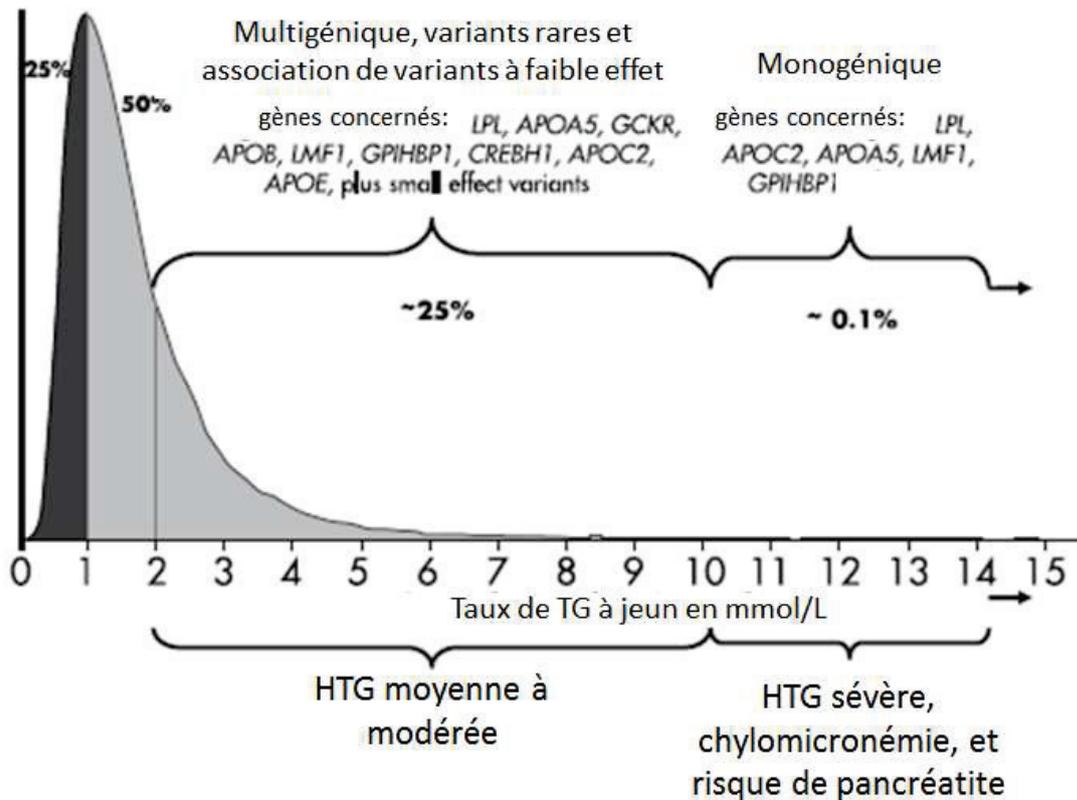


Figure 15 : Représentation des causes d'HTG selon la concentration en TG plasmatique à jeun, adaptée d'après (2)

2.2.11. Causes secondaires

De nombreuses circonstances physiopathologiques peuvent s'accompagner d'hyperchylomicronémie. Ce sont les causes secondaires de l'hyperchylomicronémie, non génétiques, qui sont : la grossesse, l'hypothyroïdie, un régime alimentaire (élevé en graisses saturées et glucides) ou un déséquilibre nutritionnel, un diabète de type 2 parfois de type 1, une consommation excessive d'alcool, des lipodystrophies (y compris le syndrome métabolique), des infections notamment par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), des maladies rénales (incluant le syndrome néphrotique et la dialyse rénale), un syndrome de Cushing, un lupus érythémateux disséminé, un myélome, une corticothérapie, un traitement immunosuppresseur, certains traitements antirétroviraux, les œstrogènes, le tamoxifène, l'acide 13-cis-rétinoïque, certains agents

antihypertenseurs (l'hydrochlorothiazide et les bêtabloquants non sélectifs) et certains antipsychotiques (Leponex - clozapine et Zyprexa – olanzapine) (2,46).

Cependant dans ces situations une minorité de personnes développera une hyperchylomicronémie ce qui illustre bien la forte interaction environnement / prédisposition génétique. Enfin, plus de 30% des patients atteints d'hyperchylomicronémie ne présentent aucun variant rare ni de SNP commun. Ce qui suggère qu'une ou des explications restent encore non identifiées dans le développement de l'hyperchylomicronémie (4).

3. Rôle de l'apolipoprotéine C-III dans le métabolisme des TG et physiopathologie des HTG

3.1. Rôle Physiologique et régulation d'ApoC-III

Le gène *APOC3* (NM_000040.1) appartient à un cluster situé sur le bras long du chromosome 11 (11q23). Ce cluster contient les gènes *APOA1/C3/A4/A5* (Figure 16). Ce locus est associé aux dyslipidémies et à une HTG sévère (16,17).

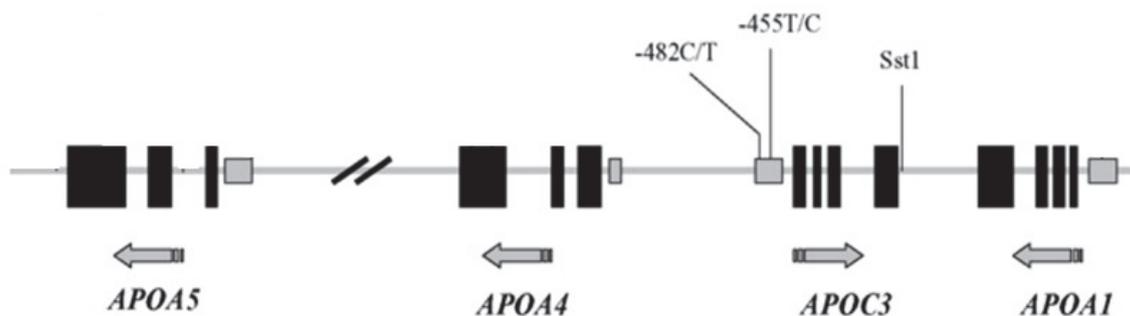


Figure 16 : Représentation du cluster contenant le gène *APOC3* - position 11q23, adaptée d'après (102)

Le gène *APOC3*, composé de 4 exons, code pour une petite glycoprotéine : l'apolipoprotéine C-III (ApoC-III) de 99 acides aminés (aa), puis de 79 aa après clivage du peptide signal, d'un poids moléculaire de 8.8 kDa. Elle est synthétisée principalement dans le foie, mais aussi dans l'intestin. Cette protéine est située à la surface des LRTG (CM et VLDL) mais également des HDL. Sa concentration plasmatique est de 10mg/dL. Cette protéine a été découverte par W. Virgil Brown en 1969 lors de l'analyse de la protéine VLDL (103,104).

L'ApoC-III est une protéine O-glycosylée, présente sous trois isoformes : ApoC-III-0 (aucun acide sialique sur le résidu thréonine en position 74), ApoC-III-1 (1 résidu d'acide sialique) et ApoC-III-2 (2 résidus d'acide sialique) (105).

De nombreux travaux confèrent un rôle majeur à l'ApoC-III dans le métabolisme des TG (106). Il existe une forte corrélation positive entre les concentrations plasmatiques de TG et le niveau d'expression d'ApoC-III. En effet, la surexpression d'*APOC3* est associée à une HTG comme le démontre un modèle de souris transgéniques (107,108). L'augmentation des taux sériques d'ApoC-III est associée à des concentrations de TG sériques élevées, à la résistance à l'insuline, au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires (109).

Une perte de fonction (modèle souris KO, mutation délétère chez l'homme...) engendre, inversement, une hypotriglycémie et un risque diminué de maladies cardiovasculaires de l'ordre de 40% (110,111). La diminution de la concentration d'ApoC-III réduit les concentrations de triglycérides de 56 à 86% chez les patients déficients en LPL. Ces résultats mettent en lumière le rôle central de l'ApoC-III en tant que régulateur clef du métabolisme des TG (112).

L'ApoC-III est une protéine hypertriglycémifiante avec des rôles à la fois extra-hépatiques et intra-hépatiques (Figure 17).

3.1.1. Régulation de la lipolyse

L'ApoC-III inhibe la lipolyse des VLDL et CM en diminuant l'activité de la LPL. Elle accélère son inactivation et accélérerait sa conversion de forme dimérique en forme monomérique. Son effet inhibiteur n'opèrerait pas dans des conditions normotriglycémiques (109). Elle inhiberait l'activité de la LPL par compétition avec sa liaison aux lipides, en déplaçant in vitro la LPL des gouttelettes lipidiques. Le mécanisme d'inhibition de la LPL par ApoC-III n'est pas complètement résolu. Aucune interaction directe LPL - ApoC-III n'a été démontrée, mais des données suggèrent que l'hélice C-terminale d'ApoC-III favoriserait l'inhibition de la LPL. Une étude a démontré cet effet en utilisant la tensiométrie huile-goutte permettant de caractériser la liaison d'ApoC-III aux interfaces lipides/eau, en présence ou non de 6 variants sur la protéine ApoC-III. Les variants étudiés portent sur les résidus suivants : Leu27, Val35, Trp42,

Phe47, Leu50, Trp54, Phe61, Phe64 et Trp65, l'alanine substitue les résidus aromatiques hydrophobes hautement conservés, et ceci altère la liaison lipidique de l'ApoC-III. La modification du résidu Trp42 a donné le résultat le plus critique pour la liaison des lipides, ce dernier améliore la rétention d'ApoC-III aux interfaces lipides/eau. Ainsi, les résidus aromatiques dans la moitié C-terminale d'ApoC-III seraient à l'origine de la liaison des lipoprotéines riches en TG. De plus, en absence de lipides, l'ApoC-III présente une faible teneur en hélice α , mais elle acquiert une teneur en hélice de 50 à 70% lors de la liaison aux lipides. La région N-terminale de l'ApoC-III (résidus 1-40), est incapable de se lier aux lipides et d'inhiber la LPL in vitro. En revanche, la région C-terminale (résidus 41-79) a montré une liaison significative aux vésicules lipidiques et inhibe l'activité LPL. Ces résultats indiquent que la partie N-terminale de l'ApoC-III se lie faiblement aux lipides en l'absence de la région C-terminale (hélice alpha amphipatiques riches en résidus aromatiques) et que la forte liaison lipidique de l'ApoC-III est essentielle pour l'inhibition de la LPL. Des essais in vitro ont montré qu'à une concentration fixe de LPL, l'ApoC-III inhibait la liaison à la LPL et l'activité sur les particules lipidiques d'une manière dose-dépendante. Ces résultats suggèrent que l'ApoC-III est en concurrence avec la LPL pour la liaison aux surfaces lipidiques et empêcherait l'accès de la LPL au substrat via notamment ses tryptophanes C-terminaux. En effet, la capacité de l'ApoC-III à rester liée aux lipides est altérée par les mutations C-terminales. La perte du contenu hélicoïdal, d'hydrophobie et de résidus aromatiques dans l'ApoC-III, modélisée par des mutations altère la capacité de l'ApoC-III à s'insérer dans les surfaces lipidiques. Ainsi, les résidus aromatiques, comme la phénylalanine et le tryptophane, sont parmi les résidus les plus hydrophobes et, dans les hélices α , se retrouvent souvent le long de la face non polaire. Cette face non polaire s'insère dans les surfaces lipidiques et s'associe aux chaînes des acides gras. L'hélice C-terminale de l'ApoC-III est riche en résidus aromatiques, avec 6 résidus aromatiques qui composent 75% de sa face non polaire et sont susceptibles d'interférer dans l'insertion de la protéine à la surface lipidique. L'augmentation de l'expression d'ApoC-III en cas d'HTG permet à l'ApoC-III de s'accumuler sur les lipoprotéines et d'inhiber la LPL en empêchant la liaison et / ou l'accès au substrat. En effet en cas d'HTG, les niveaux plasmatiques d'ApoC-III augmentent à plus de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et le pourcentage de lipoprotéines riches en TG passe de 20% à plus de 60%. Lors des hypertriglycémies, les surfaces des VLDL et des chylomicrons sont enrichies en ApoC-III (104,109,113).

De plus, l'ApoC-III favorise la clairance des apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines, notamment la clairance de l'ApoC-II, ce qui engendre une diminution de l'activation de la LPL par l'ApoC-II et une diminution du catabolisme des TG des VLDL et des CM.

L'ApoC-III inhibe également la recapture hépatique des VLDL, des IDL et des remnants de chylomicrons. En effet, la reconnaissance de ces lipoprotéines par les LRP et le récepteur ApoB/E est médiée par l'ApoE. L'ApoC-III déplaçant ApoE des lipoprotéines interfère dans leur liaison aux récepteurs hépatiques et inhibe ainsi la recapture hépatique (100,101,114-116).

3.1.2. Rôle intra-hépatique

L'ApoC-III joue un rôle intra-hépatique en favorisant l'assemblage et la sécrétion de VLDL. Elle promeut l'incorporation d'ApoB associée aux pré-VLDL, dans la voie de sécrétion du réticulum endoplasmique - appareil de Golgi, pour former des lipoprotéines riches en triglycérides matures (117).

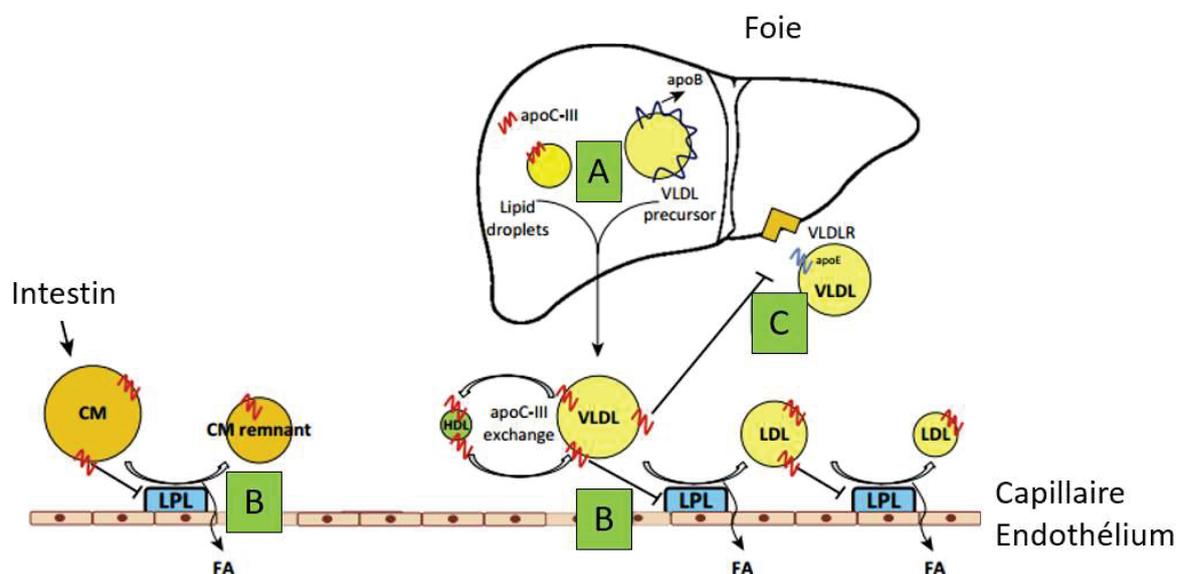


Figure 17 : Représentation du métabolisme des LRTG et du rôle de l'ApoC-III, adaptée d'après (118)

A ApoC-III favorise l'assemblage et la sécrétion des VLDL dans le foie ; B ApoC-III inhibe la LPL ; C ApoC-III inhibe la recapture hépatique des LRTG

L'HTG provient de deux mécanismes : une sécrétion accrue de LRTG et une altération de la clairance de ces lipoprotéines. Or, la clairance altérée des LRTG est liée à une augmentation des concentrations d'ApoC-III, régulateur clef du métabolisme des triglycérides. En effet, la voie de synthèse contribuerait seulement pour 20% de la variation des triglycérides plasmatiques. En revanche, la clairance hépatique expliquerait 50% de la variation des concentrations plasmatiques de TG (112).

L'apolipoprotéine C-III est une protéine à multiples facettes qui non seulement régule le métabolisme des triglycérides, mais participe également à la formation de lésions athéroscléreuses et à plusieurs autres processus pathologiques impliqués dans l'athérosclérose. Elle exerce son effet athérogène en accélérant les effets pro-inflammatoires. En effet, l'ApoC-III à la surface des lipoprotéines en activant les monocytes plasmatiques induit leur adhésion aux cellules endothéliales, ce qui entraîne une accélération dans la genèse d'athérosclérose. Egalement, ApoC-III favorise la prolifération des cellules musculaires lisses et altère l'activité plaquettaire (104,111).

De nombreuses études sur l'expression du gène *APOC3* ont montré que sa transcription est régulée de manière positive ou négative.

Le diabète et/ou un taux de glucose élevé augmentent l'expression d'ApoC-III. Le glucose favorise la transcription d'ApoC-III par la régulation positive du facteur nucléaire hépatique-4 (HNF-4) et le facteur de transcription ChREBP. Inversement, un traitement insulinique dans des modèles souris avec diabète insulino-dépendant induit une régulation négative dose-dépendante des niveaux d'ARNm de l'ApoC-III. L'expression de l'ApoC-III est inhibée par l'insuline, le peroxydase proliférateur-activated récepteur α (PPAR) et le farnésoid X receptor (FXR). Le PPAR α diminue l'expression du gène *APOC3* via la régulation de HNF-4. Ce mécanisme peut également expliquer l'effet de certains médicaments hypolipidémifiants comme les fibrates (antagoniste de PPAR α) dans l'abaissement de la concentration plasmatique d'ApoC-III. En outre, le co-activateur de PPAR γ -1 β (PGC-1 β) est un co-activateur de la transcription régulée par les acides gras libres du plasma. Des données ont montré que PGC-1 β pouvait entraîner une hypertriglycéridémie par stimulation de l'expression du gène *APOC3*. L'insuline et le glucose affecte l'expression d'ApoC-III via son promoteur. Ainsi, la régulation de

l'expression d'ApoC-III pourrait jouer un rôle majeur dans l'induction de l'HTG dans les cas d'insulino-résistance (104,109,111).

Les statines, médicaments hypolipémiants inhibiteurs de l'HMG-coA réductase et augmentant le nombre de récepteurs LDL à la surface des hépatocytes, jouent un rôle dans la régulation plasmatique d'ApoC-III. Des études ont montré que les statines inhibaient non seulement la synthèse d'ApoC-III et la transcription du gène mais aussi diminuaient le processus d'adhésion vasculaire des monocytes activés par ApoC-III (111).

Une étude a suggéré que l'ézétimibe, médicament hypolipémiant inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol, pourrait abaisser les concentrations d'ApoC-III et de TG plasmatiques via un mécanisme inconnu (104).

L'inhibition de l'ApoC-III, protéine hypertriglycéridémiant, est à la base d'une nouvelle thérapeutique contre les HTG. Des oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm du gène *APOC3* sont testés dans des essais cliniques de phase III dans l'HTG majeure, en effet ils permettent la capture sélective de l'ARNm de l'ApoC-III dans l'hépatocyte (chargé positivement) via des nanoparticules de zéolite qui sont chargées négativement. Une étude clinique de phase II a montré que ces ASO étaient efficaces pour des patients atteints de FCS ayant différentes concentrations de TG au départ de l'étude. L'administration d'ISIS-APOCIIIIRx chez trois patients atteints d'hyperchylomicronémie familiale, dont les concentrations de TG variaient de 15,9 mmol/L à 23,5 mmol/L traités à la dose de 300 mg par voie sous-cutanée une fois par semaine pendant 13 semaines, pouvait réduire les concentrations plasmatiques d'ApoC-III de 71% à 90% et les concentrations plasmatiques de TG de 56% à 86%. Tous les patients ont montré une réduction de TG malgré une activité LPL inférieure à 5%(4,53,54,104,107,111,119,120).

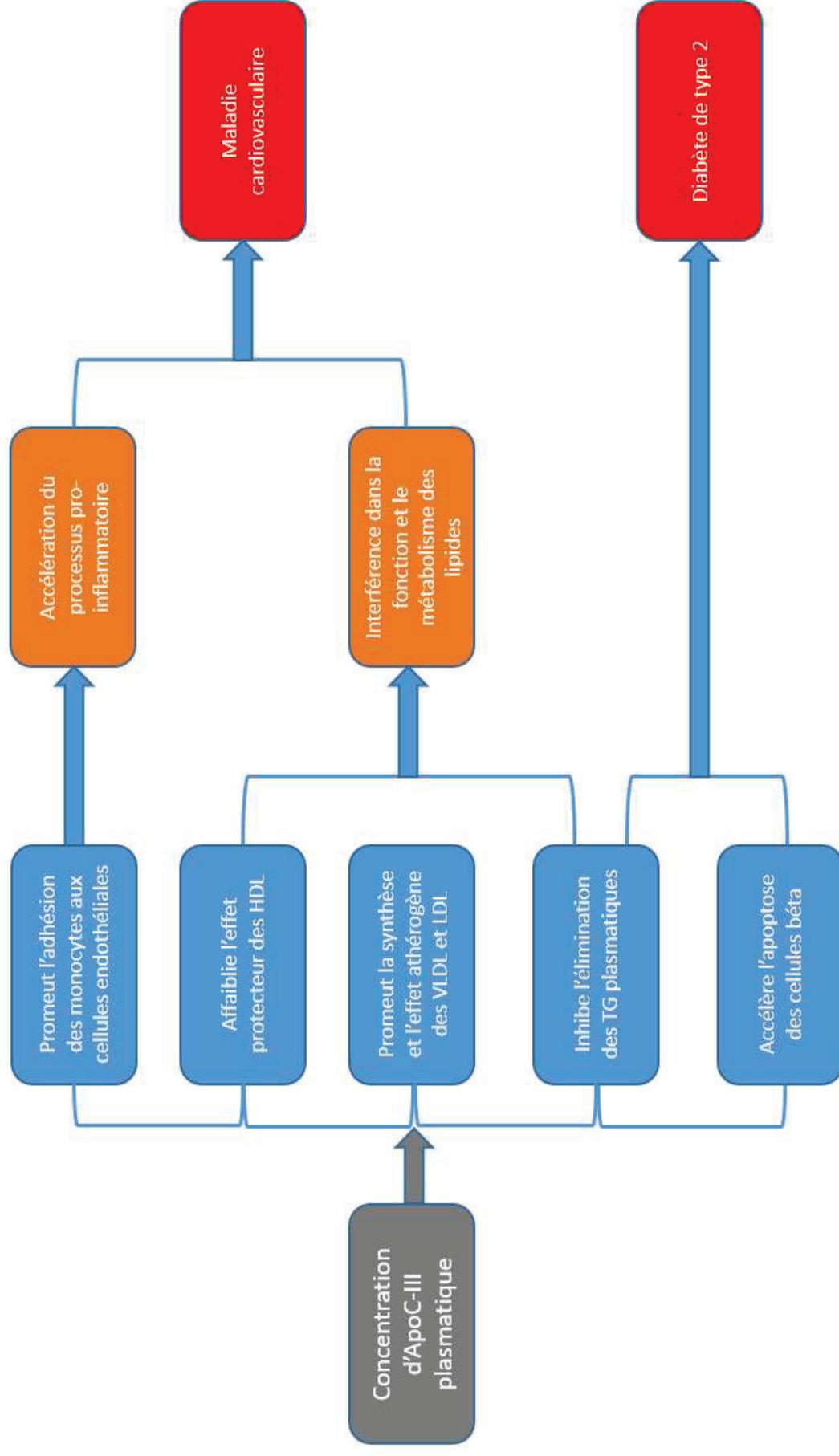


Figure 18 : Impact de la concentration plasmatique de l'ApoC-III sur le métabolisme des TG, le diabète et les maladies cardiovasculaires, adapté d'après (104)

3.2. Mutations délétères d'*APOC3* induisant une hypotriglycémie

3.2.1. Mutations codantes

Plusieurs mutations délétères induisant des pertes de fonction du gène *APOC3* ont été décrites. Ces mutations sont rares, et sont cardioprotectrices. Cet effet a été montré dans une étude sur la population générale du Danemark (75725 individus) ; les porteurs hétérozygotes de mutations délétères ont une concentration en TG diminuée de 44% ($p < 0.001$) et une incidence de coronaropathie diminuée d'environ 40% comparés aux sujets non porteurs de mutations sur le gène *APOC3* (Tableau 8) (121).

Exon	Variant	Protéine	Rs issu de NCBI	Données	Référence
Exon 2	c.28G>A	p.Ala10Thr	rs150821374		(122)
Exon 2	c.55C>T	p.Arg19Ter	rs76353203	Très rare dans la population générale, (fréquence allélique de 0.08%) engendrerait une perte d'environ 50% du taux de TG	(104,123)
Exon 3	c.127G>A	p.Ala43Thr	rs147210663	Fréquence de 0.28%	(104,124)
Exon 4	c.193G>A	p.Asp65Asn	rs149707394		(122)
Exon 4	c.232A>G	p.Lys78Glu	rs121918382	Associée à une réduction de 30-40% d'Apo-CIII circulante	(114)
Exon 4	c.280A>G	p.Thr94Ala	rs121918381	Provoquant des perturbations de la O-glycosylation d' <i>APOC3</i> , engendrerait un profil lipidique normal ; la O-glycosylation n'affecterait pas la fonction d'Apo-CIII	(114)

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des mutations codantes sur le gène *APOC3* induisant une perte de fonction d'ApoC-III

3.2.2. Mutations introniques, de sites d'épissages de l'APOC3

Variant	rs issu de NCBI	Données	Référence
c.-13-2G>A	rs373975305	Très rare, diminue la concentration en TG d'environ 17% (p=0.06) et diminue significativement la concentration d'ApoC-III d'environ 70% (p=0.003)	(125)
c.55+1G>A ou IVS2 + 1G → A	rs138326449	Fréquence allélique de 0.1% dans la population générale (données 1000 Genomes) elle diminue la concentration en TG significativement d'environ 60% (p=0.007), mutation perte de fonction	(104, 125,126)
c.179+1G>T ou IVS3 + 1G → T	rs140621530	Fréquence allélique de 0.1% dans la population générale (données 1000 Genomes) la concentration en TG est diminuée d'environ 39% chez les porteurs comparés aux non porteurs, mutation perte de fonction	(104,122)

Tableau 9 : Mutations introniques délétères retrouvés sur le gène APOC3

3.3. Variants associés à une hypertriglycémie

3.3.1. Variants situés dans le promoteur

Deux polymorphismes situés dans la région promotrice du gène APOC3 en position c.-528T>C et c.-501C>T (rs2854117 et rs2854116) plus communément dénommés -482C>T et -455T>C correspondent à un élément de réponse à l'insuline. En effet en présence d'insuline la séquence sauvage est inhibée alors qu'en présence des variants l'inhibition est levée. Ils sont assez fréquents (environ 40%) et semblent être en déséquilibre de liaison avec d'autres variants d'APOC3 et du cluster de ce gène (108,110,113).

3.3.2. Variants situés dans la région codante

Le SNP c.102T>C p.Gly34=, rs4520 est localisé dans l'exon 3 et correspond à une substitution d'une thymine en une cytosine à la position 102 du gène *APOC3*. C'est une mutation silencieuse avec une glycine au codon 34 qui reste inchangée. L'allèle rare T a une fréquence allélique de 23% dans la population européenne (données 1000 Genomes). Elle est plus communément connue sous l'appellation -1100C>T. L'allèle mineur de ce variant est associé à une augmentation des TG (127,128) comme le montre une étude sur la cohorte Stanislas sur 782 hommes sains $p < 0.001$ (129) ou encore une étude sur 315 sujets sains islandais, la présence de l'allèle T est liée à une augmentation de 9 à 20% de la concentration en TG ($p = 0.004$) (130). L'allèle rare est également associé à une augmentation de concentration d'ApoC-III. Cette dernière augmentation est le plus souvent retrouvée chez les hommes notamment dans l'étude de la cohorte Stanislas (131). La fonctionnalité de cette mutation codante silencieuse reste non expliquée.

3.3.3. Variants associés à une hypertriglycémie situés dans la région 3'UTR

3.3.3.1. Le variant SstI

Le variant c*40G>C ou SstI, rs5128 est situé dans la région 3' non codante (3'UTR) du gène *APOC3*, et fut le premier polymorphisme découvert sur le gène *APOC3* (104). La région 3'UTR correspond à la région de l'ARNm située en aval du codon stop. Cette région est transcrite en ARNm. Bien que non traduite en protéine elle peut influencer l'expression du gène par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Pour le gène *APOC3*, la région 3'UTR représente une séquence de 187 paires de bases en aval du codon stop. Le polymorphisme SstI (rs5128, allèle mineur S2) est le résultat d'une substitution d'une cytosine (C) en une guanine (G) à la position 40 (c*40G>C) et crée un site pour l'enzyme de restriction SstI d'où son nom. La fréquence allélique du variant rare S2 dans la population générale caucasienne est d'environ 10%.

De nombreuses études ont montré une association étroite entre les concentrations plasmatiques élevées de TG et la présence de SstI (104,115,116,132). Certaines études, peu nombreuses, sont contradictoires (102,132,133). L'association SstI-TG a été confirmée récemment dans une méta-analyse. Cette analyse regroupe 42 études incluant un total de 23846 sujets et montre que les porteurs de S2 ont des concentrations plus élevées d'ApoC-III $p < 0.00001$ et de TG $p < 0.00001$ (100).

Les études contradictoires, qui ont montré que l'effet sur les TG n'était pas dû à la présence de SstI, suggèrent que cette association aux TG serait liée à la présence d'autres polymorphismes en déséquilibre de liaison avec SstI situé sur le gène *APOC3* dont les polymorphismes du promoteur (116,132) ou plus à distance dans le cluster (134). Cependant, plusieurs études ont démontré l'effet propre de SstI sur les TG en analysant l'association S2-TG dans leurs cohortes de patients considérant différents haplotypes (135,136).

Par ailleurs le variant S2 est associé au risque de maladies cardiovasculaires dans une étude GWAS (Genome-Wide Association Study) (104,137).

L'allèle rare S2 est associé à des concentrations plasmatiques plus élevées d'ApoC-III (6,85,105,138,139). Le mécanisme moléculaire induisant une élévation de la concentration en ApoC-III n'est pas encore élucidé. Cependant, une étude suggère que ce pourrait être dû à une stabilisation de l'ARNm d'*APOC3* chez les porteurs de l'allèle S2. En effet, l'expression d'ARNm d'*APOC3* hépatique est augmentée dans 3/5 biopsies hépatiques humaines de patients hétérozygotes S2 (140).

L'association du variant SstI à la triglycémie modérée ou sévère reste donc encore inexpliquée.

3.3.3.2. Le variant BbvI

Le variant c*71G>T, rs4225, allèle mineur B2, est peu décrit dans la littérature, il est le résultat d'une substitution d'une thymine (T) en une guanine (G) qui engendre la création du site de l'enzyme de restriction BbvI d'où son nom. SstI est en déséquilibre de

liaison avec BbvI (140), mais BbvI seul ne semble pas affecter la concentration en TG (133). Il a une fréquence d'environ 45% dans la population européenne (données 1000 Genomes) (141).

Les données de la littérature divergent sur l'association du variant B2 à la triglycéridémie. Une étude portant sur 55 hommes allemands avec une hyperlipémie combinée familiale (dyslipidémie mixte avec HTG) comparés à 306 hommes sains allemands, a montré que la fréquence allélique de B2 est significativement plus fréquente dans la population de cas comparée à la population contrôle (52% vs 35% $p < 0.005$) (128). Les résultats d'une autre étude portant sur 512 patients ayant une maladie artérielle coronaire, montre que BbvI est significativement associé aux TG (142). Cependant cette association n'est vraie qu'en analyse univariée. Une autre étude sur une population du Minnesota portant sur 45 cas HTG et 46 cas contrôles présente une différence significative concernant la présence de l'allèle B2 entre les deux populations (83.3% chez HTG vs 56.5% chez groupe contrôle, $p < 0.001$), mais ne présente pas de différence significative pour le variant SstI (133). Cependant dans d'autres études la fréquence allélique de BbvI n'est pas associée aux TG. Comme dans une étude portant sur 337 patients sains chinois ayant une fréquence allélique pour BbvI de 77% (143). De même dans une autre étude portant sur une population française ayant une fréquence allélique de BbvI d'environ 40% (141). Une autre étude montre les mêmes résultats : la fréquence allélique de B2 est de 40.7% chez HTG vs 41.7% chez NTG ; et l'allèle B2 n'est pas associé significativement aux TG (144). Cependant dans cette étude le variant SstI n'est également pas associé aux TG. Cette étude portait sur une population asiatique (taiwanais 165 cas HTG versus 163 contrôles), population dans laquelle la fréquence allélique du variant rare SstI est beaucoup plus élevée par rapport à la population caucasienne (fréquence de SstI : 34%, de BbvI : 27% pour la population asiatique - données 1000 Genomes contre 12.4 % pour SstI et 39.3 % pour BbvI dans la population caucasienne).

Aucune étude n'a porté sur la fonctionnalité de l'allèle rare B2.

L'existence de variants de la 3'UTR associés à la triglycéridémie suggère un rôle possible dans cette région dans la régulation de la triglycéridémie en modulant les concentrations d'ApoC-III (84). Cette région permettrait des mécanismes de régulation

post-transcriptionnelle au niveau de l'ARNm, avec des implications notamment dans son transport nucléo-cytoplasmique, sa localisation et sa stabilité, ainsi que sur l'efficacité de la traduction. Cette régulation peut être médiée par des microARN qui se fixent sur cette région afin de moduler l'expression des protéines. Ainsi nous nous sommes intéressés comme nous le verrons plus loin à une possible interaction entre microARN et variants de la région 3'UTR d'*APOC3*.

4. Rôle du Lipase Maturation Factor 1 (Lmf1) dans le métabolisme des TG

4.1. Découverte du gène *LMF1* et rôles physiologiques

Le gène *LMF1* (NM_022773.2) est situé sur le bras court du chromosome 16 chez l'homme. Il est composé de 11 exons et d'une région 3'UTR de 898 nucléotides. Il code pour une protéine transmembranaire du RE de 567 acides aminés et de 65kDa : Lmf1 (145,146).

Ce gène *LMF1* fut découvert en 1983 chez des souris portant une mutation *cld* (combined lipase deficiency) récessive. L'allèle *cld* engendre la création d'une protéine Lmf1 tronquée dans sa partie C-terminale qui correspond à environ 60% de la longueur de la protéine originelle (146). Ces souris présentent un défaut d'activités de la LPL et LH (lipase hépatique) (147). Les souris homozygotes *cld/cld* semblent normales à la naissance, cependant elles meurent dans leurs deux-trois premiers jours de vie après l'introduction de l'alimentation, des suites d'une hyperchylomicronémie majeure (146-148). Ces souris homozygotes deviendront par la suite des modèles de souris HTG.

Des études conduites dans les années 2006-2007 vont montrer que la mutation *cld* entraîne une accumulation de lipases inactives agrégées et retenues dans le réticulum endoplasmique (RE) (148,149). Les souris *cld* sont donc affectées par la déficience d'un facteur nécessaire à l'expression des lipases sous forme homodimériques actives (148,149). L'activité de la lipase endothéliale (EL) est également diminuée comme le montre des études fonctionnelles *in vitro*, cependant l'activité de la lipase pancréatique reste inchangée (Figure 20) (150).

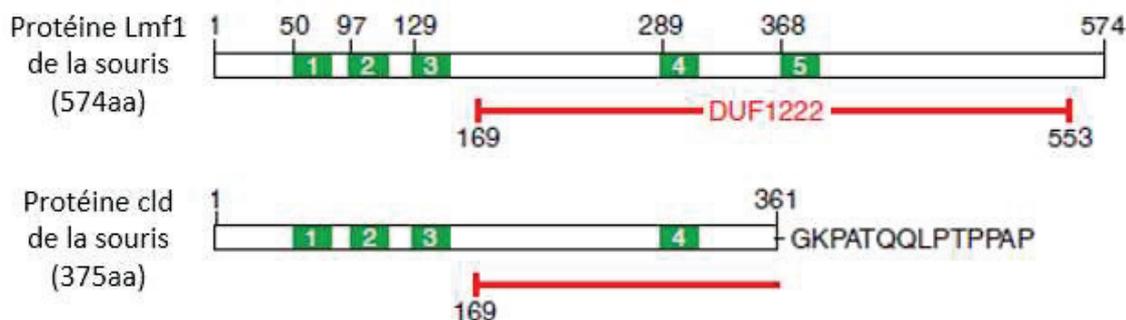


Figure 19 : Représentation de la protéine Lmf1 chez la souris et de la protéine cld, adaptée d'après (148)
 Les régions schématisées en vert représentent les domaines transmembranaires

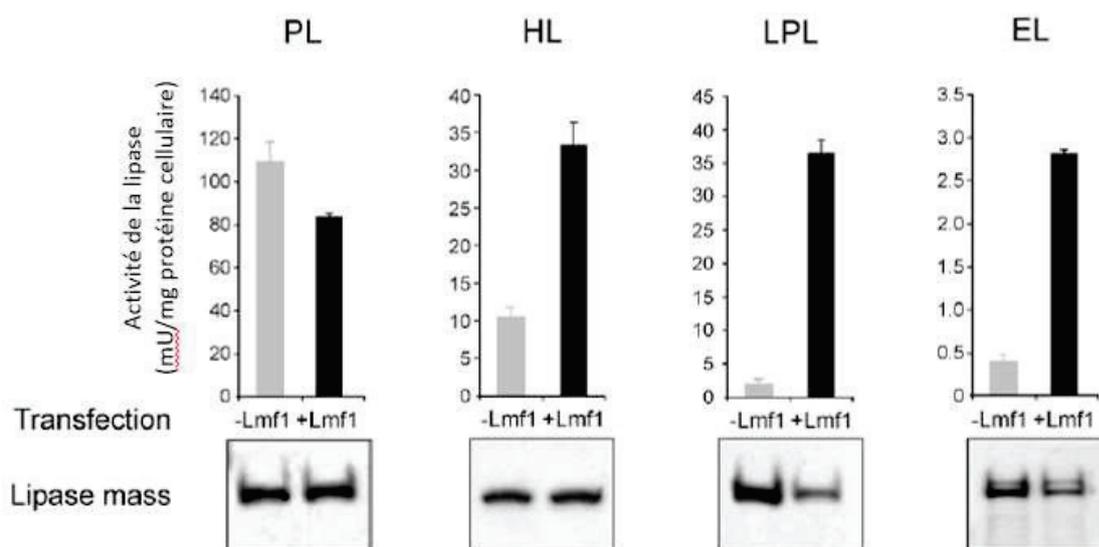
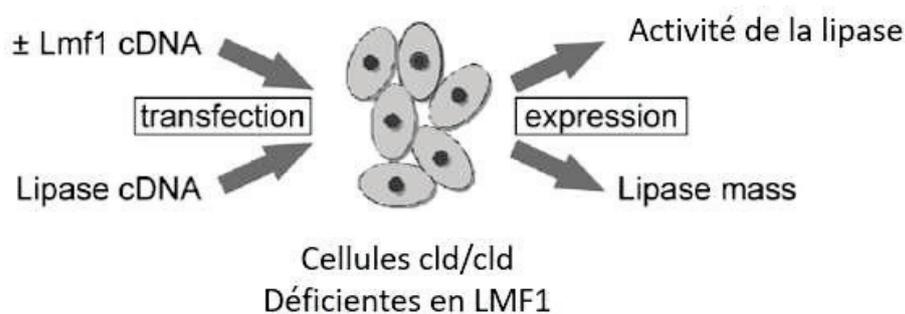


Figure 20 : Représentation de l'activité des lipases après co-transfection de l'ADNc de LMF1 et de LPL dans des cellules déficientes en LMF1, cellules de souris cld/cld, adaptée d'après (150)

Cependant la lipase pancréatique est active uniquement sous forme monomérique contrairement aux autres lipases : LPL, LH, LE, ce qui apporte une confirmation indirecte du rôle électif de *LMF1* sur l'homodimérisation des lipases. De plus, dans les tissus et cellules homozygotes pour la mutation cld les concentrations en protéines et ARNm de la LPL sont normales ce qui est en faveur de l'hypothèse d'une perte de fonction de l'activation post-transcriptionnelle des lipases en présence de cld (151,152). Après transfection dans des cellules déficientes en *LMF1*, la protéine Lmf1 restaurerait l'activité des lipases ce qui confirme son rôle clef dans l'activation des lipases (Figure 20). Le facteur correspondant à cette activation était dénommé le facteur Tmem112, correspondant au gène ayant la mutation cld. Celui-ci sera par la suite communément appelé *LMF1* pour lipase maturation factor 1 (148,149). Des modèles de souris transgéniques montrent que la surexpression de Lmf1 augmente l'activité spécifique de la LPL sans faire varier sa concentration. Ce qui confirme l'hypothèse que l'expression de Lmf1 est un facteur post-transcriptionnel déterminant pour l'activité de la LPL. Ces études montrent également que des variations d'expression génomique de *LMF1* modulent l'activité de la LPL in vivo après stimulation héparinique chez des souris transgéniques (153). Egalement des souris hétérozygotes *LMF1* partiellement déficientes présentent une activité LPL diminuée après activation post-héparinique (152).

Dans les adipocytes, en conditions physiologiques, environ 75% de la LPL nouvellement synthétisée est convertie en enzyme active. Le reliquat stagne dans le RE sous forme inactive, s'agrège et sera dégradé (151). La chaperonne des lipases : Lmf1 est un facteur critique de ce processus d'activation et joue donc un rôle de régulateur post-transcriptionnel pour les lipases (152,153).

L'ARNm de Lmf1 est exprimé de façon ubiquitaire, contrairement à la LPL. Ce qui suggère que Lmf1 aurait possiblement un autre rôle non connu à ce jour (Figure 21) (148).

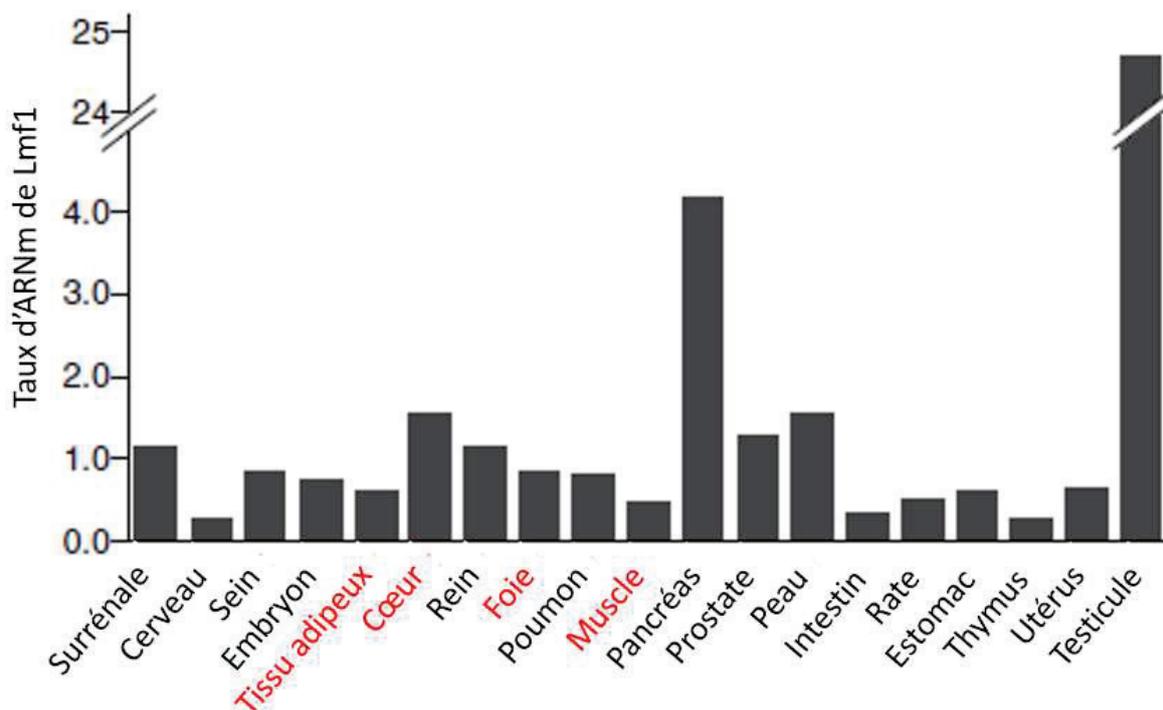


Figure 21 : Représentation du taux d'ARNm de Lmf1 dans différents tissus, adaptée d'après (148)
Tissus notés en rouge expriment des concentrations significatives de LPL

4.2. Structure de la protéine Lmf1

Environ 70% de la séquence de Lmf1 est composée d'un domaine très conservé au cours de l'évolution, sa fonction reste inconnue, c'est le domaine DUF1222 de la base de données Pfam (8). Le domaine DUF1222 est essentiel pour la maturation des lipases (151). Il correspond à la ligne grise plus épaisse sur la figure 22 et représente environ 65% de la protéine totale. Cette région DUF1222 est retrouvée dans la séquence de 50 protéines différentes dans différentes espèces. Le modèle cld présente une région DUF1222 tronquée de 214 acides aminés (154).

Lmf1 est composée de 5 régions transmembranaires la divisant en six domaines. Trois domaines solubles sont situés dans le cytoplasme : la région N terminale, les boucles B et D. Et trois autres sont orientés dans la lumière du RE : les boucles A et C et le domaine C terminal ayant un site de glycosylation au niveau du résidu 430. Lmf1 interagit physiquement avec les lipases au niveau de la boucle C située dans la séquence DUF1222. Ce site d'interaction avec la lipase n'est fonctionnel qu'en présence de la longue séquence C-terminale induisant la maturation des lipases (Figure 22) (151,155).

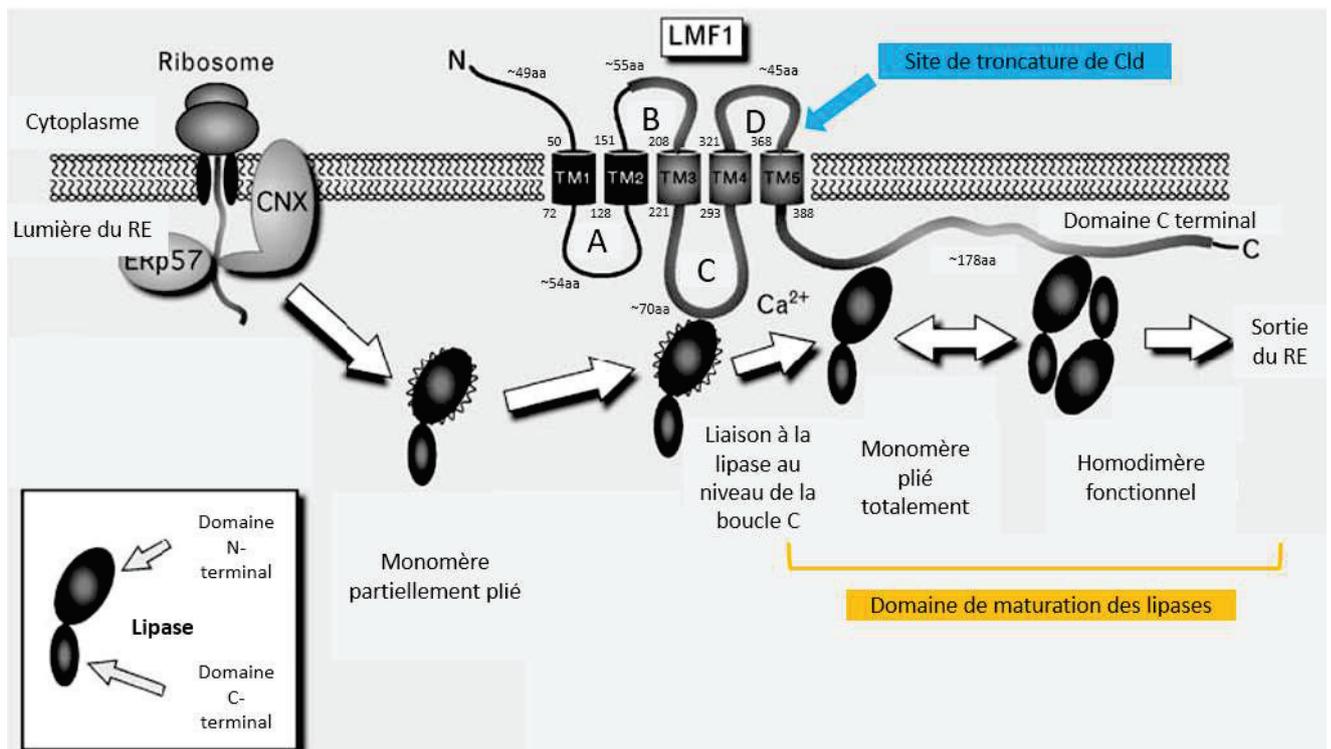


Figure 22 : Représentation de *Lmf1* et de son interaction avec les lipases, adaptée d'après (8,145,151)

Cependant des études induisant une troncature de la partie N terminale de *Lmf1* montrent que ce domaine est également nécessaire pour la maturation de la LPL. Chaque molécule de *Lmf1* promeut la maturation de plus de 50 molécules de LPL (155).

Une équipe a mis au point un modèle de souris null-*LMF1* où le gène est complètement éteint, dans cette étude les souris meurent au stade embryonnaire, le modèle est donc létal, ce qui suggérerait un rôle primordial de *Lmf1* dans le développement embryonnaire (146).

Un paralogue du gène *LMF1* a été identifié il s'agit de *LMF2* situé sur le chromosome 15, aussi connu sous le terme *Tmem153*. Cette protéine possède 42% d'homologie en acides aminés avec *Lmf1* et possède également le domaine DUF1222 en C-terminal. Ce dernier ne restaure pas l'activité LPL selon les résultats de tests fonctionnels in vitro, il serait donc impliqué dans la maturation d'autres protéines (148).

Ainsi, Lmf1 est une protéine chaperonne du RE jouant un rôle essentiel dans la maturation post-transcriptionnelle des lipases lors de l'assemblage de leurs monomères inactifs et/ou dans la stabilisation de leur structure homodimérique permettant l'activation catalytique des lipases vasculaires : la LPL, la LH et la LE (8). En effet les formes monomériques de certaines lipases semblent être instables et Lmf1 permettrait de lier et stabiliser les formes homodimériques (Figure 20) (8). Lmf1 est donc un facteur important de maturation d'une famille spécifique de protéines : les lipases dans le RE (148).

4.3. Variants de *LMF1* associés à une hypertriglycémie

Trois mutations homozygotes non-sens sur ce gène ont été décrites dans la littérature comme délétères. Elles induisent une troncature de la partie C terminale de la protéine engendrant une diminution d'activation de la LPL celle-ci ne pouvant atteindre le site d'interaction situé au niveau de la boucle C. On observe une troncature partielle du domaine DUF1222, ce qui est retrouvé chez les souris cld. Nous sommes en présence d'une altération de l'activité de Lmf1 dans la maturation des lipases. Ces mutations entraînent chez l'homme des HTG sévères (>2500 mg/dl) avec des pancréatites répétitives associées à une déficience en lipase combinée. Ce qui souligne le rôle critique de Lmf1 dans l'homéostasie lipidique (156).

4.3.1. La mutation Y439X (*LMF1*, Exon 9 c.1317C>G, p.Tyr439Ter, rs121909397)

En présence de la mutation Y439X (*LMF1*, Exon 9 c.1317C>G, p.Tyr439Ter, rs121909397), la protéine Lmf1 est tronquée de 127 acides aminés dans sa partie C terminale engendrant la perte complète d'activité de Lmf1 d'après des études in vitro co-transfectant un plasmide contenant la séquence mutée de Lmf1 dans des cellules cld/cld

avec une construction LPL. L'activité de la LPL fut mesurée dans le lysat cellulaire et dans le milieu de culture (148).

Le patient décrit avec cette mutation présente une hyperchylomicronémie sévère avec une forte concentration en TG comparée à des contrôles, des pancréatites répétitives même sous régime strict accompagnées de xanthomes tubéreux et de lipodystrophies. L'activité de la LPL est diminuée de 93% dans le plasma, et l'activité de la LH est abaissée de moitié (Figure 23) (148).

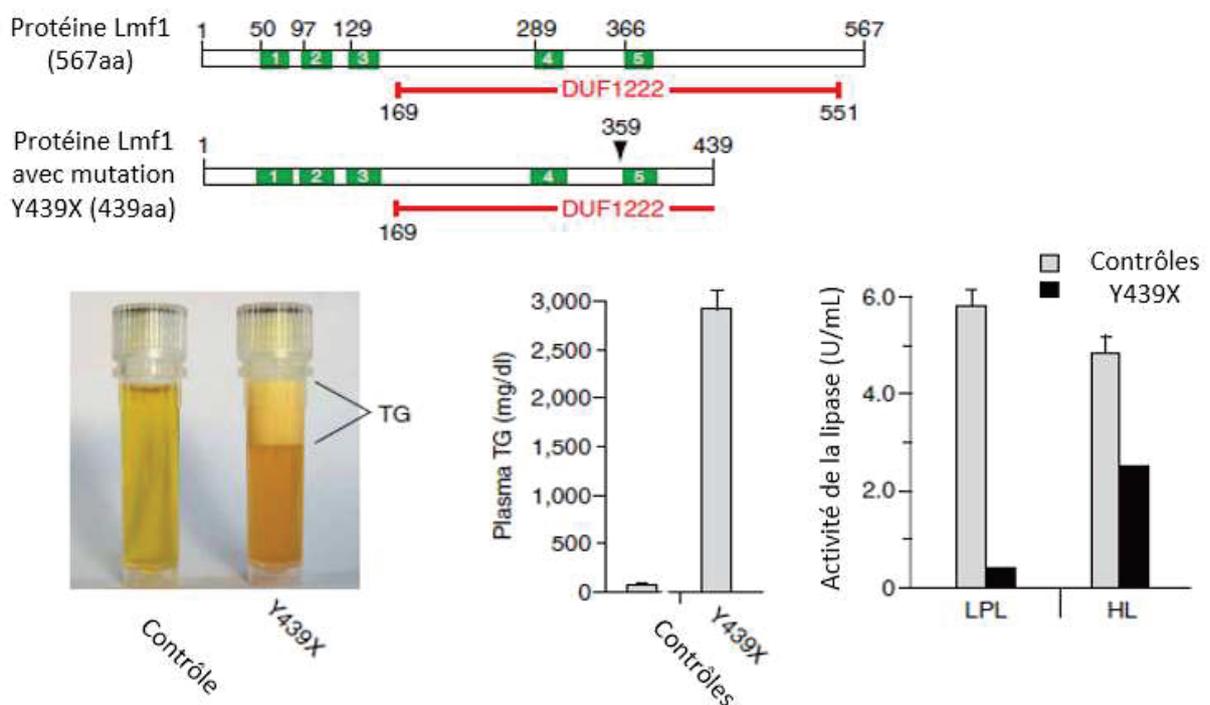


Figure 23 : Représentation de la troncature Y439X sur la protéine Lmf1 retrouvée chez un patient, adaptée d'après (148)
En vert sont représentés les domaines transmembranaires, le résidu 359 correspond à la troncature cld, puis mesure des concentrations plasmatiques des TG chez ce patient et de son activité en lipases après injection d'héparine comparées à des contrôles

4.3.2. La mutation W464X (LMF1, Exon 9 c.1391G>A, p.Trp464Ter, rs587777626)

En présence de la mutation W464X (LMF1, Exon 9 c.1391G>A, p.Trp464Ter, rs587777626), la protéine Lmf1 est tronquée de 102 acides aminés dans sa partie C

terminale. Le patient présente une hyperchylomicronémie sévère avec une forte concentration en TG comparée à des contrôles, des pancréatites récidivantes mais une bonne réponse aux traitements. Le fils de ce patient hétérozygote pour la mutation présente une concentration en TG normale (157).

Une étude montre que l'activité post-héparinique des phospholipases est diminuée de plus de 95% chez le porteur homozygote W464X comparée à des contrôles (150). L'activité de la LPL est diminuée de 76% dans le plasma et sa masse de 50% comparée à des contrôles normolipidémiques (157).

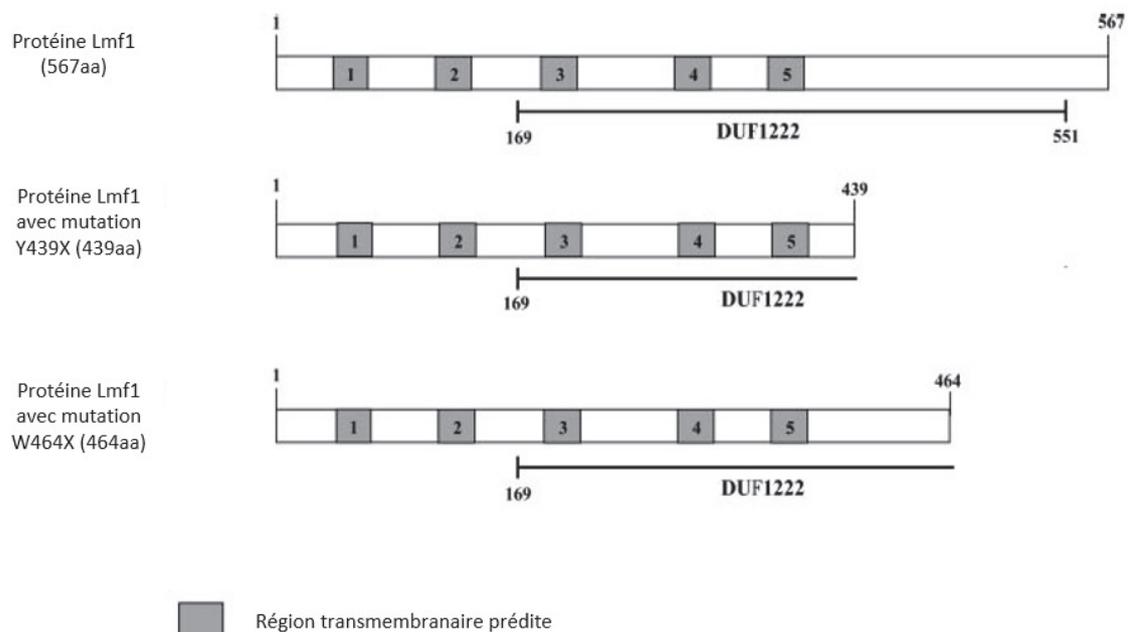


Figure 24 : Représentation des deux mutations délétères décrites sur LMF1, adaptée d'après (157)

4.3.3. La mutation Y460X (LMF1, Exon 9 c.1380C>G, p.Tyr460Ter)

Y460X (*LMF1*, Exon 9 c.1380C>G, p.Tyr460Ter), nouvelle mutation homozygote non-sens, a été décrite récemment. C'est la troisième mutation homozygote décrite comme délétère sur le gène *LMF1*. Elle a été retrouvée chez un patient âgé de 54 ans, d'indice de masse corporelle normal, présentant une HTG sévère ([TG]=28.2 mmol/L), découverte à l'âge de 41 ans chez ce patient. Le traitement diététique mis en place fut faiblement efficace entraînant une fluctuation des concentrations des TG chez ce patient. Il n'a pas

présenté de splénomégalie, ni de lipémie rétinienne, ni de xanthomes tubéreux, ni de lipodystrophie, ni de pancréatite. L'étude familiale de ce patient rapporte deux sœurs porteuses homozygotes de la mutation Y460X. Ces dernières présentent des concentrations moyennes à modérées en TG. Ses trois enfants porteurs hétérozygotes présentent des concentrations normales en TG. Ces données suggèrent une variabilité de pénétrance selon les porteurs, et confirment l'hérédité autosomique récessive de la déficience en Lmf1. Il sera intéressant de suivre ces différents porteurs hétérozygotes de la mutation Y460X afin de voir s'ils développeront une HTG en présence de facteurs secondaires comme le diabète ou l'alcoolisme (158).

4.4. Autres variants retrouvés sur le gène *LMF1*

LMF1 n'est pas associé avec la variabilité de la triglycéridémie en population générale dans des études GWAS, cependant quelques études montrent des variants associés à une HTG. Des tests fonctionnels ont été réalisés pour certains variants de *LMF1* en analysant l'impact de leur présence sur l'activité de la LPL in vitro (Figure 25).

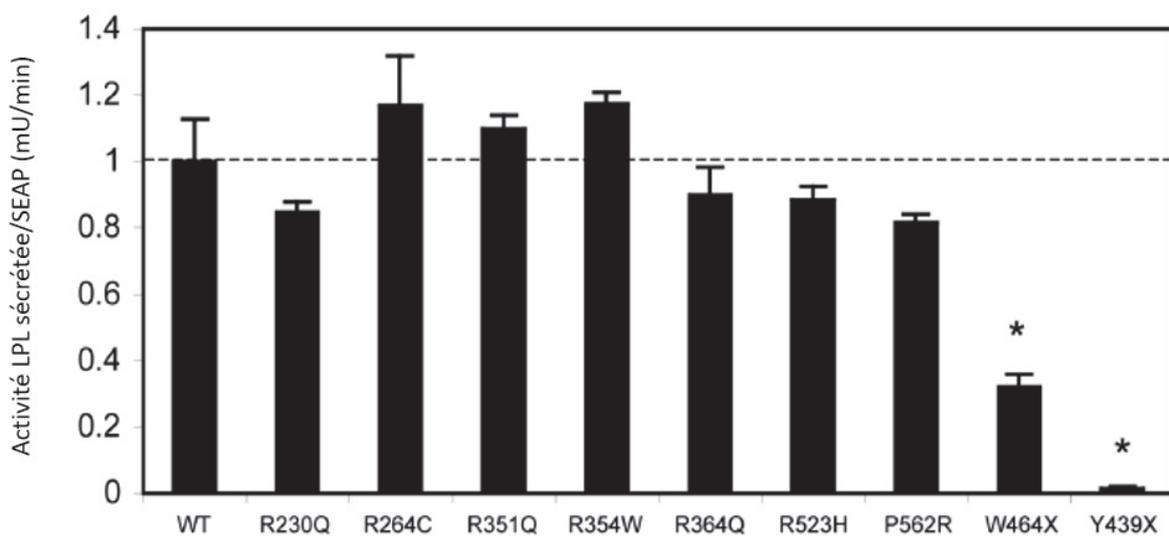


Figure 25 : Représentation de l'analyse fonctionnelle de différents variants retrouvés sur le gène *LMF1*, adaptée d'après (3)

Ce test fonctionnel utilisant le modèle cellulaire hépatocytaire de souris *cld* après co-transfection de LPL et *LMF1* présentant différents variants retrouvés dans une population de 86 patients HTG comparés à des contrôles (327), seulement trois variants : R230Q, R264C et R523H n'ont pas été retrouvés dans la population contrôle, tous ces variants ne sont pas associés à une diminution de l'activité de la LPL d'après ce modèle.

Exon	Variant	Protéine	rs issu de NCBI	Données	Référence
Exon 1	c.107G>A	p.Gly36Asp	rs111980103	Même fréquence dans la population contrôle	(3,64)
Intron	c.194-168A>G		rs3829491	Associé à une diminution d'activité LPL	(153)
Intron	c.194-28T>C		rs3751666	Associé à une diminution d'activité LPL, $p < 0.001$, à la concentration en TG plasmatique $p = 0.03$ et en HDL-cholestérol $p = 0.01$	(153)
Exon 2	c.205C>T	p.Leu69Leu	rs201960545	Variant silencieux, plus fréquent dans la population HTG $p = 0.017$, modifierait le site d'épissage	(64,156)
Exon 2	c.234C>G	p.Leu78Leu	rs149929337	Plus fréquent dans la population contrôle	(64)
Exon 2	c.237C>T	p.Ile79Ile	rs141010394		(64)
Exon 2	c.302G>C	p.Arg101Thr	rs147688306		(64)
Exon 2	c.364A>G	p.Met122Val			(64)
Exon 2	c.411G>A	p.Ser137Ser	rs117150036		(64)
Exon 2	c.417C>T	p.Phe139Phe	rs139825245		(64)
Exon 2	c.418G>A	p.Val140Ile	rs554812625		(70)
Exon 4	c.540G>A	p.Thr180Thr	rs2277892		(153)
Exon 4	c.543G>A	p.Gly181Gly	rs2277893		(153)
Souris	542G>A	p.Gly181Glu		Variant chez la souris associé à une activité LPL diminuée	(154)
Intron	c.664-35T>C		rs4984705		(153)
Exon 5	c.684G>A	p.Gly228Glu	rs7547772870	Même fréquence dans la population contrôle	(64)
Exon 5	c.689G>A	p.Arg230Gln	rs192224688		(3)
Exon 5	c.703C>A	p.Leu235Ile			(70)
Exon 6	c.790C>T	p.Arg264Cys			(3)
Exon 6	c.799C>T	p.Leu283Leu	rs367643755		(64)
Exon 6	c.861G>A	p.Ala287Ala	rs61740409	Plus fréquent dans la population contrôle	(64)
Exon 7	c.976G>A	p.Ala326Thr	rs769766473	Même fréquence dans la population contrôle	(64)
Exon 7	c.1052G>A	p.Arg351Gln	rs192520307	Même fréquence dans la population contrôle dans l'étude (64)	(3,64)
Exon 7	c.1060C>T	p.Arg354Trp	rs143076454	Même fréquence dans la population contrôle	(3,64,156)
Exon 8	c.1091G>A	p.Arg364Gln	rs35168378	Retrouvé dans la population contrôle	(3,64,156)
Exon 8	c.1206C>T	p.Ile402Ile	rs745593906		(64)
Exon 9	c.1264C>T	p.Gln422Ter			(64)
Exon 9	c.1351C>T	p.Arg451Trp	rs138205062		(64)
Exon 9	c.1405G>A	p.Ala469Thr	rs181731943		(64)

Exon 10	c.1473C>T	p.Asp491Asp	rs62012416	Plus fréquent dans la population contrôle	(64)
Exon 10	c.1476C>T	p.Ala492Ala	rs142258761		(64)
Exon 10	c.1558A>T	p.Lys520Ter			(70)
Exon 10	c.1565G>T	p.Ser522Ile			(64)
Exon 11	c.1568G>A	p.Arg523His	rs151137167		(3)
Exon 11	c.1584C>T	p.His528His	rs560030260	Même fréquence dans les deux populations	(64)
Exon 11	c.1594G>C	p.Glu531Asp	rs190958016		(64)
Exon 11	c.1594G>A	p.Gly532Ser			(64)
Exon 11	c.1608G>T	p.Val536Val	rs201012186	Retrouvé uniquement dans la population contrôle	(64)
Exon 11	c.1655T>G	p.Leu552Arg			(70)
Exon 11	c.1685C>G	p.Pro562Arg	rs4984948	Retrouvé dans la population contrôle, mais fréquence moindre	(3,64,159)

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variants retrouvés sur LMF1 associés à une HTG lorsque le contraire n'est pas indiqué dans la colonne Données

5. Régulation épigénétique par les microARN (miR)

L'épigénétique correspond à l'étude des changements dans l'activité des gènes sans impliquer la modification de la séquence d'ADN. Les modifications épigénétiques peuvent être transmises lors des divisions cellulaires et sont réversibles. Par exemple, nous sommes en présence d'un mécanisme épigénétique lors de la mise sous silence d'un des deux chromosomes X chez la femme.

Ces modifications sont induites par l'environnement au sens large soit aussi bien par l'environnement cellulaire que comportemental comme par exemple l'alimentation. Elles sont effectuées par des éléments biochimiques interagissant avec l'ADN ou les protéines de la structure de l'ADN.

Les éléments biochimiques les plus décrits sont les groupements méthyles (CH₃) qui se fixent sur l'ADN et empêchent certaines enzymes d'interagir avec l'ADN et donc empêche les gènes situés dans les régions méthylées d'être transcrits. La méthylation de l'ADN, la différenciation cellulaire et l'expression génique sont associées à l'épigénétique.

La modification des histones est une autre régulation épigénétique qui fait varier le degré de compactage de l'ADN favorisant ou au contraire limitant l'accessibilité aux gènes et donc leurs transcriptions.

La régulation épigénétique peut se faire via de petites molécules d'ARN : les microARN. Nous allons par la suite nous focaliser sur cette régulation épigénétique (160,161).

Certaines anomalies épigénétiques contribuent au développement de pathologie humaine. Cependant réguler ou modifier ces outils d'épigénétique peut être envisagé comme thérapie : l'arrivée des "épimédicaments".

5.1. Les microARN

Les microARN (miR) forment une classe de petits ARN non codant d'environ 22 nucléotides de longueur. Ils ont été découverts en 1993 chez un nématode : *Caenorhabditis elegans* comme des régulateurs du développement avec la mise en évidence du mode d'action du gène *lin-4* (162). Cependant, il faudra attendre l'année 2000, avec la découverte du rôle du microARN *let-7* réprimant la protéine *lin-41* en se fixant sur la région 3'UTR de son ARNm chez *Caenorhabditis elegans* pour classer les microARN comme régulateurs post-transcriptionnels (163). Ainsi, les microARN s'apparient avec les ARNm des gènes codant les protéines pour diriger la répression post-transcriptionnelle de ces ARNm cibles (164).

Les microARN sont des régulateurs des mécanismes post-transcriptionnels, ils participent à l'homéostasie de nombreux métabolismes (165). Ils contrôlent une grande partie de notre génome en se fixant à de nombreux ARNm. Certaines analyses bio-informatiques ont montré qu'un miR serait capable de réguler des milliers d'ARNm de gènes différents. Les microARN réguleraient environ 60 % des gènes codant pour des protéines chez l'homme, avec environ 45000 sites de fixation. Les algorithmes de prédiction de cible basés sur l'appariement de bases de Watson-Crick et la conservation des espèces suggèrent qu'un microARN a des centaines de cibles d'ARNm et qu'elles se chevauchent fréquemment (166–168). Ils ont des rôles établis dans la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la cardiogenèse, le développement lymphocytaire, la réponse immunitaire, la différenciation adipocytaire, la sécrétion d'insuline, ils sont responsables de nombreuses voies de signalisation. Ils sont également impliqués dans plusieurs pathologies comme l'obésité, le cancer, l'athérosclérose, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les infections virales, les désordres neurodégénératifs (169–172).

Les microARN régulent des voies métaboliques centrales qui jouent un rôle vital dans le maintien de la balance énergétique de l'organisme et l'homéostasie métabolique. Des thérapeutiques à base de microARN sont en train d'émerger et semble une stratégie viable pour traiter les maladies métaboliques. Les miR jouent un rôle clef dans l'homéostasie métabolique en gouvernant la réponse aux altérations des nutriments, ou

les fluctuations dans divers substrats métaboliques qui incluent le cholestérol, les lipides, le glucose et l'insuline (168).

5.2. Nomenclature des microARN

Cette famille de régulateurs post-transcriptionnels est composée de milliers de membres, les humains auraient 2579 microARN matures, pouvant contrôler plusieurs gènes. Les microARN peuvent ainsi établir de larges réseaux de régulation affectant plusieurs voies de signalisation. Au vu du grand nombre de microARN, des règles de nomenclature sont appliquées. On parle de miR suivi d'un nombre correspondant à son ordre de découverte que l'on peut retrouver dans la base de données internationale des microARN : miRBase. Ce nom, par exemple, miR-100 est précédé de trois lettres correspondant à l'organisme dans lequel est décrit ce microARN, pour l'homme les lettres sont hsa correspondant à *Homo sapiens*: hsa-miR-100. On peut retrouver à la suite de cette dénomination le suffixe 5p ou 3p correspondant à la provenance du microARN, soit du brin 5' (5p) ou 3' (3p) de l'épingle à cheveu lors de sa synthèse. On peut parfois retrouver une lettre derrière le chiffre d'identification du miR correspondant à un codage par différents loci (173,174).

5.3. Synthèse des microARN

La synthèse des microARN est un processus cellulaire nécessitant plusieurs étapes commençant dans le noyau et se terminant dans le cytoplasme.

Les microARN sont issus de précurseurs de plus grande taille subissant plusieurs clivages afin de produire des microARN matures, petits ARN simple brin non codant d'environ 22 nucléotides (175). Les gènes codants pour les miR sont retrouvés sur l'ensemble du génome à l'exception du chromosome Y. Ils se trouvent en majorité dans des régions introniques et sont souvent retrouvés en cluster de miR. Les miR présentent des séquences très conservées et sont exprimés de manière tissu spécifique (176).

Deux voies de synthèse existent : la voie canonique, majoritaire, et la voie non-canonique (Figure 26).

- La voie canonique

Les précurseurs de miR sont synthétisés par l'ARN polymérase II sous forme tige-boucle : les pré-miR. Dans 5% des cas ils sont synthétisés par l'ARN polymérase III. Cette forme permet d'être reconnue par le complexe Drosha : ribonucléase III (RNaseIII) – DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) qui permet de les cliver (épisser) au niveau du noyau.

Le pré-miR est ensuite exporté dans le cytoplasme via l'exportine 5, voie RAN GTP dépendante, dans lequel il est transformé en un duplex miR / miR via le complexe RNase III – Dicer, c'est un miR mature double brin. Les transcrits primaires sont ainsi successivement clivés par deux enzymes RNase III, Drosha dans le noyau et Dicer dans le cytoplasme afin de produire le pré-miR d'environ 70 nucléotides de long et ensuite un miR mature. Ce miR mature double brin est ensuite incorporé dans un complexe RISC (RNA-inducing silencing complex) composé de différentes protéines dont la famille de protéines argonaute (Ago) qui permettent de faciliter la reconnaissance de l'ARNm cible. Chez les mammifères, quatre protéines Ago, de 1 à 4, interviennent dans les interactions avec les microARN, seule Ago2 présente une activité endonucléase qui permet de cliver les ARNm. Ce complexe permet une liaison parfois incomplète des miR à des séquences complémentaires, le plus souvent sur la région 3'UTR cible de l'ARNm. Un haut degré de complémentarité entre le miR et son ARNm cible conduit à un clivage de l'ARNm par le complexe RISC. Un moindre degré de complémentarité conduit à une régulation par inhibition transitoire (167,177–179).

- Les voies non canoniques

Il existe plusieurs voies non canoniques. La voie non canonique dite voie des mirtons peut permettre une transcription directe en épingle à cheveux des pré-miR, sans nécessiter le complexe Drosha (180). Par ailleurs, certains microARN particuliers (comme miR-451) ne mettent pas en jeu le complexe Dicer (181). D'autres encore ne mettent pas en jeu le complexe RISC (182).

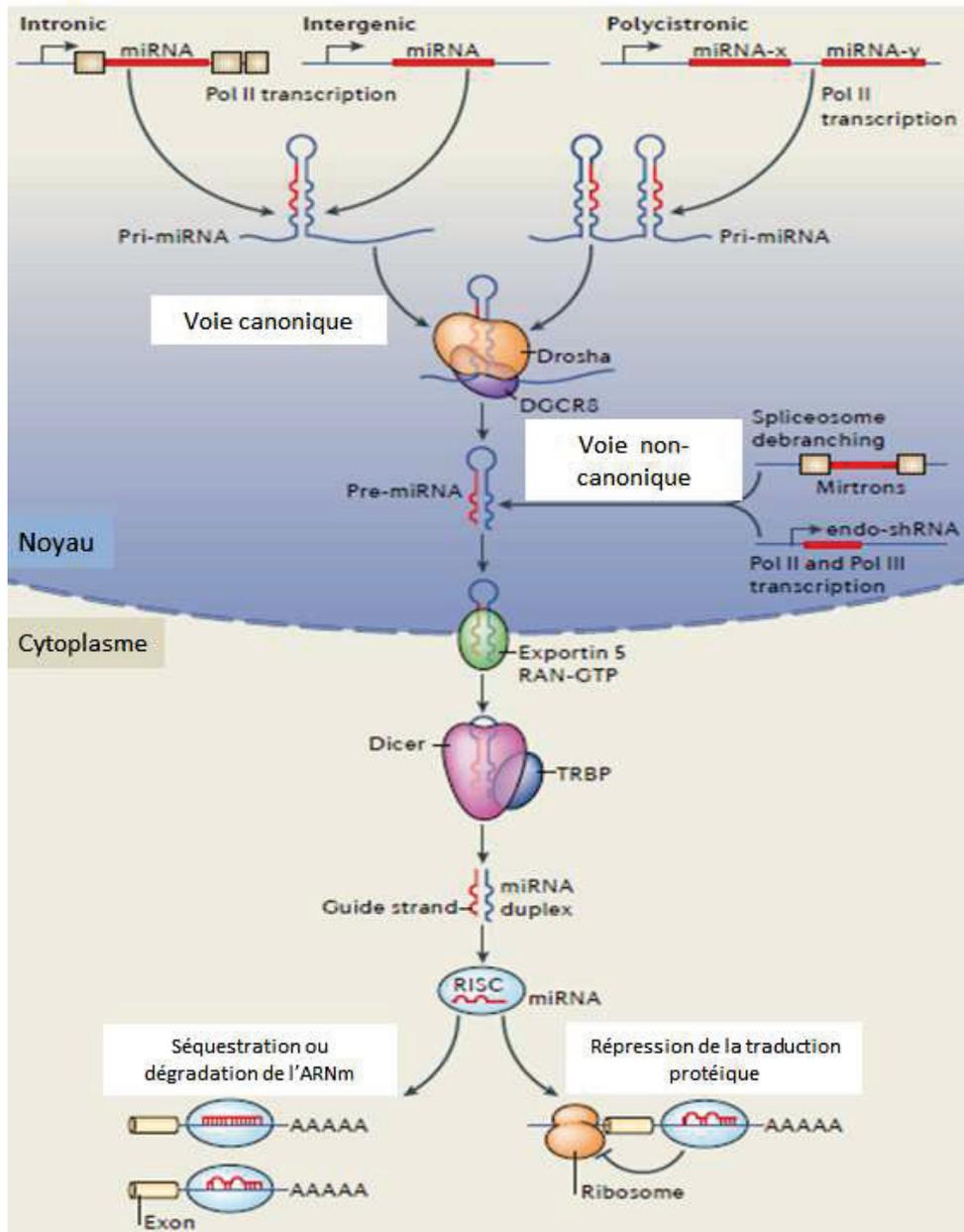


Figure 26 : Représentation de la formation des miR adaptée d'après (165)

Un microARN fonctionnel est composé de cinq parties : l'ancre à l'extrémité 5' (base 1), la tête permettant l'appariement à la cible (bases 2 à 8), la région centrale (bases 9 à 12), une région supplémentaire (bases 13 à 16) et la queue à l'extrémité 3' (base 17 à 22) permettant la reconnaissance de la cible (171,183).

5.4. Régulation de l'expression des microARN

Les microARN, régulateurs post-transcriptionnels pouvant être à l'origine de pathologie sont régulés au cours de leur biogenèse et durant leur activité. Cette régulation peut se faire de manière « classique » en régulant les gènes codants pour les miR de la même façon que les gènes codants pour des protéines. On peut observer une régulation de leur maturation avec la régulation d'une des nombreuses protéines intervenant lors de leur synthèse. De plus il existe parfois plusieurs isoformes pour un même microARN après diverses modifications. Il existe des rétrocontrôles de l'expression des miR, ainsi que l'implication d'endonucléase dans le clivage et la dégradation des miR.

5.5. Mécanisme d'action de régulation des ARNm par les microARN

La reconnaissance des ARNm par le complexe RISC-microARN est réalisée principalement par des appariements des nucléotides 2 à 8 de l'extrémité 5' du microARN selon la conformation de Watson-Crick. Ceci est appelé la séquence d'amorçage ou séquence « seed », avec généralement une complémentarité complète miR-ARNm. Cependant des liaisons ayant une complémentarité partielle est possible. Cette séquence est responsable du guidage des protéines effectrices du complexe RISC. On parle de 6mer, 7mer, 8mer selon le nombre de nucléotides de cette séquence complémentaires. La capacité du microARN à s'apparier à son ARNm cible dépend également de la structure secondaire de la cible et de son accessibilité. De ce fait un ARNm peut être la cible de plusieurs microARN. La liaison ARNm/microARN créée engendre une régulation par répression de la traduction, par inhibition de la synthèse protéique ou par dégradation de l'ARNm (Figure 26) (164,168,178,184).

Les microARN régulent négativement l'expression des ARNm de trois manières :

- Par déadénylation de la 3'UTR
- Par répression traductionnelle

- Par séquestration de l'ARNm par les ribosomes

Il a été également montré que les microARN peuvent réguler les ARNm en se fixant sur des régions codantes ou sur la région 5'UTR. Certains mêmes peuvent réguler positivement la traduction des ARNm (138).

5.6. Implication de certains microARN dans le métabolisme des lipides

Les microARN régulent divers mécanismes cellulaires en contrôlant les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme lipidique, la différenciation des adipocytes, l'homéostasie énergétique, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, l'inflammation à médiation immunitaire, le stress oxydatif, l'expression d'adipokine, l'adipogenèse, la régulation de l'appétit, la régénération cellulaire, et contribuent à la progression de l'athérosclérose. Les microARN sont des régulateurs critiques de la synthèse des lipides, de l'oxydation des acides gras et de la formation et la sécrétion des lipoprotéines. La dyslipidémie est fortement associée au syndrome métabolique, à l'obésité, au diabète et à la maladie du foie gras et pourrait parfois être expliquée par une régulation épigénétique par les microARN (167,171,178,185–187). Par exemple, dans l'athérosclérose, plusieurs microARN : miR-33a/b, miR-92a, miR-126... ont été identifiés comme impliqués dans le processus pathologique comprenant la régulation du cholestérol, la biosynthèse des lipides, le métabolisme des lipoprotéines et l'efflux du cholestérol, mais aussi la réponse immunitaire, l'homéostasie des cellules endothéliales et la fonction vasculaire (188,189).

Des études ont démontré que des composés diététiques tels que des acides aminés, des glucides, des acides gras et des vitamines peuvent conduire à des changements dans l'expression des microARN et affecter leurs fonctions, ce qui en fait de bons candidats pour étudier l'effet spécifique d'un nutriment ou régime sur un tissu ou des cellules. Les microARN peuvent être de bons biomarqueurs pour quantifier les impacts physiologiques du mode de vie ou des habitudes alimentaires. Par exemple, l'obésité altère l'expression de microARN dans les organes métaboliquement importants. En effet, les cellules exportent sélectivement un sous-ensemble de microARN dans des vésicules et ainsi

l'analyse globale des microARN circulants est un bon biomarqueur pour les cancers, les troubles neurologiques et maladies métaboliques. De plus, les microARN ont un potentiel thérapeutique fort (167,178,187).

microARN	Effet	Référence
miR-21	Corrélation inverse significative avec le Ct, le LDL-C, le non-HDL-C, les ratios Ct/HDL-C, LDL-C/HDL-C, TG/HDL-C et Ct/non HDL Surexpression associée à un profil lipidique moins athérogène et induit une accumulation intracellulaire des lipides	(187,190)
miR-26	Expression hépatique diminuée chez les sujets en surpoids, protège contre la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline en co-ciblant les gènes critiques pour la gluconéogenèse et la biosynthèse des lipides	(168)
miR27a/b	Inhibe la différenciation des adipocytes, impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, dans le métabolisme des acides gras et la lipogenèse	(171, 186,187)
miR-33a et miR-33b	miR introniques codés dans le gène de protéine de liaison aux éléments de réponse aux stérols, <i>SREBP2</i> et <i>SREBP1</i> respectivement, ils ont des séquences identiques. Exprimés de façon abondante au niveau hépatique <i>SREBP2</i> humain code pour un facteur transcriptionnel régulant l'homéostasie du cholestérol hépatocytaire, il est stimulé par la baisse du taux de cholestérol. Inhibition associée à une diminution de la concentration de VLDL Contribuent à maintenir l'homéostasie de la synthèse de lipides et du cholestérol en réprimant des gènes importants impliqués dans l'efflux de cholestérol, en particulier le transporteur conditionnant l'efflux de cholestérol non estérifié ABCA1 (ATP-binding Cassette A1). Ce transporteur ABCA1 facilite le transfert des lipides intracellulaires sur le cholestérol HDL circulant où il sera transporté au foie, il est donc important pour la biogenèse des HDL et l'efflux du cholestérol Régulent d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, dans la synthèse des acides biliaires et leur sécrétion; diminue l'oxydation des acides gras engendrant une accumulation de TG dans les cellules hépatiques	(168,171,174,186,187,189,191,192)
miR-122	Son inhibition in vivo augmente les concentrations du profil lipidique et du cholestérol chez des souris sauvages ou obèses induites Très abondant dans le foie humain, représentant environ 70% de l'expression total des microARN hépatiques, soit estimé à environ 135000 copies par hépatocyte Associé à la régulation du métabolisme hépatique ainsi qu'à l'hépatite C, son taux est diminué dans le carcinome hépatocellulaire Impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, du métabolisme de l'acide gras et la lipogenèse	(168,186,187,193,194).
miR-125a-5p	Impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, du métabolisme des acides gras et dans la lipogenèse	(186)
miR-126	Contre les effets athérogènes de l'hyperlipidémie	(185)
miR-96/182/183	Situés sur un locus polycistronique, locus directement régulé par le cholestérol alimentaire augmenterait l'activité lipogène du gène <i>SREBP2</i> permettant d'augmenter la synthèse du cholestérol et des lipides	(168)

miR-128-1	Son inhibition thérapeutique réduit les concentrations de LDL plasmatique	(191)
miR-129-1-3p miR-129-2-3p	Corrélation positive avec les concentrations de glycérol, associés de façon significative aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-143	Sous-régulé dans les tissus hépatiques des souris obèses, son inhibition diminue l'accumulation des TG, exprimé dans le foie	(168, 171,186)
miR-144-5p	Concentration corrélée avec les concentrations de glucose, et associé significativement aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-148a	Augmente les concentrations plasmatiques de HDL et diminue ceux de LDL chez les souris en agissant sur <i>ABCA1</i> (répression) et <i>LDLR</i>	(191)
miR-181a	Augmente la lipogenèse	(167)
miR-331-3p	Expression corrélée avec la concentration d'acides gras et aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-335	Augmente les concentrations de TG et de cholestérol, son expression augmente en réponse à la charge lipidique et est fortement exprimé dans le foie et le tissu adipeux des souris obèses Impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, dans le métabolisme des acides gras et dans la lipogenèse, régule le métabolisme des lipides et la différenciation adipocytaire	(171,186)
miR-370	Sur-régulé dans les tissus hépatiques des souris obèses et est significativement augmenté chez les patients ayant une hyperlipidémie, positivement corrélé aux concentrations de cholestérol, de TG et de LDL-C Augmente la lipogenèse et est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et du métabolisme des acides gras	(167, 171,186)
miR-378/378*	Rôles importants dans la régulation du métabolisme lipidique, sa surexpression pendant l'adipogenèse augmente l'accumulation de TG, est sous-régulé dans les tissus hépatiques des souris obèses Augmentent la synthèse des AG et des TG, exprimés dans le foie, le tissu adipeux brun, le muscle squelettique, et le tissu adipeux blanc Diminue la lipolyse in vitro. Régule le métabolisme des lipides et est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, du métabolisme des acides gras et la lipogenèse	(167, 168, 171, 186,187)
miR-484	Associé significativement aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-625-3p	Corré à la concentration de cholestérol, et associé de façon significative aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-758	Il réprime le gène <i>ABCA1</i> , donc impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides	(171,191)
miR-1207-5p	Associé au taux d'hémoglobine glyquée et de façon significative aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)
miR-1237-3p miR-1288-3p	Expressions corrélées avec le taux d'acides gras et associées de façon significative aux métabolites liés au syndrome métabolique	(174)

Tableau 11 : MicroARN impliqués dans le métabolisme des lipides

5.7. Implication de variants 3'UTR dans la régulation des ARNm par les microARN

Plusieurs études ont montré que des variants 3'UTR des gènes peuvent influencer la fixation des miR sur les ARNm soit en créant soit en supprimant un site de fixation de miR.

- Création d'un site de fixation de miR sur l'ARNm de *PLIN4* (Figure 27)

L'étude du gène *PLIN4* a montré l'effet de la présence d'un variant sur la 3'UTR d'un ARNm sur sa régulation par les microARN. En effet la présence de l'allèle A (rs8887) sur la région 3'UTR de l'ARNm de *PLIN4* induit une complémentarité parfaite avec le miR-522 qui va réprimer l'ARNm de *PLIN4* ce qui n'est pas le cas en présence de l'allèle G (allèle sauvage). Ce variant de *PLIN4* crée un site de régulation par le miR-522 et devient un modulateur de l'obésité (139).

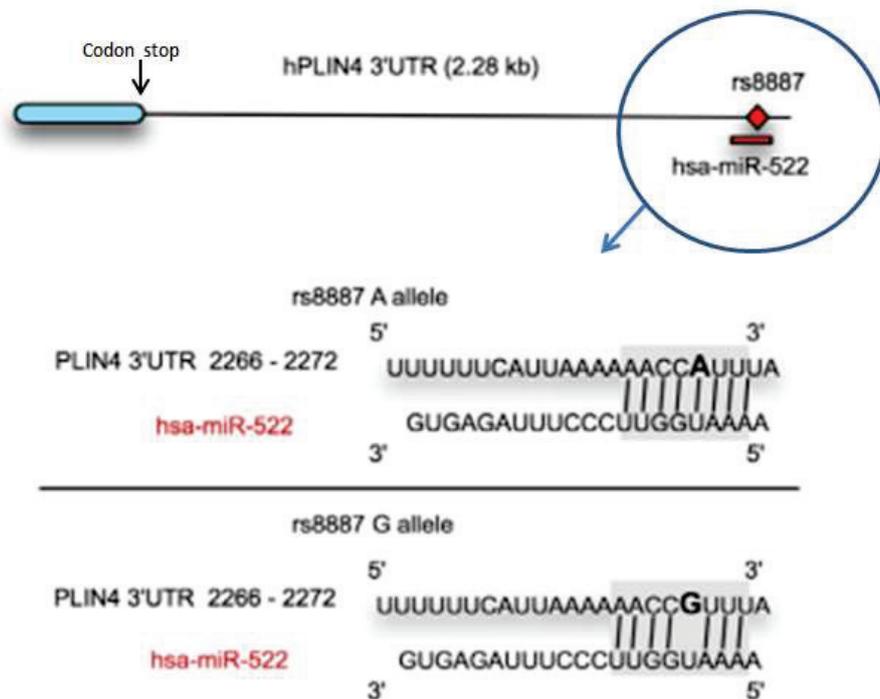


Figure 27 : Représentation d'un polymorphisme situé en 3'UTR de l'ARNm du gène *PLIN4* modulant l'action d'un microARN adaptée d'après (139)

En ce qui concerne le métabolisme des lipides, notre équipe a montré dans 2 études précédentes :

- Une création de site de miR induite par le variant rare du polymorphisme d'*APOA5* c.*158C>T (rs2266788), étroitement associé à l'HTG modérée et sévère, dont l'effet hypertriglycéridémiant n'était pas expliqué jusque-là. L'allèle c.*158C (allèle rare) crée un site de fixation pour le microARN hsa-miR-485-5p permettant de réguler négativement l'ARNm d'*APOA5* réduisant son action et induisant une HTG (6).

- Une suppression de plusieurs sites de miR induite par un haplotype particulier de la LPL associée à l'hypotriglycéridémie. En effet l'haplotype 4 de la LPL composé de 7 SNP sur sa région 3'UTR et de la mutation Ser474Ter (rs328) en déséquilibre de liaison est significativement associé à l'hypotriglycéridémie. La suppression des sites de liaisons des miR : miR-410, miR-29a, et miR-1277 en présence des SNP de la 3'UTR de LPL permettrait d'expliquer l'effet hypotriglycéridémiant du variant rs328 au vu de son déséquilibre de liaison (7).

D'autres études ont démontré l'implication de la régulation post-transcriptionnelle des miR dans la régulation du métabolisme des lipides. Notamment la liaison du miR-29a sur la région 3'UTR de la LPL (195). Mais également, la suppression du site de liaison du miR-410 en présence de l'allèle rare c.*1671T>C, rs13702, expliquant l'hypotriglycéridémie retrouvée chez les porteurs de ce SNP (196).

Ainsi la régulation post-transcriptionnelle par les microARN est une voie permettant de comprendre la survenue de pathologie comme l'hyperchylomicronémie particulièrement en présence de variants sur cette région 3'UTR.

6. Enjeux du travail

L'hyperchylomicronémie, maladie rare, est caractérisée par une hypertriglycéridémie sévère (avec un seuil variable selon les auteurs >10 mmol/L - >15 mmol/L). Son exploration se fait actuellement par analyse génétique des six gènes candidats déterminants dans la régulation de la lipolyse intravasculaire des lipoprotéines riches en triglycérides : *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3*, *LMF1* et *GPIHBP1* (49). De nombreuses mutations délétères ont été décrites dans ces gènes. Elles permettent dans 40% à 60% des situations d'expliquer la survenue de cette pathologie. Ainsi, l'étude génétique seule n'est pas suffisante pour expliquer la survenue de cette pathologie (3).

De nombreux SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont retrouvés dans ces gènes et décrits comme associés à la triglycéridémie. Certains sont retrouvés en région 3' non codante, cependant leur mécanisme d'action et/ou de régulation n'est pas toujours élucidé. De plus, il existe une importante régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des triglycérides (197,198). Il existe également une importante variation inter-patient pour un même SNP avec un effet de l'environnement non négligeable sur la pathogénicité de certains variants. Ainsi, des mécanismes restent encore non-identifiés dans la compréhension du développement de l'hyperchylomicronémie. Notre équipe essaie d'appréhender l'impact et le mécanisme d'action de certains variants sur la survenue de l'hyperchylomicronémie. Au vu de la présence de SNP sur la région 3' non codante, nous nous sommes intéressés à une régulation épigénétique via les microARN de ces variants retrouvés dans une population hypertriglycéridémique. L'équipe a d'ores et déjà démontré une régulation via les microARN de certains variants retrouvés sur les régions 3' non codantes des gènes *APOA5* et *LPL* (6,7).

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la régulation du gène *APOC3* via les microARN. Ce gène est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL), il favorise l'assemblage et la sécrétion des VLDL dans le foie et inhibe la recapture hépatique des LRTG. La présence de polymorphismes sur sa région 3'UTR pourrait causer la perte d'un site de liaison à un microARN, avec pour conséquence une augmentation de l'expression du gène *APOC3*, engendrant une augmentation d'inhibition de la LPL et donc

une hypertriglycéridémie. Nous avons étudié plus particulièrement le variant SstI (rs5128), déjà bien documenté dans la littérature, comme associé à l'hypertriglycéridémie, mais dont sa fonctionnalité reste controversée. De ce fait nous avons étudié une cohorte de cent patients hypertriglycéridémiques sévères que nous avons comparés à cent témoins normotriglycéridémiques afin de vérifier l'association des variants retrouvés à la triglycéridémie. Puis, après étude *in silico*, nous avons mis en place un test fonctionnel permettant de vérifier si ces variants sont régulés par les microARN.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés au gène *LMF1*, codant pour une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique jouant un rôle essentiel dans la maturation post-transcriptionnelle de la LPL. Après mise en place de l'analyse de ce gène nous avons cherché à comprendre l'effet des variants retrouvés dans notre cohorte de patients hypertriglycéridémiques. Au vu de sa récente découverte et de sa faible description dans la littérature, l'impact fonctionnel des variants du gène *LMF1* est peu connu. Nous avons mis en place un test fonctionnel considérant l'effet d'un variant sur l'activité LPL en mesurant son activité post-héparinique *in vitro* afin de quantifier les capacités lipolytiques de la LPL pour pouvoir statuer sur l'effet délétère ou non du variant *LMF1*. Puisque des variants ont également été retrouvés sur la région 3' non codante, nous avons fait l'hypothèse d'une régulation par les microARN de ces polymorphismes. Ainsi, la présence d'un SNP sur cette région pourrait induire un gain de site de fixation d'un microARN, qui diminuerait l'expression de *LMF1* diminuant les capacités lipolytiques via une moindre expression de la LPL.

Ainsi, l'enjeu de notre travail est d'apporter une explication fonctionnelle causale de la présence de variants sur les gènes *APOC3* et *LMF1* dans la survenue de l'hyperchylomicronémie. Ce qui permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la lipolyse intravasculaire, dans la perspective de pouvoir éventuellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Partie 2: Présentation des travaux

Article 1: Lack of evidence for a liver or intestinal miRNA regulation involved in the hypertriglyceridemic effect of *APOC3* 3'UTR variant SstI (199)

Le gène *APOC3* est un régulateur majeur du métabolisme plasmatique des triglycérides. Il code pour une glycoprotéine, l'apolipoprotéine C-III (ApoC-III), synthétisée principalement au niveau hépatique mais également intestinal. Elle a une action hypertriglycéridémiant à plusieurs niveaux du métabolisme des triglycérides. Classiquement décrite comme un inhibiteur de la lipoprotéine lipase, enzyme clef du métabolisme des triglycérides, l'ApoC-III promeut la production hépatique de VLDL et inhibe la recapture hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides. Plusieurs variants non codants du gène *APOC3*, situés dans le promoteur et dans la région 3'UTR non codante (UnTranslated Region), sont étroitement associés à l'hypertriglycéridémie. Cependant leur mécanisme d'action n'est pas clairement élucidé. Ces dernières années, la découverte du rôle des microARN sur la régulation post-transcriptionnelle grâce à leur interaction avec les régions 3'UTR des gènes, a permis d'identifier une nouvelle modalité de régulation métabolique. Notre équipe a précédemment démontré que des polymorphismes étroitement associés à la triglycéridémie situés dans les régions 3'UTR de gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides comme *APOA5* ou *LPL* pouvaient moduler la triglycéridémie par création ou suppression de site de fixation de microARN (6,7).

Ainsi, l'objectif de cette étude était d'identifier des variants génétiques situées dans la région 3'UTR du gène *APOC3* associés à l'hypertriglycéridémie et d'étudier leur régulation potentielle par des microARN hépatiques ou intestinaux.

Nous avons séquencé la région 3'UTR de l'*APOC3* chez 100 patients diabétiques de type 2 présentant une hypertriglycéridémie sévère (concentration en triglycérides supérieure à 15mmol/L) comparés à 100 patients diabétiques de type 2 normotriglycéridémiques. Seuls deux variants géniques ont été identifiés dans les 2 groupes de patients : Sst1 (rs5128) et Bbv1 (rs4225), (allèles rares S2 et B2). Le polymorphisme Sst1 est très étudié

dans la littérature et connu pour être associé à l'hypertriglycéridémie modérée et sévère ; tandis que le polymorphisme Bbv1 est très peu étudié. Dans notre cohorte, seul le variant rare S2 de Sst1 est significativement associé à l'hypertriglycéridémie. De plus, le variant rare S2 est systématiquement associé au variant rare B2 de Bbv1, il est en déséquilibre de liaison complet. Dans la littérature, le variant Sst1 est corrélé positivement à la concentration en apolipoprotéine C-III.

Nous avons, par la suite, identifié par étude bio-informatique cinq pertes de site de fixation de microARN induites par le variant S2 du polymorphisme Sst1. Ces cinq microARN sont exprimés dans le foie et l'intestin humain ainsi que dans les modèles cellulaires utilisés.

Puis nous avons réalisé une étude *in vitro* pour tester la fonctionnalité des interactions variants géniques/microARN. Bien que les arguments de la littérature suggérassent une possible régulation post-transcriptionnelle impliquant le variant Sst1 et que des pertes potentielles de site de fixation de microARN étaient prédites *in silico*, nos résultats *in vitro* n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'une régulation ciblant directement la région 3'UTR du gène *APOC3* par un microARN hépatique ou intestinal, pour expliquer l'effet hypertriglycéridémiant du polymorphisme Sst1 de l'*APOC3*. Nos résultats ne permettent cependant pas d'exclure une régulation indirecte à distance par un microARN ciblant d'autres variants géniques en déséquilibre de liaison avec le variant Sst1.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

atherosclerosis

EAS

Lack of evidence for a liver or intestinal miRNA regulation involved in the hypertriglyceridemic effect of APOC3 3'UTR variant SstI



Marine Dancer^{a, e}, Cyrielle Caussy^{a, b}, Mathilde Di Filippo^{a, d}, Philippe Moulin^{a, c},
Christophe Marçais^{a, e}, Sybil Charrière^{a, c, *}

^a INSERM U1060, Laboratoire Carmen, Université Lyon 1, INRA U1235, INSA de Lyon, CENS, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Villeurbanne F-69621, Oullins Cedex F-69921, France

^b Hospices Civils de Lyon, Centre hospitalier Lyon Sud, Service d'endocrinologie, Pierre-Bénite Cedex F-69495, France

^c Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Fédération d'endocrinologie, Bron Cedex F-69677, France

^d Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de biochimie et biologie moléculaire, Bron Cedex F-69677, France

^e Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Centre de Biologie Sud, Laboratoire de Biochimie moléculaire et métabolique, Pierre-Bénite Cedex F-69495, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2016

Received in revised form

19 September 2016

Accepted 12 October 2016

Available online 13 October 2016

Keywords:

APOC3

Lipids

Triglycerides

Polymorphism

SNP

microRNA

miR

ABSTRACT

Background and aims: APOC3 is a major regulator of triglycerides metabolism. Several APOC3 variants are associated with hypertriglyceridemia (HTG). Our aim was to establish the potential regulation of APOC3 3'UTR variants associated with HTG by liver or intestinal miRNAs.

Methods: We sequenced APOC3 3'UTR in 100 type 2 diabetic (TD2) patients with severe HTG (TG > 15 mmol/L) (HTG group) compared to 100 normotriglyceridemic patients (NTG group). We performed *in silico* studies to identify potential loss of miRNA binding induced by APOC3 3'UTR variants. We also performed *in vitro* studies to test the functionality of miRNA/APOC3 variants interactions: APOC3 3'UTR plasmids coupled with a firefly luciferase reporter were transfected in HepG2, Huh-7 and Caco-2 cells.

Results: We identified only two variants: SstI (rs5128) and BbvI (rs5225) in APOC3 3'UTR in the 2 groups of patients. Only the SstI-S2 rare allele was significantly associated with HTG (allele frequency 19.5% in HTG group vs. 9.5% in NTG group, $p = 0.0045$). *In silico* studies predicted a potential loss in the binding of 5 miRNAs induced by the S2 variant. These 5 miRNAs are all endogenously expressed in human liver and intestine, as well as in the cell models studied. However, *in vitro*, the S2 variant did not modulate APOC3 3'UTR reporter gene expression in HepG2, Huh-7 and Caco-2 cells.

Conclusions: Our results do not confirm the hypothesis of a direct regulation of the APOC3 SstI variant by hepatic or intestinal miRNAs.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Apolipoprotein CIII (apo CIII), expressed mainly in the liver and intestine, is carried on very low density lipoprotein (VLDL), chylomicrons (CM) and high density lipoprotein (HDL) [1]. Apo CIII is a major regulator of plasma triglycerides (TG) metabolism by promoting liver VLDL assembly and secretion, inhibiting hydrolysis of TG-rich lipoproteins by lipoprotein lipase and decreasing the

uptake of TG-rich remnant lipoproteins by the liver [2–4].

There is a strong positive correlation between plasma TG and apo CIII levels. Rare APOC3 loss-of-function mutations are associated with lower TG [5] whereas overexpression of APOC3 induces HTG in transgenic mice [6]. Elevated concentration of plasma apo CIII is also closely associated with hypertriglyceridemia in humans [7]. Antisense oligonucleotides anti-APOC3 have been shown to consistently decrease plasma TG in humans in phase 1 and 2 clinical studies [8]. Several APOC3 gene non-coding variants, such as promoter variants (rs2854117 and rs2854116) or 3'UTR SstI (rs5128), are tightly associated with both moderate and severe hypertriglyceridemia, but their functionality is not clearly established [9–12].

* Corresponding author. Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, Hôpital Louis Pradel, 28 avenue Doyen Lépine 69677, Bron Cedex, France.

E-mail address: sybilcharriere@chu-lyon.fr (S. Charrière).

The discovery of miRNAs, small non-coding RNAs that post-transcriptionally down-regulate gene expression by binding target 3'UTR mRNA sequences, provides new opportunities to explain the functionality of the 3'UTR variant [13]. We previously showed that 3'UTR variants of key genes involved in the regulation of TG metabolism could either create or suppress miRNA binding sites and modulate plasma TG concentration [14,15].

Therefore, we aimed to assess whether TG associated *APOC3* 3'UTR variants could be involved in miRNA dysregulation of *APOC3*: the loss of a miRNA binding site could increase *APOC3* mRNA expression and raise plasma TG concentration.

2. Materials and methods

2.1. Population studied

100 type 2 diabetic (T2D) patients with documented hyperchylomicronemia (TG > 15 mmol/L) and 100 T2D normotriglyceridemic patients from the DIACOR cohort were studied, as previously described [16]. Detailed inclusion and exclusion criteria are available in reference [17]. Baseline characteristics and lipid parameters are presented in Supplemental Table 1.

2.2. *APOC3* 3'UTR polymorphisms analysis

Genomic DNA was extracted as previously described [12]. The *APOC3* 3'UTR DNA sequence (0.2 µg) was amplified by PCR using the following primers (Life Technologies, Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, United States): forward 5'-CTGGGATTTGGACCCTGAG-3'; reverse 5'-CATGCCACAGACAGATGG-3'. PCR products were analyzed by using denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC, Transgenomic, Glasgow, United Kingdom) in a 1:1 mixture with a control (wild type) amplicons. Variant sequences were confirmed by direct sequencing (CEQ™ 8000 Genetic analysis system Beckman Coulter™, Villepinte, France). Pairwise linkage disequilibrium was calculated using Lewontin's parameter of LD, D' [18].

2.3. Bio-informatic studies

We compared the miRNA binding-site predictions of two software programs for miRNA target prediction PITA [19] and RegRNA [20], whose characteristics are summarized in a previous study [14].

2.4. Human *APOC3* 3'UTR luciferase constructs

In order to study the miRNA regulation of the two *APOC3* 3'UTR polymorphisms identified SstI (c.*40G > C, rs5128) and BbvI (c.*71 G > T, rs4225), the *APOC3* 3'UTR full length wild sequence (c.*40C (S1) and c.*71T (B1)) was synthesized and inserted in pEZX-MT01 vector (GeneCopoeia™, Labomics S.A, Nivelles, Belgium) downstream a firefly luciferase reporter gene, creating a pEZX-S1B1 vector. Site-directed mutagenesis was performed to introduce c.*40G (S2) and/or c.*71G (B2) alleles in pEZX-S1B1, creating variants vectors: pEZX-S1B2, pEZX-S2B1, pEZX-S2B2 (GenScript, Piscataway, USA). All constructs were confirmed by sequencing.

2.5. MicroRNA expression

Total RNA was extracted from cell lines: HepG2, HuH-7, and Caco-2 and from human intestine and liver tissues (generous gift from anathomopathology laboratory South Hospital, Lyon), using the TriPure technical (Roche Applied Science, Penzberg, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. miRNA-specific

reverse transcription was performed with 500 ng of purified total RNA, using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit and miRNA qPCR using TaqMan 2x Universal PCR master Mix (Life Technologies – Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, United States) on Rotor-Gene Q thermocycler (QIAGEN, Courtaboeuf, France). miRNA expression was expressed in 1/cycle threshold, proportional to the miRNA concentration. All experiments were performed in triplicate.

2.6. *APOC3* 3'UTR luciferase reporter assays

Human hepatic (HepG2) and intestinal (Caco-2) cell lines were cultured in DMEM high glucose (25 mM) medium; HuH-7 human hepatic cell line was cultured in DMEM low glucose (5.5 mM); all media were supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were plated onto 12-well plates (4.5×10^5 cells/well for HepG2, 2.5×10^5 cells/well for Caco-2, and 1.5×10^5 cells/well for HuH-7) and were transfected with *APOC3* 3'UTR luciferase constructs. All transient transfections were performed with jetPRIME® transfection reagent (Polyplus transfection™, Illkirch, France) using 2 µl for 1 µg of DNA according to the manufacturer's protocol.

Transfection efficacy was controlled using *APOA5* 3'UTR luciferase constructs pEZX-MT01-*APOA5*-SNP1-T vector (pEZX-T) and pEZX-MT01-*APOA5*-SNP1-C vector (pEZX-C), which was previously demonstrated to be regulated by miR485-5p in HuH-7 [14].

Luciferase activity was measured 24 h after transfection as previously described [14]. Results were expressed as a percentage of the control condition. All transfection experiments were performed in triplicate and repeated at least three times.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 software. Continuous variables were expressed in mean ± standard error of the mean (SEM) and categorical variables as frequencies and percentages. Means of quantitative variables were compared using one-way ANOVA test or Student's t-test, while categorical variables were analyzed with the Chi-squared test or Fisher's exact test when effectives were under 10. A p value < 0.05 (two sided) was considered as significant.

3. Results

3.1. Screening of *APOC3* 3'UTR variants associated with hypertriglyceridemia

A genetic analysis in 2 groups of type 2 diabetic patients either normotriglyceridemic (NTG, $n = 100$) or severely hypertriglyceridemic (HTG, $n = 100$) was performed. In both groups, we identified only 2 genetic variations: SstI (c.*40G > C, rs5128) and BbvI (c.*71 G > T, rs4225) (Refseq accession number NM_000237.2). Allele and genotype distribution of the rare variant of BbvI polymorphism (B2) was not significantly different between the 2 groups, whereas the rare variant S2 of the SstI polymorphism was twice as frequent in group HTG as in group NTG (Table 1). The S2 variant was found to be in strong linkage disequilibrium ($D' = 1$) with the B2 variant as no carrier of the S2B1 haplotype was identified among the 400 chromosomes of this study (Table 2) Thus, only the SstI *APOC3* 3'UTR variant was significantly associated with severe HTG in this cohort.

3.2. Bioinformatic prediction of *APOC3* 3'UTR SstI variant effect on miRNA binding sites

We used 2 prediction software tools to investigate the putative

Table 1
Genotype distribution and allele frequencies of APOC3 3'UTR polymorphisms in HTG and NTG groups.

%	HTG (n = 100)	NTG (n = 100)	p (HTG vs. NTG)
APOC3 SstI			
S1S1	66	82	0.010 ^a
S1S2	29	17	0.029 ^b
S2S2	5	1	0.095 ^b
S2 allele ^c	19.5	9.5	0.005
APOC3 BbvI			
B1B1	28	31	0.642 ^c
B1B2	43	46	0.917 ^d
B2B2	29	23	0.382 ^d
B2 allele ^e	50.5	46	0.368

Data are expressed as %. p values were determined by Chi-square test for genotype distribution or Fisher's exact test when effectives were under 10, and by ANOVA for alleles frequencies.

HTG, severe hypertriglyceridemic group. NTG, normotriglyceridemic group.

^a S1S1 vs. S1S2 + S2S2.

^b vs. S1S1.

^c B1B1 vs. B1B2 + B2B2.

^d vs. B1B1.

^e n = 200 alleles per group.

Table 2
Association of genotypes of SstI and BbvI polymorphisms among the 200 patients.

n = 200	B1B1	B1B2	B2B2
S1S1	59	63	26
S1S2	0	26	20
S2S2	0	0	6

impact of the SstI APOC3 3'UTR on miRNA binding sites. Five miRNA binding-sites encompassing the SstI polymorphism were predicted to be disrupted in presence of the S2 rare variant compared to the major S1 allele: hsa-miR-138, hsa-miR-185*, hsa-miR-564; hsa-miR-1207-5p; hsa-miR-1270 (Supplemental Table 2).

3.3. Expression profile of candidate miRNA in human tissues and cell lines

As APOC3 is mainly expressed in the liver and intestine, mostly liver and intestine expressed miRNAs would potentially regulate APOC3 expression. We demonstrated that the 5 candidate miRNAs identified in bioinformatic studies were expressed in human hepatic and intestinal tissue samples. These miRNAs were also expressed at similar levels as in human tissues in the 3 cell models used for *in vitro* functional studies: HepG2, HuH-7 and Caco-2 cells. We also studied as positive control, the expression of miR485-5p, a miRNA previously showed to be involved in APOA5 3'UTR regulation [14] (Fig. 1).

3.4. SstI polymorphism does not modulate miRNA regulation of APOC3 3'UTR in HepG2, HuH-7 and Caco-2 cells

We first checked, as a positive control in our 3 cell models, the functionality on the APOA5 3'UTR regulation of endogenous expressed miR-485-5p. This regulation by miR-485-5p was previously demonstrated in HEK-293T cells [14]. We transfected HepG2, HuH-7 and Caco-2 cells with a pEZX-MT-01 containing either APOA5 3'UTR variant SNP1-T or SNP1-C. APOA5 3'UTR SNP1-C allele luciferase activity was significantly decreased compared to SNP1-T allele in all the 3 cell lines (Fig. 2A).

Then, we studied the functionality of APOC3 3'UTR candidate miRNA binding-sites. HepG2, HuH-7 and Caco-2 cells were transfected with pEZX-MT-01 luciferase reporter vector containing

either S1B1 or S2B2 APOC3 3'UTR sequence. Luciferase activity with the APOC3 S2B2 construct was similar as the APOC3 S1B1 construct (Fig. 2B). The S2B1 (not found in patients) and S1B2 constructs were also tested and did not show any significant increase of luciferase activity compared to the APOC3 S1B1 construct (data not shown).

These results suggest that the APOC3 S2 variant does not affect the potential interaction of miRNAs endogenously expressed in HepG2, HuH-7 and Caco-2 with APOC3 3'UTR region.

4. Discussion

We hypothesized that APOC3 3'UTR variants associated with hypertriglyceridemia could modulate a regulation by miRNA. We sequenced the APOC3 3'UTR in a cohort of 200 type 2 diabetic patients who were either normotriglyceridemic or with a history of severe HTG. Among these patients, we did not identify other APOC3 3'UTR variants significantly associated with hypertriglyceridemia than the previously reported SstI polymorphism, and we found no evidence for an impact of miRNA interaction with this polymorphism.

Even though association studies of the SstI variant with triglyceride concentration provided some conflicting results, a recent meta-analysis confirmed that carriers of the rare G allele (S2) exhibit higher levels of apo CIII and triglycerides concentrations [21]. Additionally, the S2 variant was associated with both moderate and severe HTG [9–12]. We also identified another variant (BbvI), which is in strong linkage disequilibrium with SstI but poorly studied in literature. This variant was not associated with HTG in our study. The B2 rare allele of BbvI was found to be significantly associated with HTG American patients, and in Dutch patients with combined hyperlipidemia [22,23]. But in a larger study of 512 Dutch subjects (mean TG 1,7 mmol/L), the variant was not independently associated with triglyceride concentration in multivariate analysis [24], neither in two Asian population studies [25,26].

Ten other APOC3 3'UTR rare variants have been identified in the 1000 genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>) with minor alleles frequency less than 5/1000, mostly in African subjects. Our study was probably underpowered to detect such rare variants but these rare variants cannot constitute a contributive modulator of plasma TG in the overall population due to their infrequency.

Currently, the hypertriglyceridemic effect of the SstI variant is not fully understood. An indirect functionality through its strong linkage disequilibrium with the APOC3 promoter variants which disrupts an insulin response element was proposed (rs2854117, c.-528T > C and rs2854116, c.-501C > T). However, the analysis of haplotypes combinations within the APOA1/C3/A4 gene cluster in familial combined hyperlipidemia provided evidence for a dominant role of the SstI polymorphism for the association of haplotypes with lipid parameters [27].

A recent meta-analysis confirms the association of the APOC3 S2 variant with an increase of plasma apo CIII concentrations [21]. Furthermore, a human study showed increased APOC3 hepatic mRNA encoded by the S2 variants in liver biopsies of 3/5 patients, heterozygotes for S2 variants, which suggested that the S2 variant could affect APOC3 mRNA stability [28]. Therefore, the SstI polymorphism emerged as a valuable candidate to modulate an APOC3 post-transcriptional regulation involving miRNAs.

Bioinformatic analyses suggested the loss of 5 miRNA binding is induced by S2 variation. Although all miRNAs were expressed at similar levels in the 3 cell lines studied as well as in the human liver and intestine tissues, *in vitro* studies did not confirm that the S2 variation could alter the regulation of APOC3 mRNA by miRNAs. Previously, the same assay was successfully used to demonstrate the alteration of APOA5 and LPL regulation by miRNAs, enabling the

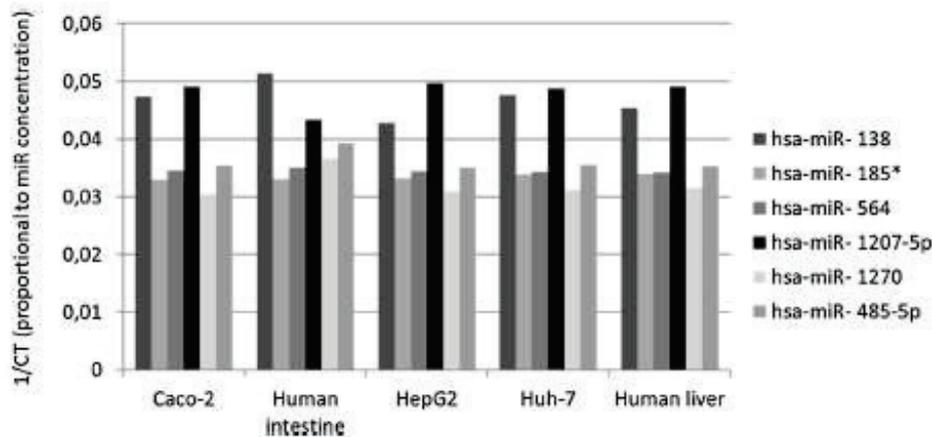


Fig. 1. Expression profile of candidate miRNAs in human tissues, and cell models used for *in vitro* studies. The expression profiles of miRNAs identified by bioinformatic studies (miR138, miR185*, miR564, miR1207-5p, miR1270) and miR485-5p, a miRNA involved in *APOA5* 3'UTR regulation used as control, were assessed using RTqPCR with specific miRNA assay in human intestine and liver samples, and in HepG2, Huh-7 and Caco-2 cells. All experiments were performed in duplicates and repeated three times. Data are expressed in mean $1/CT$ (cycle threshold) \pm SEM, which is proportional to miRNA concentration.

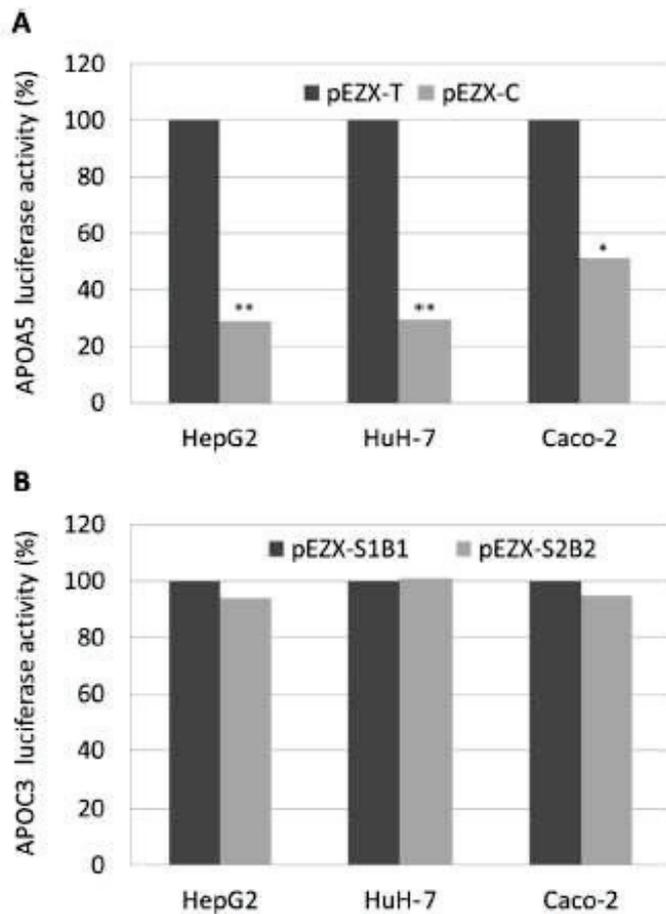


Fig. 2. Expression of luciferase constructs in HepG2, Huh-7 and Caco-2 cells, endogenously expressing miR-138, -185*, -564, -1207-5p, -1270, and miR-485-5p (control). (A) Expression of *APOA5* SNP1-C or SNP1-T luciferase constructs. Luciferase activity of *APOA5* SNP1-C (pEZ-X-C) is expressed as relative to *APOA5* SNP1-T (pEZ-X-T) luciferase activity. (B) Expression of *APOC3* S1B1 or S2B2 luciferase constructs. Luciferase activity of *APOC3* S2B2 (pEZ-X-S2B2) is expressed as relative to *APOC3* S1B1 (pEZ-X-S1B1) luciferase activity. All experiments were performed in triplicates, and repeated three times. Data are represented as mean \pm SEM. *p*-values were determined by Student's *t*-test (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$).

detection of a small effect of about 10–20% [14,15]. We further confirmed the regulation of *APOA5* 3'UTR by miR485-5p, which is

expressed at a similar level to the 5 candidate miRNAs in the 3 cell lines. Therefore, it is unlikely that levels of candidate miRNA are ineffective in our cell models.

Nevertheless, this negative study has some limitations. Firstly, even if miRNA profiles appeared to be similar in cells models as in liver or intestinal human tissues expressing *APOC3*, we cannot completely exclude the loss of binding of a miRNA not expressed in the cell models, nor detected in our bioinformatics analysis. In addition, our study focuses only on the *APOC3* 3'UTR. SstI *APOC3* variant could be indirectly regulated by a miRNA through other polymorphisms in strong linkage disequilibrium, such as *APOC3* promoter polymorphisms (rs2854117 and rs2854116) [27] and polymorphisms of the *APOA1/C3/A4/A5* clusters [29,30]. For example, the *APOA5* SNP2 and SNP3 hypertriglyceridemic effects are at least partly explained by the miRNA regulation of an *APOA5* 3'UTR polymorphism (rs2266788) located on the same haplotype *APOA5**2. Our team previously demonstrated that this polymorphism creates a miRNA binding site for miR485-5p polymorphism [14]. Moreover, 5'UTR variants have also been described to be the target of miRNA regulations [31].

To conclude, literature suggested a potential post-transcriptional regulation of *APOC3* mRNA involving SstI S2 variant, and *in silico* studies predicted potential binding losses for 5 miRNAs, all expressed both in cell lines and human tissues. Altogether, our *in vitro* studies do not confirm the hypothesis of a direct liver or intestinal miRNA dysregulation to explain the hypertriglyceridemic effect of *APOC3* SstI variant, which remains at this time unexplained.

Conflict of interest

The authors declared they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support

Professor Philippe Moulin received grant from the Fondation de France (grant number 2013 38587).

Acknowledgments

The authors would like to thank Michel Lagarde for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.024>.

References

- [1] M.C. Jong, M.H. Hofker, L.M. Havekes, Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (3) (1999 Mar) 472–484.
- [2] H.N. Ginsberg, N.A. Le, I.J. Goldberg, J.C. Gibson, A. Rubinstein, P. Wang-Iverson, R. Nonum, W.V. Brown, Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo, *J. Clin. Investig.* 78 (5) (1986 Nov) 1287–1295.
- [3] E. Sebayek, S. Eisenberg, Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway, *J. Biol. Chem.* 266 (27) (1991 Sep 25) 18259–18267.
- [4] M. Sundaram, S. Zhong, M.B. Khalil, P.H. Links, Y. Zhao, J. Iqbal et al., Expression of apolipoprotein C-III in McA-BH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions, *J. Lipid Res.* 51 (1) (2010 Jan 1) 150–161.
- [5] J. Crosby, G.M. Peloso, P.L. Auer, D.R. Crosslin, N.O. Stitzel, L.A. Lange, Y. Lu, Z.Z. Tang, H. Zhang, G. Hindy, N. Masca, K. Stirrups, S. Kanoni, R. Do, G. Jun, Y. Hu, H.M. Kang, C. Xue, A. Goel, M. Farrall, S. Duga, P.A. Merlini, R. Asselta, D. Girelli, O. Olivieri, N. Martinelli, W. Yin, D. Reilly, E. Speliotes, C.S. Fox, K. Hveem, O.L. Holmen, M. Nikpay, D.N. Farlow, T.L. Assimes, N. Franceschini, J. Robinson, K.E. North, L.W. Martin, M. DePristo, N. Gupta, S.A. Escher, J.H. Jansson, N. Van Zuydam, C.N. Palmer, N. Wareham, W. Koch, T. Meitinger, A. Peters, W. Lieb, R. Erbel, L.R. König, J. Kruppa, F. Degenhardt, O. Gottesman, E.P. Bottinger, C.J. O'Donnell, B.M. Psaty, C.M. Ballantyne, G. Abecasis, J.M. Ordovas, O. Melander, H. Watkins, M. Orho-Melander, D. Ardisino, R.J. Loos, R. McPherson, C.J. Willer, J. Erdmann, A.S. Hall, N.J. Samani, P. Deloukas, H. Schunkert, J.G. Wilson, C. Kooperberg, S.S. Rich, R.P. Tracy, D.Y. Lin, D. Altshuler, S. Gabriel, D.A. Nickerson, G.P. Jarvik, L.A. Cupples, A.P. Reiner, E. Boerwinkle, S. Kathiresan, Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease, *N. Engl. J. Med.* 371 (1) (2014 Jul 3) 22–31, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1307095>.
- [6] Y. Ito, N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, J.L. Breslow, Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice, *Science* 249 (4970) (1990 Aug 17) 790–793.
- [7] K.W. van Dijk, P.C.N. Rensen, P.J. Voshol, L.M. Havekes, The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (3) (2004 Jun) 239–246.
- [8] D. Gaudet, V.J. Alexander, B.F. Baker, D. Brisson, K. Tremblay, W. Singleton, R.S. Geary, S.G. Hughes, N.J. Viney, M.J. Graham, R.M. Crooke, J.L. Witztum, J.D. Brunzell, J.J. Kastelein, Antisense inhibition of apolipoprotein C-III in patients with hypertriglyceridemia, *N. Engl. J. Med.* 373 (5) (2015 Jul 30) 438–447, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1400283>.
- [9] R.A. Hegele, P.W. Connelly, A.J. Hanley, F. Sun, S.B. Harris, B. Zinman, Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (11) (1997 Nov) 2753–2758.
- [10] M.J. Hoffer, E.J. Sijbrands, F.H. De Man, L.M. Havekes, A.H. Smelt, R.R. Frants, Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism, *Eur. J. Clin. Investig.* 28 (10) (1998 Oct) 807–812.
- [11] M. Groenendijk, R.M. Cantor, T.W. de Bruin, G.M. Dallinga-Thie, The apoAII-III gene cluster, *Atherosclerosis* 157 (1) (2001 Jul) 1–11.
- [12] C. Marçais, S. Bernard, M. Merlin, M. Ullmann, B. Mestre, L. Rochet-Mingret, A. Revol, F. Berthezene, P. Moulin, Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III 5s-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency, *Diabetologia* 43 (11) (2000 Nov) 1346–1352.
- [13] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 (2) (2004 Jan 23) 281–297.
- [14] C. Caussy, S. Charrière, C. Marçais, M. Di Filippo, A. Sassolas, M. Delay, V. Euthine, A. Jalabert, E. Lefai, S. Rome, P. Moulin, An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site, *Am. J. Hum. Genet.* 94 (1) (2014 Jan 2) 129–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.001>.
- [15] C. Caussy, S. Charrière, A. Meirhaeghe, J. Dalongeville, E. Lefai, S. Rome, C. Cuerq, V. Euthine, M. Delay, O. Marmontel, M. Di Filippo, M. Lagarde, P. Moulin, C. Marçais, Multiple microRNA regulation of lipoprotein lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a triglyceride-lowering haplotype harboring p.Ser474Ter, *Atherosclerosis* 246 (2016 Mar) 280–286, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.010>.
- [16] S. Charrière, S. Bernard, M. Aqalal, M. Merlin, S. Billon, L. Perrot, E. Le Coqull, A. Sassolas, P. Moulin, C. Marçais, Association of APOA5 -1131T > C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients, *Clin. Chim. Acta* 394 (1–2) (2008 Aug) 99–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.04.013>.
- [17] IPL, S. Bernant, A. Sérusclat, F. Targe, S. Charrière, O. Roth, J. Beaune, F. Berthezene, P. Moulin, Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects, *Diabetes Care* 28 (5) (2005 May) 1158–1162.
- [18] R.C. Lewontin, On measures of genetic disequilibrium, *Genetics* 120 (3) (1988 Nov) 849–852.
- [19] M. Kertesz, N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, E. Segal, The role of site accessibility in microRNA target recognition, *Nat. Genet.* 39 (10) (2007 Oct) 1278–1284.
- [20] A.J. Enright, B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander, D.S. Marks, MicroRNA targets in *Drosophila*, *Genome Biol.* 5 (1) (2003) R1.
- [21] Y. Song, L. Zhu, M. Richa, P. Li, Y. Yang, S. Li, Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis, *Lipids Health Dis.* 14 (2015 Apr 18) 32, <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0027-0>.
- [22] M.Y. Tsai, N.Q. Hanson, K.R. Copeland, I. Beheshti, U. Garg, Determination of a T/C polymorphism at nucleotide 3206 of the apolipoprotein C III gene by amplification refractory mutation system, *Clin. Chem.* 40 (12) (1994 Dec) 2235–2239.
- [23] C.F. Xu, P. Talmud, H. Schuster, R. Houlston, G. Miller, S. Humphries, Association between genetic variation at the APO A1-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia, *Clin. Genet.* 46 (6) (1994 Dec) 385–397.
- [24] O.W. Souverein, J.W. Jukema, S.M. Boekholdt, A.H. Zwinderman, M.W. Tanck, Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (4) (2005 Apr) 445–451.
- [25] K.L. Chien, M.F. Chen, H.C. Hsu, T.C. Su, W.T. Chang, C.M. Lee, Y.T. Lee, Genetic association study of APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and haplotypes on triglyceride and HDL cholesterol in a community-based population, *Clin. Chim. Acta* 388 (1–2) (2008 Feb) 78–83.
- [26] S. Su, M. Tang, M. Zhang, C. Cheng, X. Tang, The relationship between apolipoprotein CIII gene polymorphism and serum lipid levels in Han Chinese males, *Meta Gene* 1 (2013 Nov 15) 58–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgene.2013.09.005>.
- [27] M. Groenendijk, R.M. Cantor, N.H. Blom, J.L. Rotter, T.W. de Bruin, G.M. Dallinga-Thie, Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apoC-III promoter region in familial combined hyperlipidemia, *J. Lipid Res.* 40 (6) (1999 Jun) 1036–1044.
- [28] H. Esterbauer, E. Hell, F. Krempler, W. Patsch, Allele-specific differences in apolipoprotein C-III mRNA expression in human liver, *Clin. Chem.* 45 (3) (1999 Mar) 331–339.
- [29] P.J. Talmud, E. Hawe, S. Martin, M. Olivier, G.J. Miller, E.M. Rubin, L.A. Pennacchio, S.E. Humphries, Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides, *Hum. Mol. Genet.* 11 (24) (2002 Nov 15) 3039–3046.
- [30] M. Olivier, X. Wang, R. Cole, B. Gau, J. Kim, E.M. Rubin, L.A. Pennacchio, Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11, *Genomics* 83 (5) (2004 May) 912–923.
- [31] Y. Jin, C.G. Lee, Single nucleotide polymorphisms associated with MicroRNA regulation, *Biomolecules* 3 (2) (2013 Apr 9) 287–302, <http://dx.doi.org/10.3390/biom3020287>.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1. Baseline clinical characteristics and lipid parameters of the 200 type 2 diabetic patients according to their plasma triglyceride concentrations.

	NTG (n=100)	HTG (n=100)	<i>p</i> value
Age (years)	55.8 +/- 0.8	51.7 +/- 1.2	0.004
Sex (% women)	34	27	0.355
BMI (kg/m²)	29.1 +/- 0.5	30.6 +/- 0.7	0.093
HbA1c (%)	8.8 +/- 0.2	8.5 +/- 0.3	0.360
TC (mmol/l)	4,97 +/- 0.09	7.57 +/- 0.53	< 0.001
HDLc (mmol/l)	1,15 +/- 0.33	0.81 +/- 0.28	< 0.001
LDLc (mmol/l)	3.35 +/- 0.08	3.05 +/- 0.19	0.126
TG (mmol/l)	1.18 +/- 0.03	10.08 +/- 1.22	< 0.001

HTG: severe hypertriglyceridemic group (TG>15mmol/l), NTG: normotriglyceridemic group, BMI: body mass index, M: male, F: female.

Data are expressed as means +/-SEM. *p* values were determined by one way ANOVA test for quantitative variables or Chi² test for categorical variables. LDLc was determined by Friedwald formula in NTG group and by specific dosage after ultracentrifugation in HTG group.

Supplemental Table 2. Score predictions of miRNA binding potentially disrupted by the S2 rare allele of *APOC3* 3'UTR variant SstI.

	RegRNA ^a		PITA ^a	
	Allele S2	Allele S1	Allele S2	Allele S1
hsa-miR-138	<120	132	-8.08	-12.33
hsa-miR-185*	<120	134	-8.6	-12.86
hsa-miR-564	<120	<120	-5.48	-11.55
hsa-miR-1207-5p	131	151	-17.79	-20.95
hsa-miR-1270	<120	156	No binding	No binding

* Indicative relevant score threshold : RegRNA >160, PITA <-10.

Discussion Article 1

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à caractériser les variants de la 3'UTR du gène *APOC3* associés à l'hypertriglycéridémie et à étudier leur régulation éventuelle par des microARN. Après analyse de la 3'UTR d'*APOC3* dans notre cohorte composée de 100 patients diabétiques de type 2 avec hypertriglycéridémie sévère comparés à 100 patients diabétiques de type 2 normotriglycéridémiques (population contrôle) nous avons identifiés seulement deux variants sur l'intégralité de la 3'UTR d'*APOC3* : rs5128 et rs4225.

Les patients de notre population HTG ont une hypertriglycéridémie sévère. Nous avons choisi ce critère de sélection afin de mettre plus facilement en évidence les variants ayant potentiellement un effet puissant sur la régulation des TG. En effet la population HTG sévère a des fréquences de polymorphismes associés aux TG plus fréquentes qu'une population ayant une HTG modérée, ce qui pourrait expliquer les différences phénotypiques observées (116,200).

La population témoin utilisée dans notre étude est constituée de diabétiques de types 2 normotriglycéridémiques. Les données concernant la fréquence de SstI chez les DT2 sont controversées. Il est rapporté dans la littérature que l'association SstI-TG est plus significative dans le cas d'un patient non DT2 HTG comparée à celle d'un patient DT2 HTG (201). Dans une autre étude, sur une population indienne, il est décrit que la fréquence de SstI est plus élevée chez les DT2 (106). Or, la fréquence du variant SstI dans la population indienne de référence, habitants au Royaume Uni, est de 37% (données 1000 Genomes). Cette dernière est largement supérieure à la population caucasienne (environ 10%). Une autre étude sur une population française montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la fréquence de SstI chez des patients diabétiques versus des patients sains (202). Les fréquences alléliques observées de SstI et BbvI dans le groupe DT2 témoin NTG ne sont pas significativement différentes de la population générale caucasienne (données 1000 Genomes). Notre population témoin semble donc comparable à une population générale européenne en termes de fréquences alléliques des variants de la 3'UTR du gène *APOC3*. Il n'y a pas d'association particulière entre patients DT2 et le polymorphisme SstI dans notre cohorte.

Le variant SstI ou rs5128 est très étudié dans la littérature (>40 publications). C'est le polymorphisme le plus étudié du gène *APOC3*. De nombreuses études suggèrent l'association entre la présence du variant SstI et la concentration en TG dont une méta-analyse récente (100,108,116,201). Il est associé à la fois aux HTG modérées et sévères (68,69). Nos résultats montrent que l'allèle muté S2 est deux fois plus fréquent dans notre population de cas comparée à notre population témoin, ainsi il est associé à l'HTG dans notre cohorte. Une étude sur une population asiatique (taiwanais 165 cas HTG versus 163 contrôles) montre que l'allèle S2 n'est pas significativement associé aux TG (144). Cependant dans la population asiatique, la fréquence allélique du variant rare SstI est beaucoup plus élevée par rapport à la population caucasienne (fréquence de SstI : 34%, données 1000 Genomes contre 12.4% dans la population caucasienne).

Le variant BbvI ou rs4225 est peu étudié dans la littérature (#10 publications (64,77,78,99-104)). Dans notre étude la fréquence de l'allèle rare B2 est de 50.5% dans la population HTG et de 46% dans la population contrôle, elle est de 39.3% dans la population européenne (données 1000 Genomes). Nos résultats ne montrent pas de différence significative entre la population HTG et NTG, l'allèle muté B2 n'est pas associé significativement aux TG dans notre étude. Les données de la littérature divergent sur l'association du variant B2 à la triglycéridémie. Des études montrent une association significative entre la présence de BbvI et la concentration en TG (64,78,101). Cependant d'autres études montrent que la fréquence allélique de BbvI n'est pas associée aux TG (99,102,104). Il est suggéré dans une étude portant sur 5 biopsies de foie de femmes caucasiennes obèses hétérozygotes pour l'allèle S2 et B2 (1 cas homozygote B2), que la présence du variant B2 pourrait affecter la structure secondaire de la protéine, affectant la stabilité de la protéine (140). De même que pour SstI, la fréquence allélique de B2 dans la population asiatique est bien plus élevée que dans la population européenne, d'après les données 1000 Genomes elle est de 79.2% pour la population Est-asiatique et de 73.1% pour la population Sud-asiatique.

D'autres variants sont répertoriés sur la 3'UTR du gène *APOC3* dans la base de données 1000 Genomes, ces derniers ne font pas l'objet d'étude particulière. Ils n'ont pas été retrouvés dans notre cohorte, probablement dû au fait de leur faible fréquence et de leur origine ethnique non caucasienne pour la plupart (Tableau 12)(205). Les fréquences de ces variants étant inférieure à 1 %, ce sont plus probablement des variants rares

spécifiques à certains groupes de populations que de réels polymorphismes de population. Par ailleurs, bien que les polymorphismes aient par définition une fréquence > 1 %, notre population de 100 cas peut être de taille insuffisante pour détecter des variants peu fréquents.

Identification	Nomenclature	Allèles Majeur / mineur	Global MAF	Population des cas rapportés
rs548741530	c.*8A>G	A/G	0.000(G)	1 cas africain
rs201402310	c.*21A>C	A/C	-	1 cas (étude sur 662)
rs201360025	c.*35C>G	C/G	0.001(G)	2 cas africain
rs577085953	c.*96C>T	C/T	0.000(T)	1 cas européen
rs539003433	c.*99T>C	T/C	0.001(C)	1 africain 2 asiatique
rs570839541	c.*119C>T	C/T	-	
rs187628630	c.*139C>G	C/G	0.002(G)	1 cas africain, 3 cas américain, 4 cas européen, 1 cas asiatique
rs11540884	c.*149T>A	T/A	0.005(A)	25 cas africain et 1 cas américain
rs113565160	c.*184T>A	T/A	-	
rs541512801	c.*187G>C	G/C	0.000(C)	1 cas africain

Tableau 12 : Classification des variants rapportés dans la base SNP de Pubmed sur la région 3'UTR d'APOC3, 5007 personnes ont été analysées sur cette 3'UTR sous 1000 Genomes toutes origines ethniques confondues sauf pour le rs201402310 (662 patients)

Notre analyse nous permet de montrer que le variant SstI est en déséquilibre de liaison complet avec le variant BbvI. Ce déséquilibre de liaison a été préalablement répertorié dans la littérature mais sur de très petits effectifs (5 patients) (140). La valeur de D' rapportée dans 1000 Genomes comme score de déséquilibre de liaison entre SstI et BbvI est de 1.0 qui confirme le déséquilibre de liaison complet entre les deux variants retrouvés dans notre étude. De plus les polymorphismes du promoteur -482 et -455 du gène APOC3 sont en fort déséquilibre de liaison avec le variant SstI (206). Ces deux variants du promoteur correspondent à un élément de réponse à l'insuline, ils induisent une diminution du mécanisme de régulation négative de l'insuline. D'autres déséquilibres de liaison sont décrits entre SstI et des variants présents sur APOA5, gène du cluster APOA1/C3/A4/A5. Dans certaines études, il semblerait que l'effet sur les TG soit dû aux variants APOA5 associés (102). Cependant, cette hypothèse est controversée et la présence de l'haplotype APOA5*2 (défini par la présence des variants suivants :

- 1131T>C (rs662799), - 3A>G (rs651821), 751G>T (rs2072560), et 1891T>C (rs2266788)) associée à celle de SstI exacerberait l'effet sur les TG, mais il existerait un effet indépendant sur les TG de SstI (136). Ainsi, *APOA5* et *APOC3* influencent indépendamment la concentration en TG (106).

La présence de SstI favoriserait l'expression de l'ARNm d'*APOC3*; comme le montre une étude sur cinq biopsies hépatiques de personnes obèses hétérozygotes pour l'allèle rare S2 (140). Les polymorphismes du promoteur du gène *APOC3* en fort déséquilibre de liaison avec le variant SstI sont également associés à une augmentation de l'ARNm d'*APOC3* (207). Il est suggéré dans la littérature que l'expression de l'ARNm d'*APOC3* serait spécifique de l'haplotype du cluster *APOA1/C3/A4/A5* c'est-à-dire que l'expression de l'ARNm pourrait varier selon les haplotypes (140).

Le variant SstI est associé à des concentrations plasmatiques plus élevées d'ApoC-III (37,44,71,72,73). Le mécanisme moléculaire induisant une élévation de la concentration en ApoC-III n'est pas encore élucidé cependant, une publication suggère que cela pourrait être dû à une stabilisation de l'ARNm d'*APOC3* chez les porteurs de l'allèle S2. Ceci induirait une meilleure activité d'ApoC-III et donc une plus grande inhibition de l'activité de la LPL (210). Les variants du promoteur peuvent représenter un rôle contributif en présence de SstI dans le développement d'hypertriglycémie en augmentant la concentration d'ApoC-III. Cependant malgré le déséquilibre de liaison l'impact sur les TG semble être dû au variant SstI (135).

Les données de la littérature suggèrent une régulation post-transcriptionnelle afin d'expliquer l'association SstI-TG. Nous avons émis l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle par les microARN. Nous avons cherché à démontrer la régulation post-transcriptionnelle d'*APOC3* par la perte de fixation des microARN candidats sélectionnés après études in silico, au niveau du variant SstI. En effet la perte de fixation d'un microARN induirait une levée d'inhibition et donc une augmentation de l'expression de l'ARNm d'*APOC3* soit une inhibition de la LPL et donc l'induction d'une HTG.

Dans notre étude, le variant BbvI n'est pas associé à l'HTG, de ce fait nous avons étudié une éventuelle régulation post-transcriptionnelle par microARN exclusivement sur le variant SstI. Cependant une étude portant sur une population de 400 chinois montre que le génotype B2B2 est associé significativement à une augmentation de concentration

d'*APOC3* (p=0.03) comparée au génotype B1B1. Et l'allèle B1 était significativement associé à une diminution du taux de TG. Cette étude a montré la perte de fixation du microARN miR-4271 en présence de l'allèle rare B2. En présence de l'allèle sauvage B1 le microARN miR-4271 induisait la suppression de la traduction d'*APOC3* (205).

5 microARN sont ressortis de l'étude in silico, nous avons pris soin de vérifier leur expression dans nos modèles cellulaires. Par ailleurs, les profils d'expression sont similaires entre les lignées cellulaires et les tissus humains d'origine commune ce qui suggère que l'expression des microARN au sein des modèles cellulaires est assimilable à l'expression au niveau physiologique. De plus, les niveaux d'expression de ces microARN candidats sont de même ampleur que celui du microARN hsa-miR-485-5p, microARN validé dans l'étude sur *APOA5* comme régulateur (6). On peut penser que si un microARN candidat ou présent dans le modèle cellulaire avait un effet sur notre construction, nous l'aurions détecté dans notre modèle.

L'association TG-SstI n'est pas aussi important comparé à celui de variants d'*APOA5* par exemple. De ce fait nous pourrions passer à côté d'un effet car la mise en évidence de différence serait faible, et la technique utilisée ne serait pas assez sensible. Toutefois dans l'étude sur la *LPL* (7), des effets inférieurs à 10% ont pu être mis en évidence.

Malgré les arguments de la littérature en faveur d'une possible régulation post-transcriptionnelle et les pertes potentielles de site de fixation détectée en analyse bio-informatique, nos données fonctionnelles in vitro ne sont pas en faveur d'une régulation directe par un microARN hépatique ou intestinal pour expliquer l'effet hypertriglycéridémiant du polymorphisme Sst1 de l'*APOC3*.

Etude des variants situés sur la 3'UTR du gène *LMF1*, et leur potentielle régulation par des microARN

Dans le cadre de l'étude de l'implication des variants de la région 3'UTR des gènes impliqués dans la régulation de la lipolyse intravasculaire des TG nous avons ensuite considéré le gène *LMF1*, peu étudié dans la littérature et non systématiquement rendu en diagnostic au sein du laboratoire jusqu'à 2016. Ce gène est impliqué dans la régulation du métabolisme des TG par son effet sur la maturation post-transcriptionnelle de la LPL. Tout en mettant en place le rendu diagnostic pour ce gène chez les patients présentant une hypertriglycémie, nous avons systématiquement étudié la région 3' non transcrite de ce gène.

Notre travail vise à identifier si des variants de la 3'UTR du gène *LMF1* retrouvés chez des patients hypertriglycémiques pourraient médier une régulation post-transcriptionnelle du gène *LMF1* par des microARN. Nous avons cherché à mettre en évidence une création de site de fixation de microARN consécutive à la présence d'un SNP sur sa région 3'UTR qui engendrerait une HTG. En effet, la présence d'un SNP créerait un site de fixation pour un microARN, ce dernier réprimerait la traduction du messager du gène *LMF1* ce qui diminuerait l'activation de la LPL et donc induirait une HTG (Figure 28).

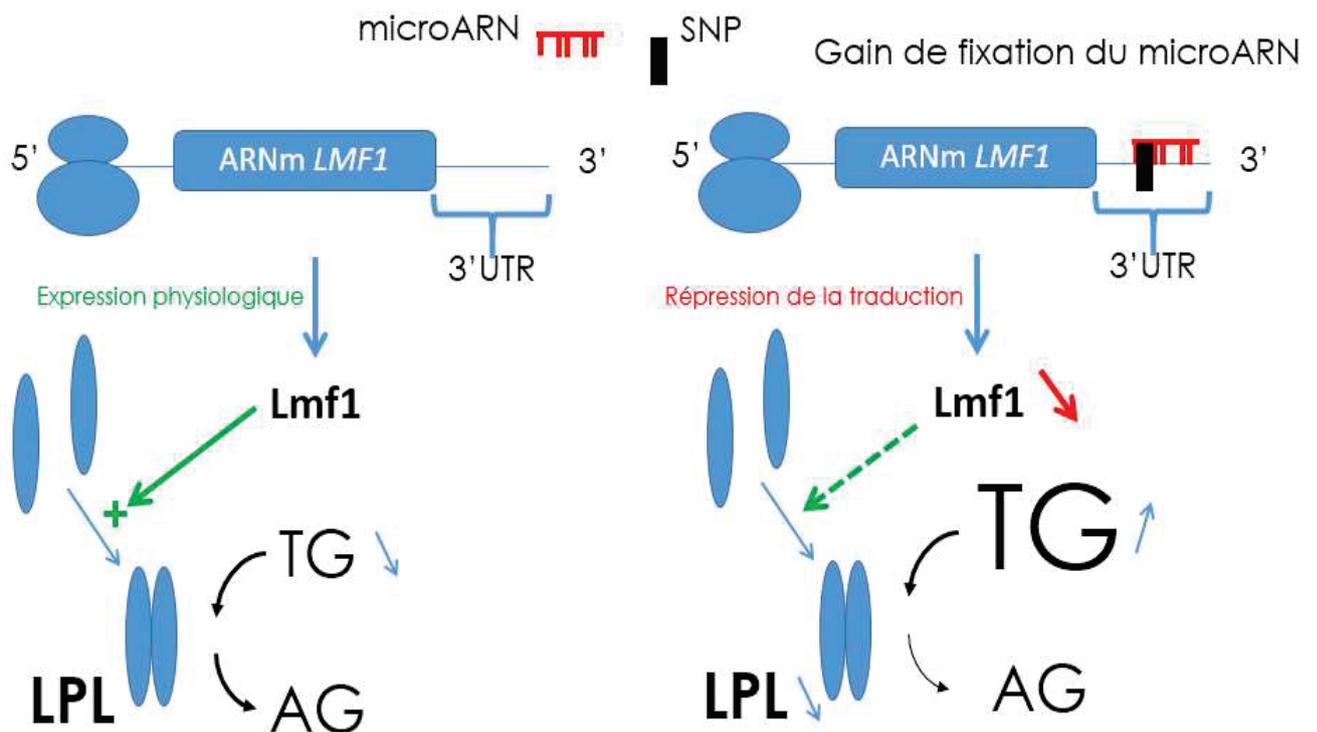


Figure 28 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail

Cette étude a donc consisté à :

- Identifier des variants de la 3'UTR du gène *LMF1* en criblant des patients hypertriglycéridémiques ([TG]>15mmol/L)
- Rechercher par étude bio-informatique les gains potentiels de sites de fixation de microARN induits par les variants identifiés
- Valider la fonctionnalité des couples microARN/variant identifiés in vitro

Matériels et méthodes

Population étudiée

Nous avons étudié une population de 385 patients hypertriglycéridémiques type V d'après la classification de Frederickson ([TG]>15mmol/L). Les patients atteints d'hyperchylomicronémie ont été également analysés pour tous les gènes de prédisposition à l'hyperchylomicronémie : *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, et *LMF1* l'analyse n'a révélé aucune mutation délétère décrite sur ces gènes.

Analyse de la 3'UTR de *LMF1*

L'ADN génomique a été extrait à partir de sang périphérique prélevé sur tube EDTA en utilisant le kit FlexiGene® ADN (QIAGEN SpA, Milan, Italie). L'intégralité de la séquence 3'UTR du gène *LMF1* (50 ng) a été amplifiée par PCR en utilisant les couples d'amorces suivants (Invitrogen Life Technologies) : couple 1 : brin sens 5'-gcaccagaaataaaggcgaag-3', brin antisens 5'-cacaccattgaagaggggaac-3'; couple 2 : brin sens 5'-tcctgacaccttctccactac-3', brin antisens 5'-tccatctgcacctcacagac-3'; couple 3 : brin sens 5'-tcctatccctcatctccacc-3', brin antisens 5'-ggggaggagggtacaagaac-3' Les produits de PCR ont été analysés en utilisant la méthode de dénaturation par chromatographie en phase liquide à haute performance (dHPLC, Transgenomic, Omaha, NE, USA) et en utilisant un mélange 1:1 avec un amplicon contrôle (type sauvage). Les variants ainsi mis en évidence ont été confirmés par séquençage en méthode Sanger (3500 DX Genetic Analyzer - Thermo Fisher Scientific).

Études in silico

Afin de déterminer les gains de site de fixation de microARN en présence de variants identifiés préalablement par analyse génétique sur la 3'UTR de *LMF1*, nous avons comparé les résultats de deux logiciels de prédictions de site de liaison des microARN : PITA (184) et RegRNA (211).

Le score du logiciel PITA prend en compte l'énergie libre acquise lors de la formation du complexe microARN-cible, le coût énergétique dû au non appariement de la cible pour la rendre accessible au microARN, la conformation de la structure secondaire de l'ARNm et les cibles de l'ARNm des régions 3' et 5' UTR. Le score est considéré comme pertinent lorsqu'il est inférieur à -10.

Le score du logiciel RegRNA prend en compte la complémentarité des séquences, l'énergie minimale nécessaire pour former la liaison microARN-cible, et la conservation au cours de l'évolution. Un score est considéré comme pertinent lorsqu'il est supérieur à 160.

Les scores de liaison de microARN à la séquence 3'UTR de *LMF1* sauvage ou à une séquence mutée (présence d'un ou plusieurs variants) ont été comparés.

Séquence de la 3'UTR de *LMF1* sauvage utilisée, numéro d'accèsion Refseq NM_022773.2:

```
ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
CTGCGCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTACATACTGTGGCGGCTCCAGGCCCTG
CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
GGCCATCCTGACACCTTCCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
GACACGCCCGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
TTGGCCCCGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCCGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATACCACTTACC
AGCTTACTCGAAAA
```

Les séquences mutées utilisées sont détaillées en Annexe 3 de ce manuscrit.

Constructions luciféras contenant la région 3'UTR du gène *LMF1*

La séquence 3'UTR de *LMF1* sauvage a été synthétisée et insérée dans le vecteur pEZX-MT01 (GeneCopoeia™, Labomics SA) en aval d'un gène rapporteur de la luciférase

(lui-même en aval d'un promoteur SV40), afin de créer le vecteur pEZX-MT01-*LMF1*-wt (pEZX-wt). La renilla codée par le même vecteur a été utilisée comme contrôle interne, pour normaliser l'activité luciférase. Afin de déterminer l'effet individuel et l'effet combiné de différents variants retrouvés dans notre cohorte, des mutagenèses dirigées ont été réalisées pour introduire les allèles mineurs c*41G>A rs142228888, c*231C>A rs75476513, c*512G>A rs117039680, c*512G>T, c*530G>A rs139657279, c*746C>T rs181823968, c*789G>A, c*835G>C rs7206528, c*894G>A rs7206489 dans pEZX-wt, avec notamment deux constructions haplotypiques pour les variants c*41G>A rs142228888, c*231C>A rs75476513 et c*835G>C rs7206528 formant les vecteurs pEZX-41-231-835 et pEZX-231-835 ; puis pour les variants c*137G>A rs147193806, c*296G>A rs114890365 et c*707C>T rs114256933 formant l'haplotype pEZX-137-296-707. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Dosage de l'activité luciférase après transfection cellulaire

Nous avons utilisé la lignée de cellules humaines HEK-293T (lignée de cellules de rein embryonnaire humaine, ATCC® CRL-11268™) cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant du glucose à 25mM, 2mM de glutamine, 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de sulfate de streptomycine, complété avec du sérum de veau fœtal décomplementé (10%). Les cellules HEK-293T (2,5.10⁵ cellules/puits) ont été cultivées dans des plaques 12 puits 24 heures avant la transfection et ont été maintenues dans le milieu précédemment décrit une heure avant la transfection. Toutes les transfections ont été réalisées avec le transfectant jetPRIME® (Polyplus transfection) en utilisant 2 µL de jetPRIME pour 1µg d'ADN de constructions luciférases.

Nous avons utilisé comme contrôle positif, afin de vérifier les conditions de transfection et l'action de microARN endogène du modèle cellulaire HEK-293T, des constructions exprimant la 3'UTR d'*APOA5* associé à un gène rapporteur de la luciférase (pEZX-MT01-APOA5-SNP1-T vecteur (pEZX-T) et pEZX-MT01-APOA5-SNP1-C vecteur (pEZX-C)) déjà démontrées comme régulées par le microARN endogène hsa-miR-485-5p (6).

L'activité de la luciférase a été mesurée 24 heures après la transfection sur le lysat de cellules en utilisant le kit Dual-Glo® Luciferase Reporter Assay System (Promega) avec un luminomètre Glomax™ 20/20 (Promega) en utilisant un temps d'acquisition de 10 secondes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage et normalisés sur la condition sauvage. Toutes les expériences de transfection ont été réalisées en triplicat et répétées au moins trois fois.

Résultats

Analyse de la 3'UTR de LMF1

L'analyse de la 3'UTR de *LMF1* des 385 patients ayant présenté une hyperchylomicronémie a été réalisée. Les variants ainsi que leurs fréquences retrouvées dans cette cohorte sont décrits dans le tableau suivant (Tableau 13).

Variant	Rs	Fréquence génotypique (%)	Fréquence allélique (%)	Fréquence allélique 1000 Genomes EUR (%)
c.*41G>A	rs142228888	1,04	0,52	0,20
c.*137G>A	rs147193806	0,26	0,13	0,00
c.*175G>A	rs190944528	0,26	0,13	0,00
c.*231C>A	rs75476513	8,05	4,03	4,30
c.*242C>G	rs544383210	0,52	0,26	0,10
c.*296G>A	rs114890365	0,26	0,13	0,00
c.*389G>A	rs568963656	0,26	0,13	0,00
c.*512G>A	rs117039680	4,68	2,34	2,60
c.*512G>T	NA	0,26	0,13	NA
c.*530G>A	rs139657279	1,56	0,78	0,40
c.*625-626del(AT)	rs540696521	0,26	0,13	0,00
c.*707C>T	rs114256933	0,26	0,13	0,00
c.*746C>T	rs181823968	1,04	0,52	0,30
c.*789G>A	NA	0,26	0,13	NA
c.*791C>T	rs150814779	0,52	0,26	0,00
c.*803G>A	rs775785513	0,26	0,13	NA
c.*835G>C	rs7206528	8,83	4,42	4,60
c.*894G>A	rs7206489	2,08	1,04	0,70

Tableau 13 : Synthèse des données d'analyse de la 3'UTR de *LMF1* dans notre cohorte de patients

La colonne 1000 Genomes EUR représente la fréquence dans la population générale européenne, elle se base sur des données génétiques issues de résidents de l'Utah ayant des ancêtres européens, de finlandais, d'anglais, d'ibériens, et de toscans (212). NA correspond à Non Available soit absence de données.

Les fréquences de nos variants sont faibles, cependant elles sont pour la plupart surreprésentées par rapport à la population générale européenne rapportée dans 1000 Genomes ($p < 0.05$).

Dans notre cohorte, 18 variants ont été identifiés sur l'intégralité de la 3'UTR de *LMF1* de 898 nucléotides de longueur (Tableau 13). Ces variants ne sont pas rapportés dans la littérature. Nous avons choisi de tester fonctionnellement 12 de ces variants. Le critère de décision principal pour l'étude fonctionnelle était basé sur leur fréquence au sein de notre cohorte. Ceux ayant une fréquence allélique inférieure ou égale à 0.26% dans notre cohorte n'ont pas été sélectionnés. Les variants : c*175G>A rs190944528, c*242C>G rs544383210, c*389G>A rs568963656, c*625_626del(AT) rs540696521, c*791C>T, c*803G>A rs775785513 furent concernés. Cependant ce critère n'était pas exclusif et lorsqu'un variant avait une fréquence allélique inférieure à 0.26% mais n'avait pas de numéro de référence rs nous avons choisi de l'étudier. Ce fut le cas pour les variants c*512G>T, c*789G>A et l'haplotype contenant les variants c*137G>A, c*296G>A, c*707C>T.

L'analyse des différents haplotypes retrouvés dans notre cohorte nous montre que deux haplotypes sont retrouvés. L'haplotype comprenant les variants c*137G>A rs147193806, c*296G>A rs114890365 et c*707C>T rs114256933 (137-296-707), et l'haplotype possédant les variants c*41G>A rs142228888, c*231C>A rs75476513 et c*835G>C rs7206528 (41-231-835). Pour ce dernier on remarque que le variant c*41 n'est jamais retrouvé seul, il est toujours associé à la présence des variants c*231 et c*835. De même le variant c*231 n'est jamais retrouvé en l'absence du variant c*835. De ce fait les variants c*41 et c*231 sont en déséquilibre de liaison complet avec le variant c*835. Ces données ont été confirmées après analyse des haplotypes avec le logiciel Phase (213).

Etudes bio-informatique de l'impact des variants sur le gain d'un site de fixation d'un microARN

Nous avons étudié le gain d'un site de fixation potentiel d'un microARN en présence d'un variant ou d'un haplotype décrit précédemment, comparée à la séquence sauvage via des logiciels de prédiction : RegRNA et PITA. Cette étude nous a permis de mettre en évidence un très grand nombre de microARN candidats pour chaque variant au

vu des scores de prédiction obtenus, résultats en annexe 4. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux scores obtenus pour les variants c*231C>A, c*512G>A et c*530G>A, variants ayant une activité luciférase significativement diminuée par rapport à la séquence sauvage.

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*231C	muté c*231A	sauvage c*231C	muté c*231A
hsa-miR-1233	129	137	NA	NA
hsa-miR-1251	<120	<120	NA	-14,45
hsa-miR-1296	132	140	NA	NA
hsa-miR-1306	<120	<120	NA	-19,6
hsa-miR-132*	<120	<120	NA	-16
hsa-miR-149	<120	147	-15,15	NA
hsa-miR-149*	<120	<120	NA	-19,65
hsa-miR-1976	<120	120	NA	-11,76
hsa-miR-2114	131	139	NA	NA
hsa-miR-218-1*	<120	134	NA	-16,7
hsa-miR-23a*	124	136	NA	-29
hsa-miR-23b*	<120	124	NA	-18,3
hsa-miR-2909	<120	121	NA	NA
hsa-miR-29b-1*	<120	129	NA	NA
hsa-miR-29b-2*	<120	132	NA	NA
hsa-miR-30c-1*	144	148	NA	NA
hsa-miR-30c-2*	146	152	NA	NA
hsa-miR-3140	<120	127	NA	NA
hsa-miR-3150	<120	122	NA	NA
hsa-miR-3155	<120	125	NA	NA
hsa-miR-331-3p	152	147	-15,5	-16,2
hsa-miR-339-5p	120	125	NA	NA
hsa-miR-345	<120	135	NA	-20,66
hsa-miR-3670	126	130	NA	NA
hsa-miR-3692*	<120	122	NA	NA
hsa-miR-3943	121	129	NA	NA
hsa-miR-4268	<120	120	NA	-19,03
hsa-miR-4308	120	121	-15	NA
hsa-miR-4314	138	138	-18	-18,3
hsa-miR-502-5p	<120	<120	NA	-19
hsa-miR-615-3p	121	125	NA	NA
hsa-miR-659	<120	125	NA	NA
hsa-miR-664*	<120	144	NA	-22,6
hsa-miR-760	<120	125	NA	-24,05
hsa-miR-769-3p	121	129	NA	NA
hsa-miR-892b	<120	137	NA	-23,72

Tableau 14 : Scores de prédiction pour le variants c*231C>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA
NA correspond à Non Available soit absence de données

D'après les données du Tableau 14, on peut noter que pour le variant c*231C>A, les microARN hsa-miR-345, hsa-miR-664* et hsa-miR-892b ont de bons scores de prédiction concordants entre les deux logiciels de prédiction utilisés RegRNA et PITA. Ces microARN semblent être de bons candidats pour réguler l'expression de l'ARNm de *LMF1* au niveau du variant c*231C>A.

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*512G	muté c*512A	sauvage c*512G	muté c*512A
hsa-miR-105*	<120	123	-11.51	-12.21
hsa-miR-1293	<120	128	-23	-23,4
hsa-miR-149	<120	122	-26,1	-17
hsa-miR-188-3p	145	149	-12,9	-11,72
hsa-miR-221	124	128	-20,5	-20,2
hsa-miR-3176	120	120	-19.4	-20.5
hsa-miR-323-5p	<120	123	NA	NA
hsa-miR-323b-5p	<120	121	-12.2	-12.9
hsa-miR-362-5p	123	127	-15,2	-15,6
hsa-miR-3650	132	148	-20.8	-21.2
hsa-miR-3656	<120	125	-20.71	-21.11
hsa-miR-574-5p	<120	125	-15	-15,4
hsa-miR-592	<120	120	-10,74	-11,34
hsa-miR-599	<120	125	-9,5	-10,1
hsa-miR-609	<120	120	-10,7	-9,7
hsa-miR-762	122	122	-27	-28.1
hsa-miR-892a	<120	122	-11,02	-11,02

Tableau 15 : Scores de prédiction pour le variants c*512G>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA
NA correspond à Non Available soit absence de données

D'après les données du Tableau 15, on peut noter que pour le variant c.*512G>A, le microARN hsa-miR-1293 ayant de bons scores de prédiction concordants entre les deux logiciels de prédiction utilisés RegRNA et PITA semble le microARN candidat le plus prometteur pour réguler l'expression de l'ARNm de *LMF1* au niveau du variant c.*512G>A.

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*530G	muté c*530A	sauvage c*530G	muté c*530A
hsa-miR-1247	136	140	NA	-23,9
hsa-miR-1260	<120	124	-17,5	-18,4
hsa-miR-1260b	<120	120	NA	-17,5
hsa-miR-1324	<120	122	NA	NA
hsa-miR-135a	133	137	NA	NA
hsa-miR-135b	137	141	NA	NA
hsa-miR-155*	123	139	NA	-13,5
hsa-miR-1825	<120	<120	NA	-16,1
hsa-miR-188-3p	145	161	-22,01	-22,91
hsa-miR-1910	<120	130	NA	NA
hsa-miR-192*	<120	124	NA	NA
hsa-miR-193a-3p	132	136	NA	NA
hsa-miR-193b	131	135	NA	NA
hsa-miR-216a	<120	134	NA	-19,21
hsa-miR-224*	130	133	NA	NA
hsa-miR-298	<120	120	NA	NA
hsa-miR-32	<120	<120	NA	-10,76
hsa-miR-337-3p	<120	120	NA	NA
hsa-miR-3651	126	130	NA	NA
hsa-miR-3692	<120	132	NA	-13,7
hsa-miR-454*	<120	120	NA	NA
hsa-miR-487a	<120	<120	NA	-13,4
hsa-miR-487b	<120	<120	NA	-13,7
hsa-miR-532-3p	123	139	-21,6	-22,5
hsa-miR-576-5p	<120	125	NA	NA
hsa-miR-589*	120	124	NA	NA
hsa-miR-605	<120	131	-17,8	-18,4
hsa-miR-770-5p	<120	125	NA	-24,2

Tableau 16 : Scores de prédiction pour le variants c*530G>A des différents microARN candidats obtenus avec les logiciels RegRNA et PITA
NA correspond à Non Available soit absence de données

D'après les données du Tableau 16, on peut noter que pour le variant c.*530G>A, les microARN hsa-miR-1247, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-216a, hsa-miR-3692, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-605 et hsa-miR-770-5p ont de bons scores de prédiction concordants entre les deux logiciels de prédiction utilisés RegRNA et PITA. Ainsi ils semblent être les microARN candidats les plus pertinents pour réguler l'expression de l'ARNm de *LMF1* au niveau du variant c.*530G>A.

Vérification in vitro de l'impact fonctionnel des variants sur la liaison des microARN

Nous avons vérifié l'impact de la présence des variants sur le gain d'un site de fixation pour un microARN et donc l'inhibition d'expression de *LMF1*. On s'attend donc à une diminution de l'expression luciférase de la construction contenant les variants d'intérêts en cas de création d'un site de liaison d'un microARN exprimé de manière endogène. Pour cela nous avons utilisé un vecteur commercial contenant l'intégralité de la 3'UTR de *LMF1* sauvage (pEZX-wt) couplé à un gène rapporteur de la luciférase de luciole. Nous avons utilisé les vecteurs mutés pour les différents variants mis en évidence : pEZX-41, pEZX-231, pEZX-512GA, pEZX-512GT, pEZX-530, pEZX-746, pEZX-789, pEZX-835, pEZX-894 et pour l'étude des haplotypes pEZX-137-296-707, pEZX-41-231-835, pEZX-231-835, couplés au gène rapporteur de la luciférase de luciole également. Nous avons ainsi comparé l'activité luciférase émise en présence de pEZX-wt à celle des vecteurs mutés dans la lignée cellulaire humaine de rein embryonnaire HEK-293T. *LMF1* est exprimé ubiquitairement, nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire HEK-293T, lignée facile d'entretien et robuste après transfection (148).

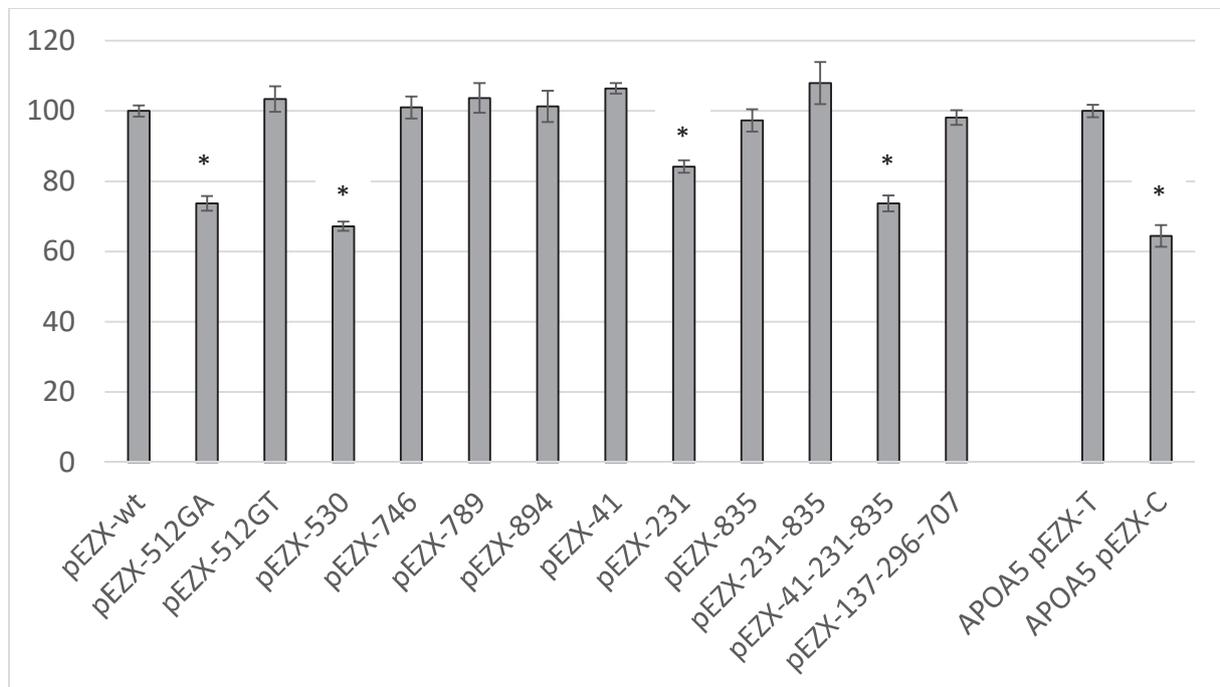


Figure 29 : Représentation de l'activité luciférase (% normalisé sur le pEZX-wt) des différentes transfections par des vecteurs contenant la 3'UTR de *LMF1* mutée et représentation de l'activité luciférase de notre contrôle interne (vecteur APOA5) (% normalisé sur le pEZX-T)

L'activité luciférase n'a pas été significativement différente entre le vecteur pEZX-wt correspondant à la séquence 3'UTR sauvage du gène *LMF1* et les vecteurs pEZX-512GT, pEZX-746, pEZX-789, pEZX-894, pEZX-41, pEZX-835, pEZX-231-835, pEZX-137-296-707 dans le type cellulaire étudié. Ces résultats suggèrent que ces différents variants dans notre modèle n'induisent pas un gain de site de fixation pour un microARN. Cependant l'activité luciférase est significativement différente pour les vecteurs pEZX-512GA, pEZX-530, pEZX-231 et pEZX-41-231-835. Ces résultats suggèrent que dans notre modèle, les variants c*512G>A, c*530G>A, et c*231C>A induiraient un gain de site de fixation d'un microARN exprimé dans notre modèle cellulaire. L'haplotype pEZX-41-231-835 présente une activité significativement diminuée. Cependant au vu des résultats des différents variants exprimés isolément, seul le variant c*231C>A induirait le gain d'un site de fixation pour un microARN endogène. Afin de vérifier la validité de notre modèle nous avons utilisé des vecteurs contrôles d'*APOA5* précédemment décrits comme étant régulés par le microARN hsa-miR-485-5p : on retrouve bien une diminution significative d'environ 60% de l'activité luciférase avec le vecteur pEZX-C comme attendu (6) (Figure 29).

Discussion

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à caractériser les variants de la 3'UTR du gène *LMF1* et à étudier leur régulation éventuelle par des microARN.

Les patients de notre population ont une histoire d'hypertriglycéridémie sévère. Nous avons choisi cette population afin de mettre plus facilement en évidence une association des variants retrouvés avec les TG, et de permettre la détection des polymorphismes spécifiques à cette population. Les fréquences des différents variants retrouvés restent faibles. Cependant pour la plupart des variants la fréquence allélique de notre cohorte est plus de deux fois supérieure à la fréquence allélique décrite dans 1000 Genomes EUR (Tableau 13). Pour les variants c*231, c*512G>A, c*835 et c*894, cette augmentation n'est pas retrouvée. La population rapportée dans 1000 Genomes EUR correspond à une représentation de la population générale européenne mais nous n'avons aucune donnée sur leur triglycéridémie. La probabilité dans cette population

générale de personnes hypertriglycéridémiques ayant une HTG sévère est $<1/10'000$ ce qui rend improbable un biais de sous-estimation de l'association des variants retrouvés sur la 3'UTR de *LMF1* aux TG. Dans l'idéal il faudrait explorer cette 3'UTR sur une population témoin normotriglycéridémique, travail qui reste envisageable et nous permettrait d'associer significativement des variants à l'HTG dans cette cohorte.

D'autres variants sont répertoriés sur la 3'UTR du gène *LMF1* dans la base de données de NCBI. En effet, 137 SNP sont décrits dans NCBI avec association d'un numéro rs, tous ces SNP sont extrêmement rares. Ils n'ont pas été retrouvés dans notre cohorte, probablement dû au fait de leur faible fréquence et de leur origine ethnique non caucasienne pour la plupart.

Au vu de la découverte et analyse récente du gène *LMF1*, nous n'avons pas assez d'éléments pour mettre en évidence des déséquilibres de liaison des variants retrouvés sur la 3'UTR avec par exemple, des variants d'autres gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des TG comme décrits pour *APOC3* ou des variants codants de *LMF1* ou des variants de son promoteur. Cependant au sein de notre cohorte, nous avons pu remarquer que certains variants étaient en déséquilibre de liaison. C'est le cas pour les variants c*137G>A rs147193806, c*296G>A rs114890365, et c*707C>T rs114256933 qui formerait un haplotype, ce dernier n'a été retrouvé qu'une fois dans notre cohorte. Les variants c*41G>A rs142228888, c*231C>A rs75476513 et c*835G>C rs7206528 formeraient trois haplotypes différents. Le variant c*41 n'est jamais retrouvé seul, il est toujours associé à la présence des variants c*231 et c*835 : haplotype 41-231-835. De même le variant c*231 n'est jamais retrouvé en l'absence du variant c*835, haplotype 231-835. De ce fait les variants c*41 et c*231 sont en déséquilibre de liaison complet avec le variant c*835 dans notre cohorte. Cependant le variant c*835 a été retrouvé seul, haplotype 835.

L'étude sur la régulation post-transcriptionnelle de *LMF1* par des microARN, au niveau des variants sélectionnés retrouvés sur la 3'UTR de *LMF1*, et testés fonctionnellement in vitro, permet de mettre en évidence trois variants : c*231C>A, c*512G>A, et c*530G>A ayant une activité luciférase significativement diminuée par rapport à la séquence sauvage de la 3'UTR de *LMF1* dans notre modèle. Ce qui semblerait confirmer notre hypothèse de départ, à savoir la création d'un site de fixation d'un microARN endogène en présence d'un variant sur la 3'UTR serait associée à l'HTG.

Les tableaux 14, 15 et 16 représentent les scores de prédiction des gains de site de fixation pour certains microARN. Il serait donc intéressant de tester individuellement l'effet de chacun des microARN candidats pour le variant concerné après avoir vérifié son expression dans le tissu cible et dans le modèle cellulaire utilisé. Concernant les microARN candidats identifiés, les logiciels utilisés (PITA et RegRNA) sont des logiciels de prédiction et peuvent ne pas mettre en évidence tous les candidats potentiels ou prédire de « faux » candidats. Les scores obtenus dans notre étude avec ces logiciels de prédiction restent discutables selon les seuils sélectionnés. Lors de l'étude sur *APOA5* (6), les scores obtenus étaient meilleurs, ce qui pourrait suggérer qu'aucun des microARN mis en évidence dans cette étude n'aurait d'effet. Cependant les scores de prédiction obtenus dans l'étude de la région 3'UTR de la LPL (7) étaient de même ampleur. Cependant il n'est pas exclu qu'aucun des microARN candidats sélectionnés ne montrent d'effet, ni que la régulation ne soit pas indirecte, ou que l'effet soit dû à un déséquilibre de liaison. Ainsi cette étude doit être complétée.

Nos vecteurs ont été créés qu'avec la 3'UTR de *LMF1*. Il est possible que la conformation secondaire physiologique de l'ARNm de *LMF1* nécessite la présence de l'intégralité de la séquence de l'ARNm afin de pouvoir induire une création de site de fixation d'un microARN. De plus, le modèle utilisé (constructions luciférase) étant un modèle in vitro nous ne pouvons garantir le même impact au niveau physiologique, c'est une limite de cette étude.

Ces résultats préliminaires sont en faveur d'une régulation de certains variants par des microARN. Des manipulations supplémentaires sont désormais nécessaires pour permettre de conclure sur l'effet d'un microARN candidat en présence d'un variant spécifique sur la 3'UTR du gène *LMF1*. La création d'un site de fixation pour un microARN d'intérêt en présence d'un variant de la 3'UTR du gène *LMF1* induirait une diminution de l'expression de *Lmf1* et permettrait d'expliquer l'effet hypertriglycéridémiant de la présence de variant de la 3'UTR de *LMF1* et ainsi l'association à l'hypertriglycéridémie chez les patients présentant ces variants.

Article2: New rare genetic variants of *LMF1* gene associated with hyperchylomicronemia

Cet article a été soumis le 7 Mai 2017 à JCEM (The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism), mail de soumission en Annexe 5 de ce manuscrit.

Depuis 2007 le gène *LMF1* émerge comme gène candidat dans la régulation de la fonctionnalité de la LPL. Il est situé sur le chromosome 16 et code pour une protéine de 567 acides aminés. Cette protéine favorise l'assemblage et la stabilisation des lipases sous forme homodimériques, c'est une chaperonne du réticulum endoplasmique. Elle joue donc un rôle important dans le métabolisme des LRTG via son action sur la LPL (Lipoprotéine Lipase). Seules trois mutations homozygotes délétères codantes pour des variants non-sens ont été décrites à ce jour dans ce gène (148,157,158). Comme nous venons de le décrire nous nous sommes intéressés à l'étude des variants non codants sur la région 3' non codante dans ce gène. En complément de cette étude nous nous sommes intéressés aux variants codants retrouvés sur le gène *LMF1* au sein de notre cohorte de 385 patients ayant présenté une hypertriglycémie sévère. Quelques variants rares ont été décrits dans des cohortes de patients hypertriglycémiques modérés à sévères mais sans preuve de leur fonctionnalité. Après sélection de variants candidats pertinents, retrouvés dans notre cohorte, au vu de leur score SIFT et Polyphen nous avons étudié leur fonctionnalité in vitro. Une étude fonctionnelle sur des variants *LMF1* n'avait montré aucun effet délétère sur l'activité LPL, excepté pour les variants non-sens décrits dans la littérature (214). Ainsi, seules les mutations non-sens à l'état homozygote semblent être déficitaires. L'objectif de notre étude était d'évaluer la fréquence des variants de *LMF1* par séquençage systématique, dans une cohorte de 385 patients hyperchylomicronémiques sans mutations délétères homozygotes ou hétérozygotes composites identifiées dans les gènes *LPL*, *APOA5*, *APOC2* et *GPIHBP1* et de déterminer leur fonctionnalité.

Dans cette étude nous avons mis en évidence 34 variants codants dont 15 variants silencieux, 18 variants faux-sens et un variant non-sens (p.Trp464Ter) déjà décrit comme délétère à l'état homozygote. Tous les variants faux-sens retrouvés au sein de notre cohorte sont rares (fréquence <5%). Et, ils ont tous été retrouvés à l'état hétérozygote

sauf pour le variant p.Gly172Arg. Nous avons étudié fonctionnellement 14 variants dont 12 faux-sens et deux non-sens nous servant de contrôle (p.Ser138Cys, p.Thr143Met, p.Gly172Arg, p.Gly228Val, p.Arg354Trp, p.Arg364Gln, p.Gly410Arg, p.Arg451Trp, p.Arg461His, p.Ala469Thr, p.Arg537Trp, p.Pro562Arg, p.Tyr439Ter, et p.Trp464Ter) en dosant in vitro l'activité LPL des milieux cellulaires de cellules HEK-293T co-transfectées par des vecteurs exprimant LPL et Lmf1 (WT ou muté) après stimulation par de l'héparine. Les variants p.Gly172Arg, p.Arg354Trp, p.Arg364Gln, p.Arg537Trp, p.Pro562Arg, ainsi que les variants non-sens : p.Tyr439Ter et p.Trp464Ter ont réduit significativement la libération d'activité LPL dans notre modèle. Cependant dans l'étude fonctionnelle (214) les variants p.Arg354Trp, p.Arg364Gln et p.Pro562Arg ont également été étudiés fonctionnellement et montrent des résultats discordants avec notre étude. Ces discordances pourraient être expliquées par les différents modèles utilisés.

De plus, dans notre cohorte nous rapportons un porteur hétérozygote composite pour les variants p.Trp464Ter et p.Arg451Trp. Ce patient est une petite fille qui a présenté une HTG sévère à 8 mois lors d'un épisode de gastro-entérite aiguë sévère. Elle présente également le variant p.Gln142Glu sur le gène *GPIHBP1* non prédit comme délétère. C'est le premier patient ayant un variant *LMF1* à l'état hétérozygote qui présente un phénotype hyperchylomicronémique. Ces résultats suggèrent que l'association de plusieurs variants hétérozygotes dans des gènes cruciaux impliqués dans la lipolyse intravasculaire dont *LMF1*, peut modifier de manière discontinue l'activité LPL de façon délétère en présence d'un facteur secondaire, comme une infection sévère dans notre cas.

Egalement, un porteur homozygote de 65 ans du variant p.Gly172Arg a été mis en évidence. Ce variant serait susceptible de diminuer l'activité LPL au vu de nos résultats in vitro et pourrait expliquer les épisodes hypertriglycéridémiques chez ce patient.

Ainsi, nos données suggèrent qu'un défaut partiel de *LMF1* pourrait être impliqué dans l'hyperchylomicronémie intermittente comme pour le patient porteur homozygote du variant p.Gly172Arg et le patient porteur hétérozygote du variant p.Trp464Ter.

1 **New rare genetic variants of *LMF1* gene associated**

2 **with hyperchylomicronemia**

3
4 Marine Serveaux Dancer^{1,2}, Mathilde Di Filippo^{1,3}, Oriane Marmontel^{1,3}, René Valéro⁴, Maria
5 Del Carmen Piombo-Rivarola⁵, Noël Peretti^{1,6}, Cyrielle Caussy^{1,7}, Michel Krempf⁸, Bruno
6 Vergès⁹, Murielle Mahl^{1,2}, Christophe Marçais^{1,2}, Philippe Moulin^{1,10} and Sybil Charrière^{1,10} §.

7
8 ¹ INSERM U1060, Laboratoire Carmen, Université Lyon 1, INRA U1235, INSA de Lyon,
9 CENS, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône Alpes, Villeurbanne F-69621,
10 Oullins cedex F-69921, France

11 ² Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Centre de Biologie Sud, Laboratoire
12 de Biochimie moléculaire et métabolique, Pierre-Bénite cedex F-69495, France

13 ³ Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de biochimie
14 et biologie moléculaire, Bron cedex F-69677, France

15 ⁴ Université d'Aix-Marseille, INSERM UMR1062, INRA UMR1260 « Nutrition, Obesity and Risk of
16 Thrombosis », NORT, APHM, service de nutrition, maladies métaboliques, endocrinologie Hôpital La
17 Conception, F-13005 Marseille, France

18 ⁵ Centre Hospitalier de Roanne, Service de pédiatrie-néonatalogie, Roanne, F-42300, France

19 ⁶ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Service d'Hépatogastroentérologie
20 Nutrition pédiatrique, Bron cedex F-69677, France

21 ⁷ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, Service d'endocrinologie, diabète, nutrition,
22 Centre Intégré de l'Obésité Rhône-Alpes, Fédération Hospitalo-Universitaire DO-iT, Lyon ,
23 Pierre-Bénite cedex F-69495, France

24 ⁸ CHU de Nantes, Hôpital de l'Hôtel Dieu, Service d'endocrinologie, maladies métaboliques et
25 nutrition, Institut du thorax, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, INRA, UMR 1280,
26 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes F-44093, France

27 ⁹ CHU de Dijon, Service d'endocrinologie-diabétologie, INSERM LNC-UMR 1231, F-21000
28 Dijon, France

29 ¹⁰ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Fédération d'endocrinologie, maladies
30 métaboliques, diabète et nutrition, Bron cedex F-69677, France

31

32 § corresponding author

33 Dr Sybil Charrière, MD PhD

34 Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, Hôpital Louis Pradel,
35 28 avenue Doyen Lépine, 69677 Bron Cedex, France.

36 Tel.: + 33 27 85 66 66; Fax: + 33 4 72 68 13 07; E-mail: sybil.charriere@chu-lyon.fr

37

38 **Disclosure:** The authors report no conflicts of interest related with this work.

39

40 **Short title:** *LMFI* new rare variants in hyperchylomicronemia

41

42 **Keywords:** chylomicron, chylomicronemia syndrome, dyslipidemia, hypertriglyceridemia.
43 lipolysis, triglyceride.

44

45 **Grants:** Professor Philippe Moulin received a grant from the Fondation de France (grant
46 number 2013 38587).

47

48

49 **Abstract**

50 Context: *LMFI* (lipase maturation factor 1) gene encodes for a protein involved in lipoprotein
51 lipase and hepatic lipase maturation. Homozygous mutations on *LMFI* leading to
52 hyperchylomicronemia are rare in the literature. Only a few other rare *LMFI* variants have been
53 described with poor functional studies.

54 Objective: The aim of this study was to assess the frequency of *LMFI* variants in a cohort of
55 385 hyperchylomicronemic patients without homozygous or compound heterozygotes
56 deleterious mutations identified in *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1* genes, and to determine
57 their functionality.

58 Methods: *LMFI* coding variants were screened using dHPLC followed by direct sequencing.
59 *In silico* studies were then performed with SIFT and PolyPhen-2 softwares, following by *in*
60 *vitro* functional studies using HEK-293T cells co-transfected with vectors encoding human *LPL*
61 and *LMFI*. LPL activity was measured on culture medium after heparin addition using human
62 VLDL-TG as substrate.

63 Results: A total of 19 nonsynonymous coding variants were identified in 65 patients; 8 variants
64 were newly described. *In vitro*, the p.Gly172Arg, p.Arg354Trp, p.Arg364Gln, p.Arg537Trp
65 *LMFI* variants decreased LPL activity and the p.Trp464Ter variant completely abolished LPL
66 activity. We identified a young girl heterozygous for the p.Trp464Ter variant and a homozygote
67 carrier of p.Gly172Arg variant with a near 50 % decreased LPL activity *in vitro* and *in vivo*.

68 Conclusion: The study confirms the rarity of *LMFI* variants in hyperchylomicronemic patients.
69 *LMFI* variants are likely to be involved in multifactorial hyperchylomicronemia. Partial *LMFI*
70 defects could be associated with intermittent monogenic hyperchylomicronemia as for both
71 p.Gly172Arg homozygous and the p.Trp464Ter heterozygous carriers.

72

73

74 **Précis:** In a cohort of 385 unexplained hyperchylomicronemic patients, we identified 19
75 nonsynonymous coding variants, including 8 new variants. Five variants had functional impact
76 on *in vitro* LPL activity.

77

78

79 **1. Introduction**

80 Knowledge of the pathophysiology of hyperchylomicronemia has substantially
81 progressed over the last decade through the deciphering of the complex genetic bases that are
82 strongly modulated by lifestyle factors, including alcohol abuses and related diseases such as
83 metabolic syndrome, obesity or type 2 diabetes (1,2).

84 Severe hypertriglyceridemia (HTG), defined by plasma triglycerides (TG) > 10 mmol/L,
85 is more likely to have genetic causes than moderate HTG. Monogenic hypertriglyceridemia, a
86 rare autosomal recessive disease, is due to homozygous or compound heterozygous loss of
87 function mutations in genes that regulate TG rich-lipoprotein lipolysis such as lipoprotein lipase
88 (*LPL*), apolipoprotein C2 (*APOC2*), apolipoprotein A5 (*APOA5*), glycosylphosphatidylinositol
89 anchored high density lipoprotein binding protein 1 (*GPIHBP1*) genes. Most frequently,
90 hyperchylomicronemic patients exhibit multigenic sporadic severe HTG (often termed
91 multifactorial chylomicronemia, MCM) that is characterized by a combination of common
92 small-effect variants and/or rare heterozygous large effect variants in genes associated with TG
93 concentration, with inconstant penetrance (1,2).

94 *LMFI* (lipase maturation factor 1) gene encodes for a transmembrane protein located in
95 the endothelial reticulum, critical for LPL, hepatic lipase and endothelial lipase maturation, by
96 acting as a lipase chaperone (3). Common or rare *LMFI* variants are infrequently reported in
97 the literature. Only 3 nonsense homozygous mutations of *LMFI* gene leading to
98 hyperchylomicronemia have been identified (4-6). A few other rare variants have been
99 published in moderate to severe HTG with no clear evidence for their functionality (7-9).

100 The aim of the present study was to assess the frequency of *LMFI* variants by systematic
101 sequencing among a large cohort of 385 hyperchylomicronemic patients without homozygous
102 or compound heterozygous deleterious mutations previously identified in *LPL*, *APOA5*,
103 *APOC2*, *GPIHBP1* genes and to determine their functionality.

104 **2. Material and Methods**

105

106 **A. Patients and populations studied**

107 The *LMFI* gene was sequenced in a cohort of 385 unrelated patients with documented
108 episodes of hyperchylomicronemia without homozygous or compound heterozygous mutations
109 previously identified on *LPL*, *APOC2*, *APOA5* or *GPIHBP1* genes. Hyperchylomicronemia
110 was defined by fasting plasma triglycerides (TG) concentration over 15 mmol/L with a TG to
111 total cholesterol ratio (g/L) above 2.5 (10) or plasma fasting TG over 10 mmol/L with a familial
112 history of hypertriglyceridemia. The family of the index case harboring a nonsense *LMFI* rare
113 variant identified in the cohort was also explored. Another cohort of 144 dyslipidemic patients
114 without hypertriglyceridemia (hypercholesterolemia or hypocholesterolemia) were also
115 screened for *LMFI* variants and served as control population. Clinical investigations have been
116 conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed
117 consent was obtained from all subjects included in the study and the children's parents, before
118 DNA collection, blood sampling and heparin injection for post-heparin LPL activity analyses.

119

120 **B. Genomic DNA analysis**

121 Genomic DNA was extracted from EDTA peripheral blood using the FlexiGene® DNA
122 kit (Qiagen, Milan, Italy). The *LMFI* DNA sequences (50 ng) were amplified by PCR with 11
123 primers pairs detailed in Supplemental Table 1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA,
124 USA). PCR products were analyzed for sequence variation by denaturing high-performance
125 liquid chromatography (dHPLC) (Transgenomic, Glasgow, United Kingdom) in a 1:1 mixture
126 with control (wild type, WT) amplicons. Variant sequences were confirmed by direct
127 sequencing (3500 Dx Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The
128 *GPIHBP1* gene direct sequencing for family A was performed as previously described (11).

129 The exon 4 of *APOE* gene was PCR amplified and directly sequenced with the BigDye
130 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied
131 Biosystems, Foster City, CA, USA).

132 The rs identification number of each variant identified was checked in the dbSNP
133 database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/snp/>) and Alamut® Visual 2.9 software
134 (*Refseq* accession numbers for *LMF1*, NM_022773.2, NP_073610.2). The allele frequency of
135 *LMF1* variants was compared to two European general populations, 1000 Genomes Europe
136 (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers>) and ExAC European non-
137 Finnish (<http://exac.broadinstitute.org/>). For nonsynonymous missense coding variants, *in*
138 *silico* analyses were performed using the PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
139 (12) and SIFT (http://sift.dna.org/www/Extended_SIFT_chr_coords_submit.html) (13)
140 softwares to predict the possible impact of the observed amino acid substitutions on the
141 structure and function of the human protein.

142

143 **C. Human post-heparin LPL activity**

144 Post-heparin LPL activity in human plasma was determined as previously described
145 (14), except non-esterified fatty acids (NEFA) concentration measured on an Architect C16000
146 analyzer (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA).

147

148 **D. Functional analysis of *LMF1* variants**

149 *1. Human LMF1 and LPL cDNA constructs*

150 The human *LMF1* and *LPL* cDNA WT sequence were inserted into two different
151 pCMV6-XL4 vectors that were used for transfection (Origene, Rockville, MD, USA), creating
152 a pCMV6-XL4-*LMF1*-WT vector and a pCMV6-XL4-*LPL* vector. The *LMF1* missense
153 variants predicted to be probably damaging or deleterious *in silico* (p.Ser138Cys, p.Thr143Met,

154 p.Gly172Arg, p.Gly228Val, p.Arg354Trp, p.Arg364Gln, p.Gly410Arg, p.Arg451Trp,
155 p.Arg461His, p.Trp464Ter, p.Ala469Thr, p.Arg537Trp, p.Pro562Arg), and the two nonsense
156 mutation previously described, p.Tyr439Ter and p.Trp464Ter were introduced into the
157 pCMV6-XL4-LMF1-WT vector using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit
158 (Agilent technologies Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. All
159 constructs were verified by sequencing.

160

161 *2. Cell transfections*

162 The human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells (ATCC CRL-11268) were
163 maintained at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
164 containing glucose 25 mM, glutamine 2mM, penicillin 100 units/ml, streptomycin sulfate
165 100µg/ml and supplemented with 10% decompleted fetal calf serum. HEK-293T cells were
166 plated into 6-well plates (6.5x10⁵cells/well) 24 hours before transfection and were maintained
167 in 10% decompleted fetal calf serum 1 hour before transfection. Transient transfections were
168 performed with jetPRIME® transfection reagent (Polyplus transfection™, Illkirch, France)
169 using 2µL of jetPRIME® for 1 µg of DNA according to the manufacturer's protocol. HEK-
170 293T cells were co-transfected with 1.6 µg of pCMV6-XL4-LPL and 5 ng of a pCMV6-XL4-
171 LMF1 (WT or variants). Heparin (10 U/mL) was added 24 hours after transfection, 6 hours
172 before removing the supernatant and cell lysis. At the end of the experiment, media samples
173 were collected; cells were washed with PBS and lysed in TRI Reagent (Roche, Meylan, France).
174 Media samples and lysed cells were stored at -80°C until use. All transfection experiments were
175 performed in triplicate and repeated three times.

176

177 *3. Real time quantitative PCR analysis*

178 *LPL* and *LMFI* mRNAs concentrations in the cell lysates were assessed by reverse
179 transcription (RT) followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Total RNA was
180 extracted from cell lines with TRI Reagent (Roche, Meylan, France), according to the
181 manufacturer's protocol. RNA concentration was measured with Nanodrop-ND1000 (Labtech,
182 Uckfield, United Kingdom). One μg of RNA was used for RT reaction using the Primescript
183 RT kit (Takara, Dalian, Japan) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR
184 were performed in duplicate on a Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Milan, Italy) using the Absolute
185 qPCR SYBR Green Mix (ABgene, Illkirch, France). Quantitative data were defined by cycle
186 threshold (Ct) normalized on an internal standard hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
187 (*HPRT*) gene. Details for primers and RT-qPCR conditions for each mRNA are available upon
188 request to the corresponding author.

189

190 4. *LPL* activity assay in cell culture media

191 The LPL activity assay in previously collected and frozen cell culture media, was
192 adapted from the plasma post-heparin LPL activity method described by Di Filippo et al. (14),
193 using human VLDL-TG prepared by ultracentrifugation of heat-inactivated normolipidemic
194 human serums diluted as substrate. Briefly, 40 μL of sample medium were added to 180 μL of
195 VLDL-TG substrate (final TG concentration 7 ± 0.3 mmol/L) in 510 μL of buffer A (without
196 NaCl). Upon incubation at 37°C, NEFA concentration was assayed hourly for 4 hours as
197 described above. LPL activity was expressed as $\mu\text{mol/L/min}$ of released NEFA. Hepatic lipase
198 activity was undetectable in samples. Two *LMFI* mutants p.Tyr439Ter and p.Trp464Ter
199 previously known to affect LMF1 function were used as controls (148,157). The basal LPL
200 activity detected in culture media of cells transfected with human *LPL* and WT *LMFI* (pCMV6-
201 XL4-LPL and LMF1-WT) was used as internal control in each essay. Data were adjusted on

202 the internal control and on transfection efficacy using *LPL* and *LMFI* mRNA quantified by RT-
203 qPCR. Results are presented normalized with respect to WT *LMFI* samples.

204

205 **E. Statistical analysis**

206 Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 software. Data are presented as
207 mean +/- standard error of the mean (SEM). A parametric Student's paired t-test was used for
208 comparison of means following a normal distribution. A two-tailed p value < 0.05 was
209 considered as significant.

210

211

212

213 3. Results

214

215 A. *LMFI* coding variants identification

216 The 385 hyperchymomicronemic patients explored were middle-aged at the time of
217 genetic explorations (mean +/- standard deviation (SD): 43.2 +/-16.2 years old). They were
218 mainly men (70.5 %). 35 subjects (9.1 %) had diagnosis of hyperchylomicronemia before they
219 were 20 years old.

220 In this cohort, 34 different *LMFI* coding variants were identified: 15 synonymous and
221 10 nonsynonymous (8 missense variants and one nonsense variant p.Trp464Ter) (Table 1). The
222 complete list of identified variants, including variants in adjacent intronic regions covered by
223 the genetic analyses, is available in Supplemental Table 2.

224 A total of 65 (16.9 %) patients harbored *LMFI* nonsynonymous coding variants. 15
225 patients were carriers of two *LMFI* coding variants. The p.Arg354Trp variant was
226 systematically associated with the p.Arg364Glu variant supporting complete linkage
227 disequilibrium between these 2 variants. All nonsynonymous coding variants were rare in the
228 cohort with a minor allele frequency (MAF) < 5 %, similar to that found in the general
229 population, except for p.Gly36Asp which appears to be a common polymorphism in the general
230 population. Among the 19 nonsynonymous coding variants, 8 had not been previously reported
231 in both European general populations, or in the literature and were not identified in the control
232 dyslipidemic cohort, except for Phe279Leu variant found in one hypocholesterolemic patient.
233 Only two variants, p.Gly36Asp and p.Gly172Arg, were identified at homozygous state in two
234 different patients (Table 1).

235

236 B. Functional analysis of *LMFI* variants

237 The 10/18 missense variants, predicted to be “probably damaging” by PolyPhen-2 or
238 “deleterious” by SIFT by *in silico* studies, were selected for functional analyses. The
239 p.Thr143Met variant, predicted to be “possibly damaging”, was added since it was associated
240 with p.Pro562Arg in a patient, in order to investigate the role of each variant (Table 1). The
241 nonsense variant identified herein and previously characterized p.Trp464Ter, as well as a
242 second previously identified nonsense variant p.Tyr439Ter, both already shown to severely
243 affect LMF1 function, were used as positive controls in the model.

244 The functionality of *LMF1* variants was assessed using an *in vitro* assay measuring LPL
245 activity in the culture media of HEK-293T cells co-transfected with *LPL* and *LMF1* expression
246 vector (WT or variants). A total of 4 variants (p.Gly172Arg, p.Arg354Trp, p.Arg364Gln,
247 p.Arg537Trp) significantly reduced by 38 to 79 % LPL activity in the culture media, but to a
248 lesser extent than the two previously characterized nonsense mutations (p.Tyr439Ter and
249 p.Trp464Ter (4,5)) which abolished LPL activity in the model (Figure 1).

250

251 **C. Case reports**

252 *1. p.Trp464Ter heterozygote and family explorations*

253 The p.Trp464Ter mutation heterozygous carrier was a young girl who exhibited severe
254 HTG (21 mmol/L) at 8 months of age occurred during an episode of severe infectious acute
255 gastro-enteritis leading to hospitalization, without acute pancreatitis. Her TG rapidly decreased
256 and then normalized under diet therapy after the infection resolution. Her parents and siblings
257 had normal plasma TG, except her young brother who had moderated non-fasting mixed
258 dyslipidemia at 6 months while he was being breast feed (Figure 2). This p.Trp464Ter mutation
259 has been previously described to be deleterious in a homozygous patient with severe permanent
260 HTG and acute pancreatitis (5) and was also shown in this study to totally abolish *in vitro* LPL
261 activity.

262 The proband (II-2) inherited the heterozygous p.Trp464Ter from her mother (I-2). The
263 heterozygous p.Arg451Trp *LMFI* rare variant, inherited from her father (I-1), was shown to
264 have no major effect on *in vitro* LPL activity in our model. Her normolipidemic sister (II-1)
265 had the same *LMFI* genotype. The proband (II-2) also inherited from her mother a new
266 heterozygous rare variant of *GPIHBP1* gene (*Ref seq* NM_178172.5, c.424C>G p.Gln142Glu)
267 not previously described in literature nor in dbSNP or ExAC databases, which is predicted to
268 be “tolerated” in SIFT and “possibly damaging” in PolyPhen-2 prediction softwares. The signal
269 peptide p.Cys14Phe common variant of *GPIHBP1* (c.41G>T, rs11538389) was also identified
270 at heterozygous state in the siblings (II-1, II-3) inherited from the mother (I-2). The proband
271 (II-1), her mother (I-2) and her brother (II-3) exhibited the ε3ε4 genotype of *APOE* gene (Figure
272 2). No other variants were identified on *LPL*, *APOA5* or *APOC2* genes in the proband.

273

274 2. p.Gly172Arg homozygote

275

276 The homozygous p.Gly172Arg *LMFI* variant was found in a 65-years-old man who had
277 several episodes of hyperchylomicronemia, discovered when he was 30 years old. His
278 maximum documented TG was 50 mmol/L, under a hyperlipidic diet. He had one episode of
279 acute pancreatitis when he was 35 years old, leading to a partial pancreatectomy after the
280 discovery of a congenital malformation of the bile ducts. He subsequently developed a
281 secondary exocrine pancreatic insufficiency treated by oral exogenous pancreatic lipases. He
282 suffered from type 2 diabetes discovered when he was 45 in a context of obesity (BMI 30
283 kg/m²), that was subsequently treated with insulin and had multiple cardiovascular
284 complications (coronopathy, severe peripheral arterial disease). His post-heparin LPL activity
285 was low but not abolished: 13.5 μmol/L/min (Normal range: 22.0-47.6 μmol/L/min) with
286 concomitant TG 7.22 mmol/L and HbA1C 8.4 % under insulin. His brother and sister who were

287 also known to have intermittent severe hypertriglyceridemia (TG > 10 mmol/L), couldn't have
288 been explored.

289

290 **4. Discussion**

291 This study identified only 19 nonsynonymous *LMFI* coding variants in a large cohort
292 of hyperchylomicronemic patients: 8 of them were identified for the first time. This finding
293 confirms the rarity of *LMFI* variants as 16.9 % of patients harbored missense or nonsense *LMFI*
294 variants and only 4.7 % were carriers of variants suspected to be deleterious based on their *in*
295 *vitro* effect on LPL activity. Only one previous study has been published in a similar although
296 smaller population, by Surendran et al (7), who reported nearly the same frequency of missense
297 variants in patients with TG > 10 mmol/L (15/85 - 17.6 %). In populations included both
298 moderate and severe HTG, the frequency of missense *LMFI* variants was lower (5.1 %) in the
299 cohort reported by De Castro-Oros et al. (118 subjects with TG > 5.6 mmol/L) (9) and found
300 higher (28 %) in a larger cohort reported by Johansen et al. (413 subjects with TG > 3.37
301 mmol/L) (8).

302 To date, only 3 nonsense *LMFI* mutations found in homozygous patients were
303 considered to be causally involved in hyperchylomicronemia (p.Tyr439Ter, p.Tyr460Ter,
304 p.Trp464Ter) (4-6). Several *LMFI* missenses variants have been identified in moderate or
305 severe hypertriglyceridemic cohorts (7-9) but only one study provided functional data for 7
306 missenses variants. No variant had any significant impact on *in vitro* LPL activity (7).

307 Functional data are provided in the present study for 12 missense variants. Three of them
308 were already studied by Surendran et al. (p.Arg354Trp, p.Arg364Gln and p.Pro562Arg) (7).
309 Among the 9 newly discovered variants, 2 were found deleterious *in vitro* (p.Gly172Arg and
310 p.Arg537Trp). The two variants (p.Arg354Trp, p.Arg364Gln), without deleterious effect in

311 Surendran et al. study (7), were shown to have a detrimental impact on the LPL activity in our
312 study. Moreover, we found a similar defect in LPL activity for both p.Tyr439Ter and
313 p.Trp464Ter nonsense mutation whereas Cefalu et al. (5) and Surendran et al. (7) reported a
314 milder effect of p.Trp464Ter. As both nonsense *LMFI* mutations are responsible for a protein
315 truncation at 77 and 81 %, a same defect on LPL activity could be expected. These discrepancies
316 may be explained by the different *in vitro* models used. Surendran et al. tested *LMFI* variants
317 functionality in cld-mutant hepatocytes (*LMFI* deficient mouse cell model) co-expressing *LPL*
318 and *LMFI* and LPL activity was measured using a labeled triolein substrate (7), whereas HEK-
319 293T human cells and a more physiological substrate (a pool of human VLDL-TG) was used
320 herein. The quantity of DNA used for transfection, the duration of incubation, which were not
321 specified by Surendran et al. (7), may also be different and were shown to have a significant
322 impact on the results (15). Moreover, in agreement with the result of *in vitro* functional test, the
323 post-heparin LPL activity of the p.Gly172Arg homozygous carrier was reduced by 50%.

324 Thus, the newly identified homozygous p.Gly172Arg, is likely to explain the phenotype
325 of the carrier as no additional variant was detected in any other genes involved in
326 hyperchylomicronemia in this patient. However, the causal relationship between the
327 hyperchylomicronemic phenotype and other heterozygous missense variants could be more
328 questionable. In another study, our team assessed the release of LPL activity in human plasma,
329 60 minutes after heparin injection (post heparin lipase activity, PHLA60), in addition to most
330 commonly used time point, 10 minutes after heparin injection (PHLA10). In the 3 patients
331 harboring the heterozygous p.Arg364Gln (and for two of them also the p.Arg354Trp), no
332 significant difference was found in PHLA10 but a significant 50% decrease of PHLA60 was
333 observed, compared to controls (14.9 +/- 4.8 vs 33.7 +/- 7.2 $\mu\text{mol/L/min}$, $p < 0.005$) (16).
334 Thereby, these data suggest that this p.Arg364Gln (and p.Arg354Trp) variant could also affect
335 plasma lipolysis *in vivo* through a defect in LPL availability. It is likely that *LMFI* heterozygous

336 missenses variants are not pivotal for the severity of the hyperchylomicronemic phenotype.
337 However, they could contribute to the phenotype, in combination with other small effects rare
338 variants already described in multifactorial hyperchylomicronemia, leading to a polygenic
339 predisposition to severe HTG unmasked in presence of deleterious nutritional or pathological
340 conditions (1,2).

341 The p.Trp464Ter patient is the first *LMFI* heterozygous patient described to be
342 hyperchylomicronemic. This mutation was previously identified in an adult homozygous carrier
343 (TG 8-27 mmol/L) who had several episodes of acute pancreatitis. He almost normalized his
344 TG under treatment. His heterozygous 2 year-old son was normotriglyceridemic (5). Two other
345 *LMFI* truncations have been described in homozygous carriers. The p.Tyr439Ter appeared to
346 be responsible for a more severe phenotype with severe HTG despite strict dietary conditions,
347 recurrent acute pancreatitis, tuberous xanthomas, and lipodystrophy (4). The last mutation
348 p.Tyr460Ter, recently published, was identified in a homozygous 41 year-old man with TG at
349 28 mmol/L, decreasing to 2.7 mmol/L under treatment. Interestingly, the phenotype of two
350 homozygous sisters was mild between 2 - 3 mmol/L, and 2/7 heterozygous carriers exhibited
351 border line HTG below 2 mmol/L (6).

352 The family exploration of the p.Trp464Ter proband revealed that her
353 normotriglyceridemic sister and mother shared the same heterozygous mutation. The proband
354 and her sister also carried the p.Arg451Trp variant, found to be non deleterious in the functional
355 study. These findings raise the question of the real involvement of the p.Trp464Ter mutation in
356 the hyperchylomicronemic phenotype of the patient. However no other deleterious mutation
357 except a new heterozygous mutation of *GPIHBP1* with uncertain pathogenesis and no clear
358 segregation with the phenotype was found. To date no missense heterozygous mutation of
359 *GPIHBP1* gene has been reported to be responsible for hyperchylomicronemic phenotype (17).
360 Even if the contribution of another deleterious mutation in an unknown gene cannot be

361 excluded, it can be speculated that the association of several heterozygous variants in crucial
362 genes involved in intravascular lipolysis (including *LMFI*) may alter LPL activity in critical
363 conditions, such as severe infection in this patient, and may be responsible for intermittent
364 impairment of LPL activity. Interestingly, HTG is a common feature in severe infectious state:
365 it was shown that the endotoxins and inflammatory cytokines such as TNF, IL-1, IL-2 or IL-6,
366 are responsible for both increased VLDL hepatic production and decreased VLDL clearance
367 with altered LPL expression in adipocytes and myocytes *in vitro*, decreased post-heparin LPL
368 activity in humans, and decreased apo E expression required for hepatic VLDL clearance (18-
369 20).

370 The three *LMFI* truncations and the most deleterious missense variant herein
371 (p.Arg537Trp) alter the C terminal domain, which is free in the luminal side of the endoplasmic
372 reticulum, and considered as essential for LPL maturation (21). The other variants
373 (p.Gly172Arg ,p.Arg354Trp, p.Arg364Gln) are located in the two cytoplasmic loops B and D,
374 the function of which in LPL binding and maturation are unknown.

375 The study has some limitations. For instance, it is not possible to provide association
376 studies of *LMFI* variants with TG in general population. Such studies are difficult to conduct
377 and would require a large control population due to the rarity of most of these variants as shown
378 in 1000 Genomes and ExAC general population, and in the control dyslipidemic cohort.
379 Systematic post-heparin LPL activity and LPL mass assessment in variant carriers could have
380 been valuable in order to document *in vivo* the functionality of the new rare variants.

381

382 To conclude, the identification of several new functional *LMFI* variants in a large cohort
383 of patients with a history of unexplained hyperchylomicronemia supports the concept that
384 genetic variations of *LMFI* are involved in multifactorial hyperchylomicronemia, in

385 combination with other heterozygous gene variants regulating TG lipolysis. Moreover, the data
386 strongly suggest that partial *LMFI* defects, such as the homozygous p.Gly172Arg and the
387 heterozygous p.Trp464Ter mutations, are involved in intermittent monogenic
388 hyperchylomicronemia.

389

390

391 **5. Acknowledgments**

392 The authors thank the INSERM and Hospices Civils de Lyon for their supports, all the
393 clinicians who referred their patients for genetic explorations, the nurses for clinical
394 explorations, and Philip Robinson for editorial assistance. Professor Philippe Moulin received
395 a grant from the Fondation de France (grant number 2013 38587).

396

397

398 **6. References**

399 1. Johansen CT, Hegele RA. Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides. *Biochim*
400 *Biophys Acta* 2012; 1821(5):833-42.

401 2. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Aversa M,
402 Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Descamps OS, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT,
403 Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Santos RD, Stalenhoef AF, Stroes E,
404 Taskinen MR, Tybjærg-Hansen A, Watts GF, Wiklund O; European Atherosclerosis Society
405 Consensus Panel.. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition,
406 diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2(8):655-66.

407 3. Péterfy M. Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism.
408 *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(5):790-4.

409 4. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, Frost
410 PH, Kane JP, Malloy MJ, Reue K, Pajukanta P, Doolittle MH. Mutations in LMF1 cause
411 combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.*2007; 39(12):1483-7.

412 5. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, Barbagallo CM, Carroccio A,
413 Tarugi P, Squatrito S, Vigneri R, Taskinen MR, Péterfy M, Aversa MR. Novel LMF1 nonsense
414 mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;
415 94(11):4584-90.

416 6. Cefalù AB, Spina R, Noto D, Ingrassia V, Valenti V, Giammanco A, Fayer F, Misiano G,
417 Cocorullo G, Scrimali C, Palesano O, Altieri GI, Ganci A, Barbagallo CM, Aversa MR.
418 Identification of a novel LMF1 nonsense mutation responsible for severe hypertriglyceridemia
419 by targeted next-generation sequencing. *J Clin Lipidol* 2017; 11(1):272-281.

420 7. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, Kuivenhoven JA,
421 Hosseini M, Péterfy M, Kastelein JJ, Johansen CT, Hegele RA, Stroes ES, Dallinga-Thie GM.
422 Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe
423 hypertriglyceridaemia. *J Intern Med* 2012; 272(2):185-96.

424 8. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, Huff MW, Péterfy
425 M, Mehrabian M, Lusis AJ, Kathiresan S, Anand SS, Yusuf S, Lee AH, Glimcher LH, Cao H,
426 Hegele RA. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in
427 patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5(1):66-72.

428 9. De Castro-Orós I, Civeira F, Pueyo MJ, Mateo-Gallego R, Bolado-Carrancio A, Lamíquiz-
429 Moneo I, Álvarez-Sala L, Fabiani F, Cofán M, Cenarro A, Rodríguez-Rey JC, Ros E, Pocoví
430 M. Rare genetic variants with large effect on triglycerides in subjects with a clinical diagnosis
431 of familial vs nonfamilial hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol* 2016; 10(4):790-7.

- 432 10. Brunzell JD 1995 Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the
433 chylomicronemia syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic
434 and molecular bases of inherited disease. Vol 2. New York: McGraw-Hill; 1913–1932.
- 435 11. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, Delay M, Debard
436 C, Lefai E, Lachaux A, Moulin P, Marçais C. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic
437 C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J*
438 *Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1675-9.
- 439 12. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov
440 AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat*
441 *Methods* 2010; 7(4):248-9.
- 442 13. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes.
443 *Nat Protoc* 2016; 11(1):1-9.
- 444 14. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, Merlin M,
445 Nollace A, Valéro R, Lagarde M, Pruneta-Deloche V, Moulin P, Sassolas A. Post-heparin LPL
446 activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment
447 of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One.* 2014; 9(5):e96482.
- 448 15. Yin F, Doolittle MH, Péterfy M. A quantitative assay measuring the function of lipase
449 maturation factor 1. *J Lipid Res* 2009; 50(11):2265-9.
- 450 16. Marmontel A, Di Filippo M, Marçais C, Nony S, Dumoux M, Serveaux-Dancer M, Caussy
451 C, Charrière S, Moulin P. Alterations in plasma triglycerides lipolysis in patients with history
452 of multifactorial chylomicronemia. Manuscript submitted to *Atherosclerosis*.
- 453 17. Fong LG, Young SG, Beigneux AP, Bensadoun A, Oberer M, Jiang H, Ploug M. GPIHBP1
454 and Plasma Triglyceride Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(7):455-69.

- 455 18. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld
456 C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and
457 consequences to the host. *J Lipid Res* 2004; 45(7):1169-96.
- 458 19. Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkilä E, Taskinen MR. Changes in serum
459 lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism* 1988; 37(9):859-65.
- 460 20. Feingold KR, Staprans I, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Doerrler W, Dinarello
461 CA, Grunfeld C. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce
462 hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses
463 inhibit clearance. *J Lipid Res* 1992; 33(12):1765-76.
- 464 21. Doolittle MH, Neher SB, Ben-Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM, Hosseini M, Yin F,
465 Wong H, Walter P, Péterfy M. Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and
466 interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2009;
467 284(48):33623-33.
- 468
- 469

470 **Legends for Figures and Tables**

471

472 **Figure 1. Functional analysis of *LMFI* variants**

473 *LMFI* variants functionality was assessed by measuring the LPL activity released in culture
474 media of HEK-293T cells co-transfected with human *LPL* and *LMFI* (WT or variants) cDNA.
475 Each histogram represents the mean of three individual transfections \pm SEM.

476 * $p < 0.05$ compared to wild type (WT). £, LPL activity of p.Trp464Ter and p.Tyr439Ter, were
477 below 2 % of WT.

478

479 **Figure 2. Pedigree, lipid parameters, and genotypes of the family of *LMFI* p.Trp464Ter**
480 **heterozygous carrier.**

481 Arrow: proband; Filled symbols: homozygotes for *LMFI* variants; Half-filled symbols:
482 heterozygotes for *LMFI* variants.

483 ^a maximum TG documented. ^b pathological lipid value for age

484 HTZ: heterozygote; HDLc: HDL cholesterol; LDLc: LDL cholesterol; TC: total cholesterol;
485 TG; triglycerides; WT: wild-type haplotype.

486

487 **Table 1: *LMFI* nonsynonymous coding variants identified in the hyperchylomicronemic**
488 **cohort (n=385)**

489 B, benign; D, damaging; HCM, hyperchylomicronemic; HMZ, homozygote; HTZ,
490 heterozygote; MAF, minor allele frequency; NA, not available; POD, possibly damaging;
491 PRD, probably damaging; Ref, references; T, tolerated.

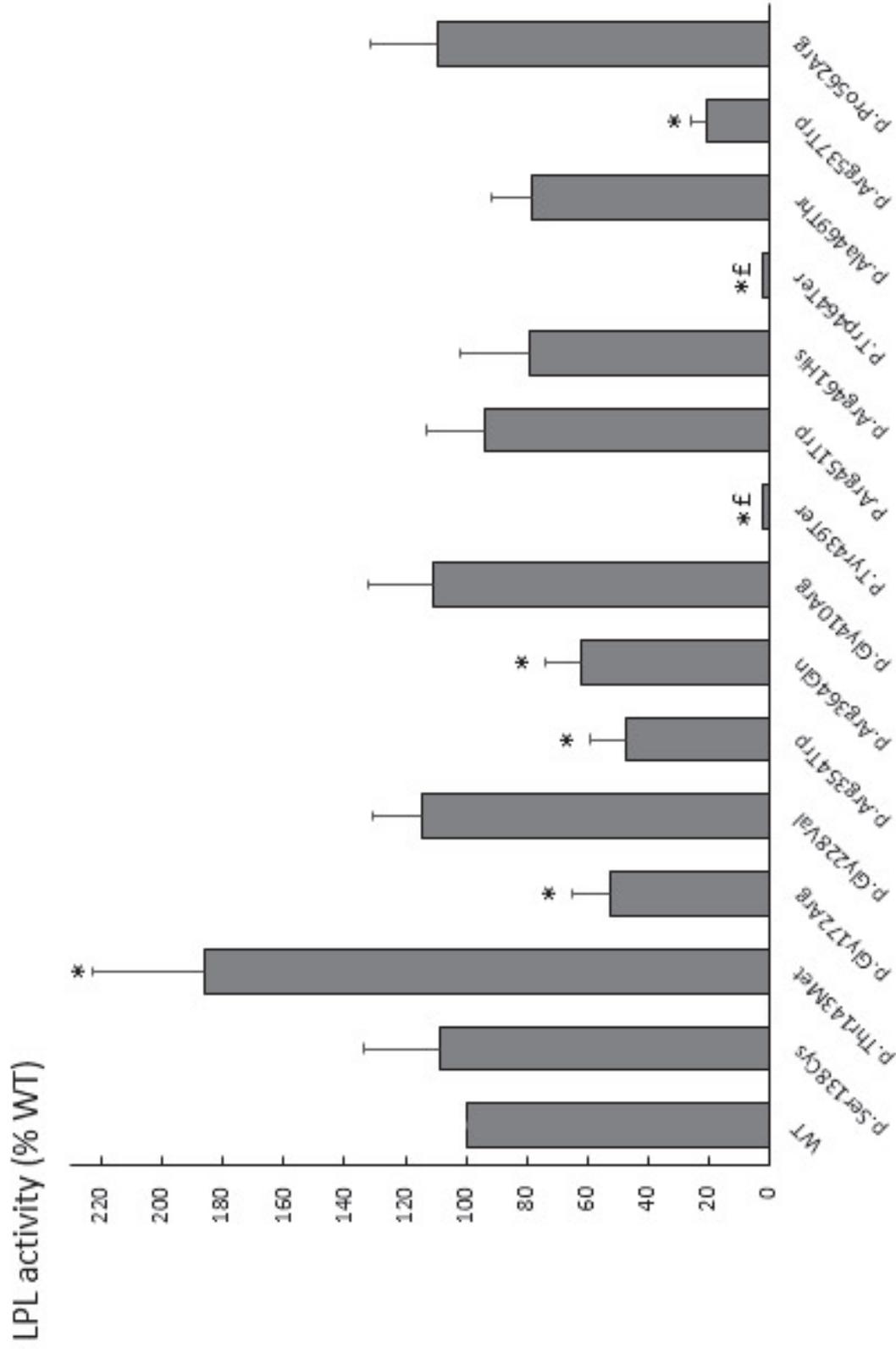
492

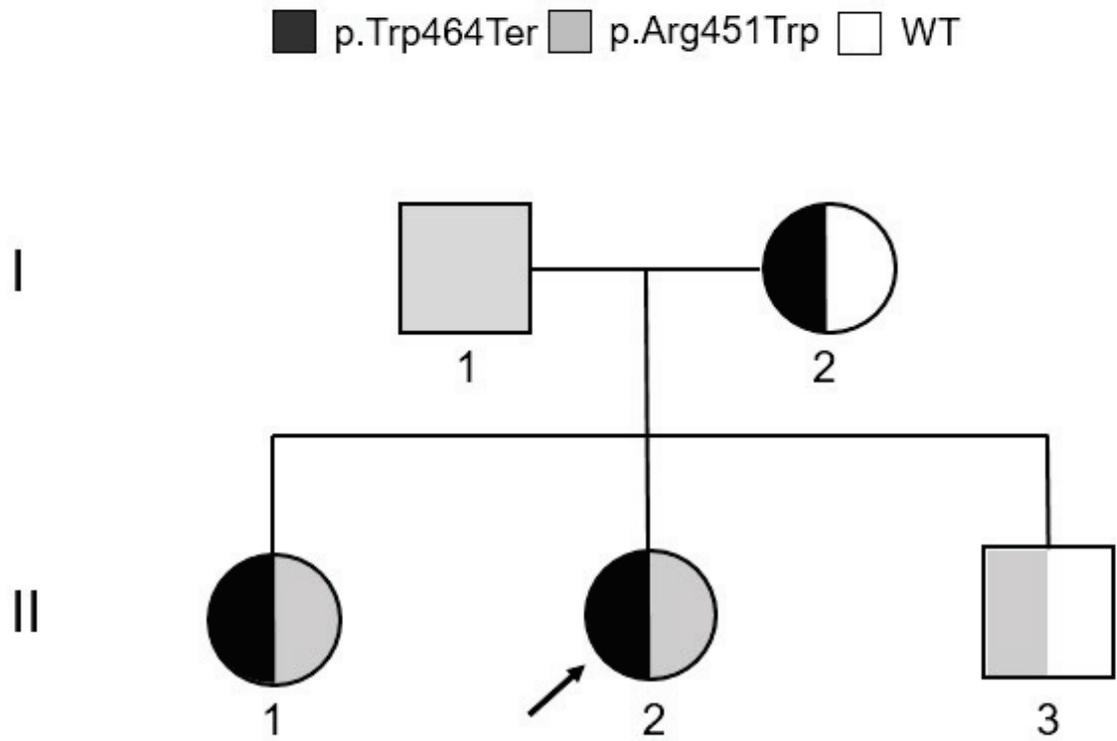
493 **Figures**

494 **Figure 1**

495

496





	II-1	I-1	II-2	I-2	II-3
Age (years)	5	32	2	28	6 months
TG (mmol/l)	0.92	0.83	0.93 (21 ^{a,b})	0.79	2.36 ^b
TC (mmol/l)	4.33	6.12	3.72	4.49	5.57
HDLc (mmol/l)	1.28	1.18	0.86	1.39	0.77
LDLc (mmol/l)	2.63	4.56 ^b	2.44	2.74	3.98 ^b
GPIHBP1	p.Cys14Phe HTZ	No variant	-	p.Cys14Phe HTZ	p.Cys14Phe HTZ
	-		p.Gln142Glu HTZ	p.Gln142Glu HTZ	-
APOE	E3E3	E3E3	E3E4	E3E4	E3E4

498

499 Tables

500 Table 1

Exon	Position	Variant	Rs number	HCM cohort n = 385		Control dyslipidemic cohort n = 144			MAF in 1000 Genomes EUR (%)	MAF in EXAC Eur nonFinn (%)	SIFT prediction	PolyPhen-2 prediction	Ref*
				HTZ/ HMZ	MAF (%)	HTZ/ HMZ	MAF (%)	MAF (%)					
1	c.95C>T	p.Ala32Val	rs199831082	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0	T	B		
1	c.107G>A	p.Gly36Asp	rs111980103	20/1 ^{a,d,f}	2.9	29/2	11.5	9.0	21.0	T	B	(7,8)	
2	c.413C>G	p.Ser138Cys	rs200382562	2/0 ^a	0.3	0/0	0	0.1	0.2	T	PRD		
2	c.428C>T	p.Thr143Met	rs375529211	1/0 ^b	0.1	0/0	0	0.0	0.0	T	POD		
3	c.514G>A	p.Gly172Arg	rs201406396	0/1	0.3	0/0	0	0.0	0.0	T	PRD		
5	c.683G>T	p.Gly228Val	NA	1/0	0.1	0/0	0	NA	NA	T	PRD	(8)	
6	c.837C>A	p.Phe279Leu	rs61745065	1/0	0.1	1/0	0.3	0.0	0.0	T	B		
7	c.1001C>G	p.Ser334Cys	rs765992133	1/0	0.1	0/0	0	NA	0.0	T	POD		
7	c.1052G>A	p.Arg351Gly	rs192520307	7/0	0.9	2/0	0.7	0.2	0.2	T	B	(7,8)	
7	c.1060C>T	p.Arg354Trp	rs143076454	9/0 ^c	1.2	6/0	2.1	2.5	3.0	D	B	(7,8)	
8	c.1091G>A	p.Arg364Gln	rs35168378	15/0 ^{c,d}	2.0	7/0	2.4	3.0	3.6	T	PRD	(7,8)	
8	c.1228G>A	p.Gly410Arg	rs199713950	1/0	0.1	0/0	0	0.1	0.0	T	PRD		
9	c.1292C>A	p.Ala431Asp	rs115416993	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.1	T	B		
9	c.1351C>T	p.Arg451Trp	rs138205062	5/0 ^e	0.7	0/0	0	0.4	0.5	D	PRD	(8,9)	
9	c.1382G>A	p.Arg461His	rs557053661	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0	D	PRD		

9	c.1391G>A	p.Trp464Ter	rs587777626	1/0 ^c	0.1	0/0	0	NA	NA		(4)
9	c.1405G>A	p.Ala469Thr	rs181731943	1/0	0.1	2/0	0.7	0.2	0.1	D	PRD (8)
11	c.1609C>T	p.Arg537Trp	rs555435528	1/0	0.1	0/0	0	NA	0.0	D	PRD
11	c.1685C>G	p.Pro562Arg	rs4984948	11/0 ^{b,f}	1.4	1/0	0.3	0.8	0.9	D	POD (7,8)

^a One subject with p.Ser138Cys is also heterozygote for p.Gly36Asp

^b p.Thr143Met heterozygous variant is associated with p.Pro562Arg heterozygous variant

^c p.Arg354Trp heterozygous variant is systematically associated with p.Arg364Glu heterozygous variant

^d One subject with p.Arg364Gln s is also heterozygote for p.Gly36Asp

^e p.Trp464Ter variant is associated with p.Arg451Trp heterozygous variant

^f Two subjects with p.Pro562Arg are also heterozygotes for p.Gly36Asp

New rare genetic variants of *MF1* gene associated with hyperchylomicronemia

Serveaux-Dancer et al.

Supplemental Data

Supplemental Table 1: Primers used for *LMF1* gene sequencing

Gene region	Forward primer	Reverse Primer
Exon 1	5'-tgtgagcggggcctcc-3'	5'-gagaccgcgcggaggagt-3'
Exon 2	5'-gccccacattctgagctg -3'	5'-agtgacagcaagccctaagc-3'
Exon 3	5'-gcttcactcagtggggaaa-3'	5'-catactgggaaggctgatgg-3'
Exon 4	5'-ttgtgaaatgtgtgcttc-3'	5'-cgttattcccaaaccac-3'
Exon 5	5'-cctgggaagctgtttctgtc-3'	5'-cagggtgtgcaggactgag-3'
Exon 6	5'-cacaagcctctccctagcc-3'	5'-gccagcgtctctgtggac-3'
Exon 7	5'-cagctgggttcagttgtga-3'	5'-caccaccgactttctct-3'
Exon 8	5'-gagccccacctggaagat-3'	5'-tctccccatataccagctc-3'
Exon 9	5'-ctctcagtagccctgacca-3'	5'-ccatctatgggcagaagagg-3'
Exon 10	5'-gagtggcacagccgtctc-3'	5'-cagcagacacctggatttg-3'
Exon 11	5'-ctgctgggggtctacctgt-3'	5'-agggcaaacgttgctgag-3'

Supplemental Table 2: *LMF1* coding and non-coding variants identified in the hyperchylomicronemic cohort (n=385)

HCM, hyperchylomicronemic; MAF, minor allele frequency; NA, not available

Exon	Position	Variant	Rs number	HCM cohort (n=385)		Control dyslipidemic cohort (n=144)		MAF in 1000 Genomes EUR (%)	MAF in ExAC Eur nonFinn (%)
				HTZ/HMZ	MAF (%)	HTZ/HMZ	MAF (%)		
1	c.-39_21del		rs36202798	219/39	33.5	21/3	11.1	23.0	1.0
1	c.-21G>T		rs13334376	110/7	15.2	0/0	0	23.0	12.1
1	c.95C>T	p.Ala32Val	rs199831082	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
1	c.107G>A	p.Gly36Asp	rs111980103	21/1	2.9	29/2	11.5	9.0	21.0
1	c.117C>A	p.Gly39Gly	rs373824481	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
2	c.194-28T>C		rs3751666	229/58	37.3	73/23	41.3	37.7	38.1
2	c.234C>G	p.Leu78Leu	rs149929337	5/0	0.6	0/0	0	0.5	0.2
2	c.255T>C	p.Leu85Leu	rs12448005	50/6	7.3	17/2	7.3	5.8	7.1
2	c.306G>A	p.Thr102Thr	rs3751667	149/19	21.8	51/9	20.8	20.8	22.8
2	c.396C>T	p.Leu132Leu	rs375877835	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
2	c.411G>A	p.Ser137Ser	rs117150036	9/0	1.2	2/0	0.7	1.4	2.1
2	c.413C>G	p.Ser138Cys	rs200382562	2/0	0.3	0/0	0	0.1	0.2
2	c.428C>T	p.Thr143Met	rs375529211	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
3	c.514G>A	p.Gly172Arg	rs201406396	0/1	0.3	0/0	0	0.0	0.0
4	c.515-7G>A		NA	1/0	0.1	0/0	0	NA	NA
4	c.540G>A	p.Thr180Thr	rs2277892	88/6	12.2	35/0	12.2	9.2	11.1
4	c.543G>A	p.Gly181Gly	rs2277893	150/15	21.4	57/2	21.2	17.7	17.8
4	c.552G>C	p.Gly184Gly	rs199702457	2/0	0.3	1/0	0.3	0.1	0.1
5	c.683G>T	p.Gly228Val	NA	1/0	0.1	0/0	0	NA	NA
5	c.729+18C>G		rs11864203	229/56	37.0	67/16	34.4	27.9	31.3
6	c.730-49C>T		rs201996962	1/0	0.1	0/0	0	0.2	0.4
6	c.756G>A	p.Ala252Ala	rs2076425	92/3	12.3	36/1	13.2	11.1	15.8
6	c.837C>A	p.Phe279Leu	rs61745065	1/0	0.1	1/0	0.3	0.0	0.0

6	c.861G>A	p.Ala287Ala	rs61740409	9/0	1.2	4/0	1.4	0.2	0.1
6	c.897+27C>T		rs76200860	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
6	c.897+28G>A		rs184361133	7/0	0.9	0/0	0	0.7	0.8
7	c.898-14C>G		rs556303155	2/0	0.3	0/0	0	0.0	0.0
7	c.1001C>G	p.Ser334Cys	rs765992133	1/0	0.1	0/0	0	NA	0.0
7	c.1052G>A	p.Arg351Gly	rs192520307	7/0	0.9	2/0	0.7	0.2	0.2
7	c.1060C>T	p.Arg354Trp	rs143076454	9/0	1.2	6/0	2.1	2.5	3.0
7	c.1078+17G>T		rs74001087	7/0	0.9	2/0	0.7	0.1	0.1
8	c.1091G>A	p.Arg364Gln	rs35168378	15/0	1.9	7/0	2.4	3.0	3.6
8	c.1228G>A	p.Gly410Arg	rs199713950	1/0	0.1	0/0	0	0.1	0.0
8	c.1232+20G>A		rs149871283	3/0	0.4	1/0	0.3	0.0	0.6
9	c.1233-5G>A		rs200343204	2/0	0.3	0/0	0	0.0	0.0
9	c.1290C>T	p.Ser430Ser	rs148734358	1/0	0.1	0/0	0	0.2	0.1
9	c.1292C>A	p.Ala431Asp	rs115416993	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.1
9	c.1351C>T	p.Arg451Trp	rs138205062	5/0	0.6	0/0	0	0.4	0.5
9	c.1382G>A	p.Arg461His	rs557053661	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
9	c.1391G>A	p.Trp464X	rs587777626	1/0	0.1	0/0	0	NA	NA
9	c.1405G>A	p.Ala469Thr	rs181731943	1/0	0.1	2/0	0.7	0.2	0.1
9	c.1416+13C>T		rs114354808	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
9	c.1416+20G>A		rs367631358	1/0	0.1	1/0	0.3	0.0	0.0
9	c.1416+24G>A		rs138911395	1/0	0.1	1/0	0.3	0.3	0.1
10	c.1473C>T	p.Asp491Asp	rs62012416	1/0	0.1	0/0	0	0.4	0.2
10	c.1476C>T	p.Ala492Ala	rs142258761	1/0	0.1	1/0	0.3	0.1	0.0
10	c.1529+20G>A		rs149923445	3/0	0.4	0/0	0	0.0	0.0
10	c.1529+39del		rs376645804	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
11	c.1530-15T>C		rs367769866	1/0	0.1	0/0	0	0.0	0.0
11	c.1590C>T	p.Ala530Ala	NA	1/0	0.1	0/0	0	NA	NA
11	c.1609C>T	p.Arg537Trp	rs555435528	1/0	0.1	0/0	0	NA	0.0
11	c.1685C>G	p.Pro562Arg	rs4984948	11/0	1.4	1/0	0.3	0.8	0.9

Discussion Article 2

Nous avons mis au point les différentes techniques moléculaires permettant de rechercher des mutations sur le gène *LMF1* afin de compléter le diagnostic moléculaire d'hyperchylomicronémie. Cependant, au vu de la découverte récente de ce gène nous n'avons pas assez de recul pour conclure sur l'effet délétère des variants retrouvés. Après analyse des mutations avec le logiciel Alamut, en regardant les scores de prédictions Polyphen et SIFT (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> et http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html) (215,216), nous avons sélectionné certains variants codants à tester fonctionnellement. De ce fait nous avons mis en place un test fonctionnel in vitro. Nous avons utilisé la méthode de mesure de l'activité LPL post-héparinique avec substrat VLDL afin d'identifier les variants délétères qui induiraient une diminution de l'activité LPL (217).

Cette technique permet de mesurer l'activité de la LPL et également de la lipase hépatique. Cependant dans notre modèle in vitro nous avons choisi de ne pas tenir compte de l'activité de la lipase hépatique au vu de sa faible activité. Cette technique a été développée pour explorer phénotypiquement les patients présentant une HTG majeure en mesurant l'activité LPL post-héparinique in vitro. Elle permet de réaliser une étude fonctionnelle de la LPL et ainsi de dépister des anomalies fonctionnelles de la LPL mais également elle a montré des déficits chez des patients ne présentant pas de mutation du gène *LPL*, ainsi elle permettrait de mettre en évidence l'effet d'autres facteurs pouvant moduler l'expression de l'activité LPL. Nous nous sommes intéressés à cette dernière application. En effet le gène *LMF1* code pour une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique qui joue un rôle essentiel dans la maturation post-transcriptionnelle des lipases lors de l'assemblage des monomères inactifs et/ou dans la stabilisation de leur structure homodimérique permettant l'activation catalytique des lipases vasculaires : la LPL, la LH et la LE (8). Nous avons testé l'impact de variants codants de *LMF1* sur l'activité LPL. Cependant cette méthode ne permet pas de mettre systématiquement en évidence les déficits en ApoA-V. De plus, la lipolyse n'est pas mesurée sur le propre substrat de la LPL (les VLDL du patient) mais sur des VLDL « normales ». Ainsi, nous avons utilisé cette technique in vitro robuste et fidèle afin de caractériser l'effet des variants supposés délétères par les logiciels de prédiction.

Pour caractériser l'effet délétère d'un variant nous avons co-transfecté des constructions plasmidiques contenant les séquences l'une de la LPL et l'autre de Lmf1 sauvage ou mutée dans le modèle cellulaire HEK-293T. Ce modèle cellulaire possède de très faibles expressions de LPL et Lmf1. Puis nous avons après stimulation héparinique récupéré les surnageants des cellules et testé l'activité LPL selon la méthode décrite précédemment. L'ajout d'héparine est nécessaire afin de détacher la LPL des HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycan) pour permettre de mesurer l'activité LPL. Le fait de détacher la LPL des HSPG ne correspond pas à ce qui se passe au cours de la lipolyse intravasculaire. En parallèle, nous avons extrait l'ARN des cellules et réalisé des RT-qPCR pour les gènes *LMF1* et *LPL* que nous avons normalisé sur le gène de ménage *HPRT*. Ces dernières manipulations nous ont permis de normaliser nos résultats d'activité LPL afin de palier à d'éventuelles modulations induites par les différentes transfections.

Notre cohorte se compose de 385 patients HTG n'ayant pas de variant ou d'association de variants délétères sur les autres gènes impliqués dans la régulation de la triglycémie (*LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1*). Nous avons mis en évidence 67 variants sur le gène *LMF1* dont 36 variants codants. Dans ces variants codants 18 sont des variants faux-sens et un variant est non-sens (W464X). Nous avons choisi de tester 13 de ces variants sur des critères de fréquence, et de scores de prédiction donnés par les logiciels SIFT et Polyphen. Les fréquences de tous les variants retrouvés restent faibles mais semblent légèrement supérieures aux données 1000 Genomes EUR. Ces variants sont retrouvés à l'état hétérozygote excepté pour le variant c.514G>A, p.Gly172Arg, rs201406396 ; retrouvé homozygote chez un seul patient, de plus le variant W464X est associé au variant c.1351C>T, p.Arg451Trp, rs138205062 ; ce patient est hétérozygote composite. Nos critères de sélection sont discutables. De plus, notre test in vitro correspond à un modèle homozygote or la plupart de ces variants testés sont retrouvés à l'état hétérozygote.

Dans notre étude nous avons observé une diminution d'activité LPL significative après normalisation pour six variants testés : c.514G>A, p.Gly172Arg, rs201406396 ; c.1060C>T, p.Arg354Trp, rs143076454 ; c.1091G>A, p.Arg364Gln, rs35168378 ; c.1317C>G, p.Tyr439Ter, rs121909397 ; c.1391G>A, p.Trp464X, rs587777626 ; c.1609C>T, p.Arg537Trp, rs555435528. Seul le variant p.Tyr439Ter n'a pas été retrouvé dans notre cohorte de patients, nous l'avons tout de même intégré à notre étude car il est

décrit comme délétère et permettait de faire un contrôle supplémentaire de notre modèle. L'autre mutation délétère décrite sur le gène *LMF1* p.Trp464X a été retrouvée au sein de notre cohorte et peut également servir de contrôle. Ainsi, la présence de ces variants diminueraient l'activité LPL et pourraient être une des causes de l'HTG retrouvée chez le patient. Les autres variants testés ne semblent pas modifier l'activité LPL d'après notre modèle. Le variant c.428C>T, p.Thr143Met, rs375529211 présente une activité de LPL significativement augmentée. Avec ce résultat on pourrait penser que ce variant favoriserait l'activité LPL ce qui semble en contradiction avec notre hypothèse.

Dans la littérature, un autre test fonctionnel in vitro a été développé considérant également l'effet d'un variant *LMF1* sur l'activité LPL après co-transfection de LPL et *Lmf1* dans des cellules (3). Ce modèle utilise des cellules hépatocytaires de souris *cld* (*LMF1* déficientes). Notre modèle cellulaire possède une très faible expression endogène de *Lmf1* contrairement au modèle cellulaire choisi dans l'autre étude. Cependant notre modèle cellulaire est un modèle humain qui peut potentiellement plus se rapprocher d'un phénomène physiologique chez l'homme comparé au modèle de souris choisi par l'autre équipe. Leur étude a porté sur une population de 86 patients HTG comparés à des contrôles (327). Aucun variant dans ce modèle, mis à part les deux variants décrits comme délétères (Y439X et W464X), n'a mis en évidence de diminution significative de l'activité LPL. Les variants testés communément sont : c.1060C>T, p.Arg354Trp, rs143076454 ; c.1091G>A, p.Arg364Gln, rs35168378, c.1685C>G, p.Pro562Arg, rs4984948 ; et les deux variants décrits délétères (Y439X et W464X). Nos résultats sont en partie discordants avec cette étude. En effet, pour les variants p.Arg354Trp et p.Arg364Gln nous avons mis en évidence une diminution significative de l'activité LPL contrairement à cette équipe. Par contre, pour le variant p.Pro562Arg nous retrouvons le même résultat. Pour les variants non-sens nous retrouvons partiellement les mêmes résultats en effet notre activité est retrouvée plus basse pour le variant W464X que pour le variant Y439X, résultats inverses dans leur étude. Nos modèles d'études sont différents et notre rendu de résultat également. En effet, nous avons normalisé nos résultats sur un contrôle qualité interne après soustraction de l'activité LPL de la transfection de LPL seule, puis nous avons ensuite normalisé sur la condition WT de chaque manipulation après normalisation sur les résultats de RT-qPCR. Dans leur modèle, ils ne prennent pas en compte la disparité due aux différentes transfusions (RT-qPCR) et différentes manipulations (contrôle qualité interne). Cependant, nous avons ajusté nos résultats après soustraction de

l'activité LPL transfectée seule ce qui nous donne des résultats négatifs pour les deux variants non-sens. Notre normalisation peut donc être discutable, mais elle permet de palier à de nombreux biais expérimentaux.

Les résultats de cette étude montrent que certains variants *LMF1* influencent l'activité LPL et donc seraient en faveur de l'apparition de l'HTG chez les patients concernés et pourraient en partie expliquer le phénotype.

Case Report : Identification d'une délétion homozygote de l'exon 6 du gène *LMF1* chez un patient hyperchylomicronémique

Introduction

Alors que jusqu'à présent seules trois mutations rares non-sens homozygotes du gène *LMF1* ont été décrites dans la littérature comme responsables du phénotype d'hyperchylomicronémie, en conduisant un séquençage systématique des sujets MCM nous avons identifié la première délétion complète d'exon à l'état homozygote du gène *LMF1*. Ces résultats seront publiés par la suite.

Cas clinique

La patiente est une femme âgée de 40 ans aujourd'hui qui vit en France. Ses parents sont normotriglycéridémiques et cousins au 3^{ème} degré (grand-mères sœurs). Cette patiente a quatre frères dont deux ayant présenté des épisodes d'HTG modérées et un des HTG sévères avec des épisodes de pancréatites aiguës.

La première HTG sévère chez cette patiente a été rapportée de manière fortuite en 2011 au cours de sa deuxième grossesse (TG = 29.03 mmol/L) avec présence de CM, VLDL et une fraction importante d'IDL sur le lipidogramme, suite à une suspicion de diabète gestationnel qui n'a pas été avéré. Après mise en place d'un traitement (Lipanthyl et Omacor) et de mesures diététiques son HTG a diminué (TG = 11.34 mmol/L) mais ne s'est pas normalisée au cours de sa grossesse. Après cette grossesse ses TG restent élevés (TG = 6 mmol/L) avec présence d'IDL, de CM et VLDL sur lipidogramme comme précédemment décrit. Cette grossesse n'a pas été compliquée de pancréatite aiguë ni de complications obstétricales.

En 2013, lors de sa troisième grossesse des épisodes d'HTG sévères ont été de nouveau rapportées (TG max = 37.98 mmol/L), son activité LPL post-héparinique était diminuée (14.3 μ mol/L/min référence : 17-35 μ mol/L/min). Comme pour sa deuxième

grossesse il y a eu mise en place d'un traitement (Lipanthyl, et Omacor) et d'un régime hypolipidique, qui ont permis de diminuer l'HTG (TG= 9.7 mmol/L). La patiente n'a pas fait de diabète gestationnel au cours de cette grossesse non plus. Les lipidogrammes ont présenté les mêmes résultats que précédemment décrits, soit présence de CM, de VLDL et d'une grosse fraction d'IDL.

En 2016, un épisode d'HTG sévère est survenu (TG= 29.88 mmol/L). Le lipidogramme avait le même aspect que lors de ses épisodes d'HTG sévères précédents. Après remise en place de mesures diététiques et traitement annexe, une normalisation complète de sa concentration en TG (TG = 1.64mmol/L) a été observée. Son activité LPL post-héparinique fut normale (22 μ mol/L/min références : 22-47.6 μ mol/L/min).

Au cours de ces différents épisodes d'HTG cette patiente n'a pas présenté d'insuffisance rénale ni d'hypothyroïdie. Son bilan hépatique, son électrocardiogramme, son doppler et sa glycémie étaient normaux. Les seuls facteurs rapportés lors de ces épisodes d'HTG sont ses grossesses et/ou une alimentation déséquilibrée. Cependant ses concentrations en TG se normalisent sous observations de mesures hygiéno-diététiques.

Un consentement éclairé a été obtenu.

Méthodes

Mesure activité des lipases

La mesure des activités de la LPL et de la lipase hépatique (LH) chez cette patiente a été réalisée selon la technique précédemment décrite (218).

Analyse des gènes candidats

L'ADN génomique a été extrait à partir de sang périphérique prélevé sur tube EDTA en utilisant le kit FlexiGene® ADN (QIAGEN SpA, Milan, Italie). Tous les exons et leurs bornes introniques des gènes *LPL*, *GPIHBP1*, *APOC2*, *APOA5* ont été amplifiés par PCR. Les produits de PCR ont été analysés en utilisant la méthode de dénaturation de

chromatographie en phase liquide à haute performance (dHPLC, Transgenomic, Omaha, NE, USA) et en utilisant un mélange 1:1 avec un amplicon contrôle (type sauvage). Les variants mis en évidence ont été confirmés par séquençage en méthode Sanger (3500 DX Genetic Analyzer - Thermo Fisher Scientific). Les régions codantes incluant les bornes introniques des exons de *LMF1* (NM_022773.2) ont été amplifiées en utilisant les amorces décrites dans l'Article 2 de ce manuscrit. Au vu du résultat en séquençage Sanger pour l'exon 6 du gène *LMF1* chez cette patiente, une technique de NGS (Next Generation Sequencing) (Illumina, San Diego, CA) a été réalisée sur l'ADN de cette patiente. Des PCR longs fragments (long range) ont été réalisées à l'aide du kit SequalPrep (Invitrogen, Carlsbad, CA), selon les conditions d'utilisation du fournisseur, en utilisant les couples d'amorces designés par Primer 3 suivants : FAlu1-RAlu2 : 5'-cctggaacacatgggacctc-3' ; 5'-tggcaaagatgctgcccac-3' ; FAlu1-R7 : 5'-caccaccgactttctct-3' ; FAlu1-R844 : 5'-aactcccaacggaaggat-3' ; F592-R592 : 5'-gggcactcaagcctaacag-3' ; 5'-actgctctgtgcacctctc-3'.

Analyse fonctionnelle de Lmf1

L'analyse quantitative de l'activité de Lmf1 a été effectuée comme décrite dans l'Article 2 de ce manuscrit. En bref, des quantités limitantes (5 ng) de type sauvage et mutant de constructions contenant l'ADNc de *LMF1* ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour la LPL humaine dans la lignée cellulaire HEK-293T (lignée de cellules de rein embryonnaire humaine, ATCC® CRL-11268™). L'impact fonctionnel de variant *LMF1* a été estimé en tenant compte de l'activité de la LPL sécrétée dans le milieu de culture cellulaire normalisée. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur du vecteur *LMF1* sauvage.

Résultats

Cette patiente ne présente pas de mutation fonctionnelle causale dans les gènes *LPL*, *GPIHBP1*, *APOC2*, *APOA5* pouvant expliquer son phénotype. Elle présente cependant

le variant de susceptibilité sur le gène *APOA5* S19W, rs3135506, à l'état hétérozygote, et le variant de prédisposition C14F, rs11538389, sur *GPIHBP1* à l'état homozygote.

Concernant le gène *LMF1*, son exon 6 n'a pu être amplifié par la méthode classique de séquençage. Une délétion homozygote de son exon 6 a été suspectée. Ainsi des techniques de NGS et PCR long range ont permis de confirmer cette hypothèse. En effet, en technique NGS, l'exon 6 resta non amplifié. Afin de mettre en évidence cette délétion nous avons cherché si des séquences Alu se retrouvaient dans les introns encadrant l'exon 6 or une séquence Alu est retrouvée dans chacun des introns (Figure 31). Les séquences Alu sont des éléments courts d'environ 300 paires de bases riches en GC, les introns du génome humain contiennent de nombreuses séquences Alu. Elles peuvent ainsi conduire à des recombinaisons inégales entraînant des délétions ou duplications de séquences. Elles contribuent donc aux recombinaisons inter et intra-chromosomiques. Ainsi, les recombinaisons sont plus fréquentes autour des éléments Alu (219–221). Nous avons donc choisi de designer des amorces autour de ces régions. Les différentes conditions de PCR long range utilisées ont permis de mettre en évidence une délétion homozygote de 6507 paires de bases à proximité des séquences Alu : NM_022773.2 (*LMF1*): c.730-1528_898-3417del soit Chr16(GRCh38): g.874758_881265del soit une délétion de 56 acides aminés, résidus 244 à 299 ne décalant pas le cadre de lecture (Figures 30, 31, 32 et 33).

De plus, la patiente présente plusieurs variants à l'état homozygote sur le gène *LMF1*. La fréquence d'homozygotie des variants *LMF1* est très faible. On retrouve les variants p.Arg364Gln rs35168378, p.Leu454Leu, rs116726395, p.Arg510Arg rs200676184 et deux variants homozygotes sur sa région 3'UTR c.*231C>A rs75476513 et c.*835G>C rs7206528 (Figure 30).

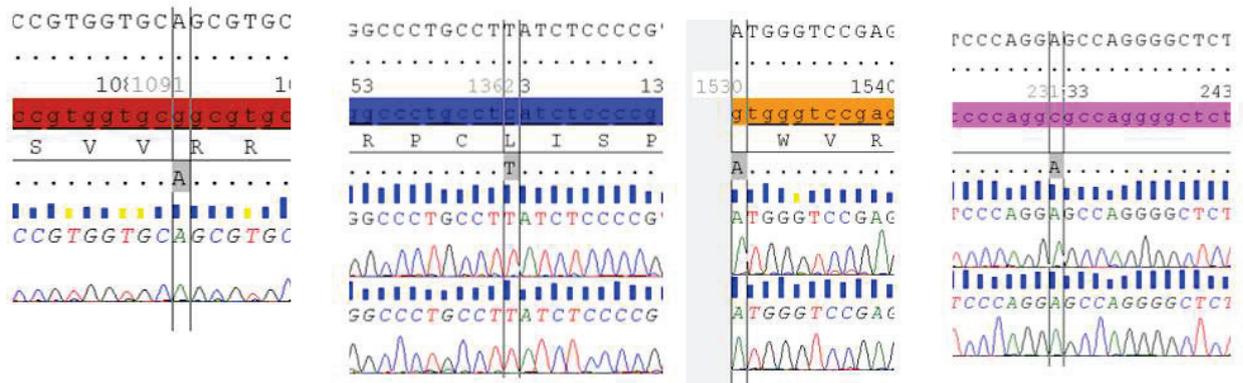


Figure 30 : Représentations de différents résultats de séquençages du gène LMF1 chez notre patient p.Arg364Gln rs35168378, p.Leu 454Leu, rs116726395, p.Arg510Arg rs200676184 c.*231C>A rs75476513, tous homozygotes

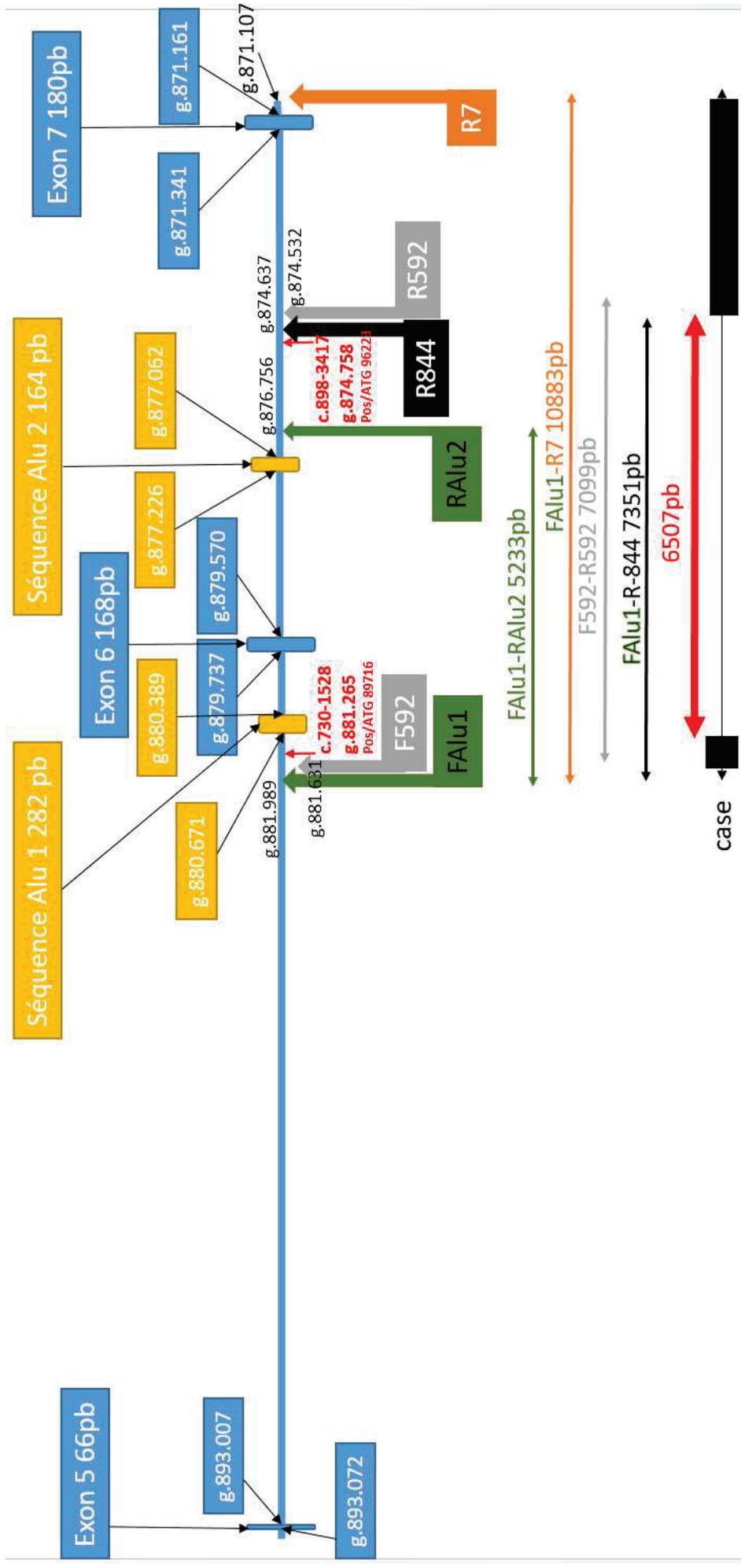


Figure 31 : Représentation schématique de la délétion homozygote du patient sur le gène LMF1 NM_022773.2

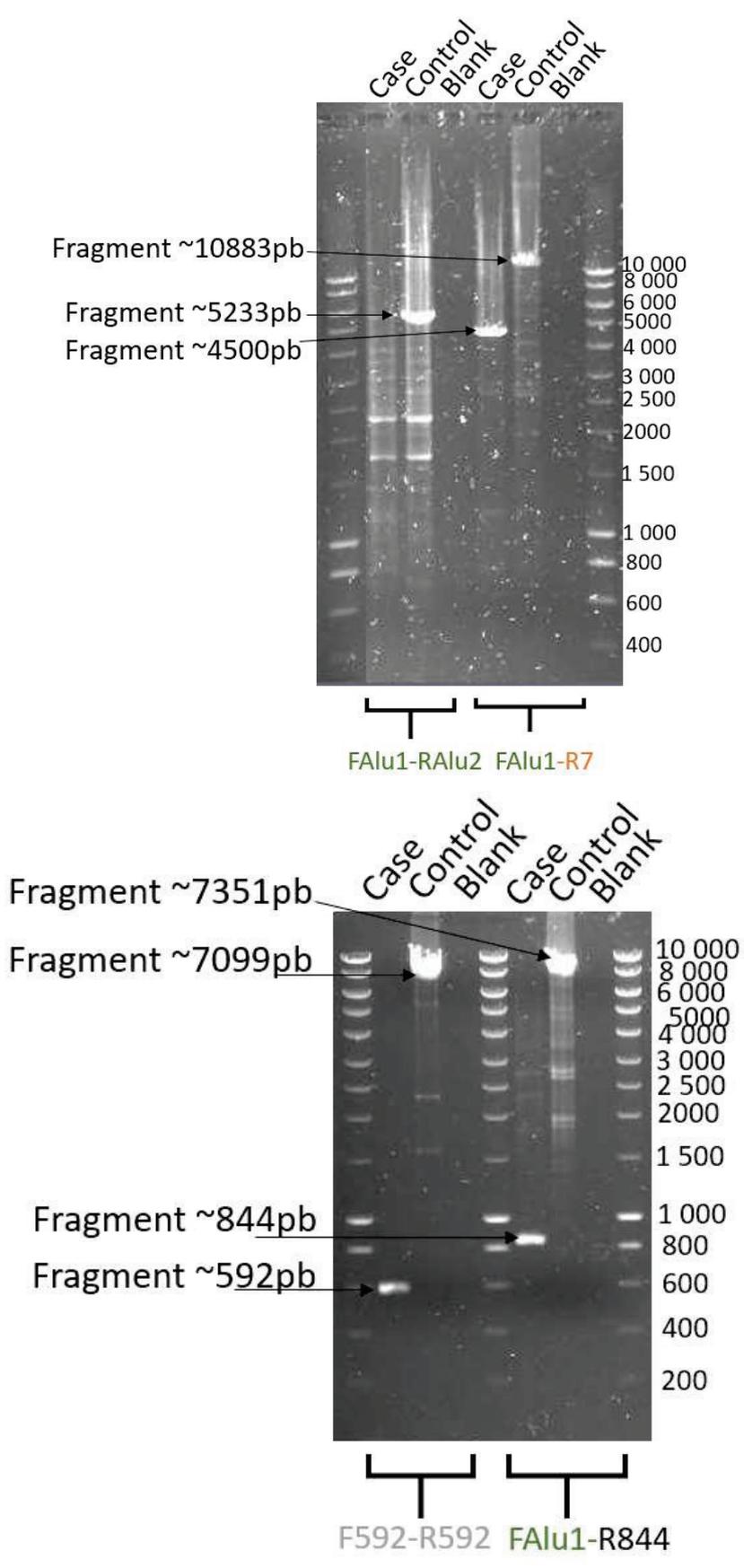


Figure 32 : Représentations des migrations des PCR long range chez notre patient mettant en évidence la délétion homozygote sur LMF1

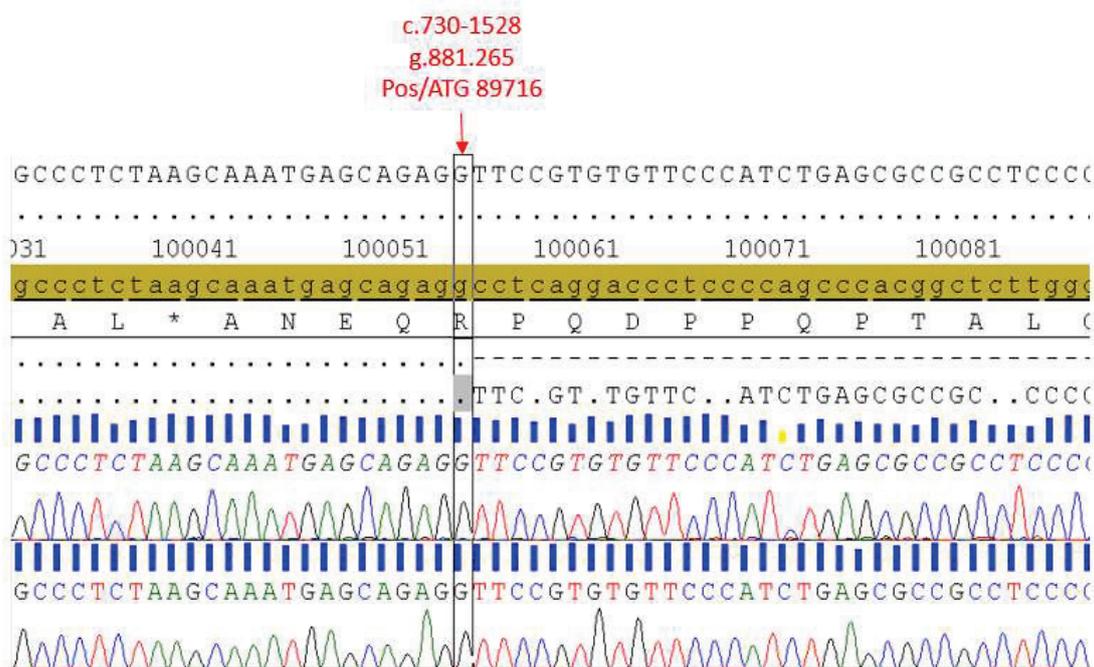


Figure 33 : Représentation du séquençage de la délétion homozygote sur le gène *LMF1* chez notre patient

De surcroît le variant p.Arg364Gln rs35168378 retrouvé à l'état homozygote chez cette patiente montre une diminution significative d'activité LPL in vitro d'après l'étude de l'Article 2. De plus le variant c.*231C>A rs75476513 homozygote montrerait d'après notre travail préliminaire une régulation par un microARN (voir partie Etude des variants situés sur la 3'UTR du gène *LMF1*, et leur potentielle régulation par des microARN de ce manuscrit).

Discussion

La LPL subit après sa synthèse une étape de maturation dans le réticulum endoplasmique (222) dans laquelle elle acquiert la conformation fonctionnelle dimérique. Le mécanisme moléculaire de ce processus met en jeu la protéine Lmf1. C'est une protéine chaperonne responsable du pliage correct et de la maturation de la LPL (148). La protéine Lmf1 contient cinq domaines transmembranaires, et 4 boucles (Figure 22 de ce manuscrit). La boucle C est responsable de la liaison de Lmf1 à la LPL. Dans le cas de notre patiente, ayant des épisodes hypertriglycéridémiques sévères se normalisant après

observation de mesures diététiques, nous avons mis en évidence une délétion homozygote de 6507 paires de bases. Cette délétion engendre la perte de l'exon 6 correspondant aux acides aminés 244 à 299 de la protéine Lmf1, ne décalant pas le cadre de lecture. Or cette région exonique correspondrait à une partie de la boucle C, responsable de la liaison de la protéine Lmf1 à la LPL. Ainsi cette délétion pourrait expliquer le phénotype de cette patiente. Cependant son phénotype d'hyperchylomicronémie est intermittent et est favorisé en présence de facteurs associés comme une grossesse chez cette patiente.

La patiente présente également un variant homozygote p.Arg364Gln rs35168378 sur le gène *LMF1* qui semblerait être délétère d'après notre étude in vitro décrite dans l'article 2, ainsi que le variant homozygote c.*231C>A sur sa région 3' non codante semblant être régulée par un microARN. Elle présente également le variant de susceptibilité sur le gène *APOA5* S19W, rs3135506, à l'état hétérozygote, et le variant de prédisposition C14F, rs11538389 sur *GPIHBP1* à l'état homozygote.

Ainsi la délétion homozygote de l'exon 6 du gène *LMF1* semble être responsable du phénotype d'hyperchylomicronémie retrouvé chez cette patiente lorsqu'il est associé à des facteurs environnementaux (déséquilibre alimentaire, grossesse). Le phénotype d'hyperchylomicronémie intermittent retrouvé chez cette patiente confirme l'hypothèse d'associations de variants engendrant la survenue de l'hyperchylomicronémie en présence de facteurs associés et montre qu'une délétion homozygote d'un exon entier du gène *LMF1* ne serait pas responsable à lui seul d'un phénotype d'hyperchylomicronémie.

Partie 3 : Discussion synthétique

En s'appuyant sur la revue bibliographique nous savons que l'hyperchylomicronémie est une maladie rare et complexe impliquant plusieurs gènes qui sont eux-mêmes fortement régulés par plusieurs mécanismes concomitants. 95% des patients sont atteints d'une prédisposition héréditaire polygénique et seulement 5% présentent une transmission autosomique récessive monogénique (4,38,40). La causalité due à la présence de variants ou d'une association de variants n'est pas toujours clairement définie. De plus, environ 30% des patients atteints d'hyperchylomicronémie d'allure primitive n'ont pas de variant rare ni de SNP commun (4). Ceci suggère l'intervention d'un ou de plusieurs mécanismes encore non identifiés dans la survenue des hyperchylomicronémies.

Nous avons essayé d'appréhender certains mécanismes causals dans la survenue de l'hyperchylomicronémie en lien avec la présence de variants sur les gènes régulateurs du métabolisme des triglycérides. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux gènes *APOC3* et *LMF1*.

Etudes sur la régulation par les microARN des variants des régions 3'UTR des gènes *LMF1* et *APOC3*

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à caractériser les variants de la 3'UTR du gène *APOC3* associés à l'hypertriglycéridémie et à étudier leur régulation éventuelle par des microARN. Malgré les arguments de la littérature en faveur d'une possible régulation post-transcriptionnelle et les pertes potentielles de site de fixation détectée en analyse bio-informatique, nos données fonctionnelles in vitro ne sont pas en faveur d'une régulation directe par un microARN hépatique ou intestinal pour expliquer l'effet hypertriglycéridémiant du polymorphisme SstI de l'*APOC3*. Dans une autre étude utilisant les modèles cellulaires HepG2 et HEK-293T, cette régulation n'a pas pu être mise en évidence non plus (205). L'association du variant SstI à la triglycéridémie reste donc encore inexplicée. La régulation par un microARN pourrait être une régulation indirecte à distance par un microARN ciblant d'autres variants géniques en déséquilibre de liaison avec le variant SstI ou au niveau du promoteur du gène *APOC3*. L'association SstI-TG

pourrait être liée à son déséquilibre de liaison à d'autres polymorphismes du gène *APOC3*, comme les variants du promoteur ou à d'autres polymorphismes du cluster *APOA1/C3/A4/A5*, comme le variant c.*158C>T (rs2266788) du gène *APOA5*, eux même associés aux TG, ou encore à une association à des facteurs environnementaux. Ainsi, la présence du variant SstI serait un facteur de susceptibilité d'hyperchylomicronémie. Le phénotype d'hyperchylomicronémie serait corrélé aux facteurs environnementaux des patients ainsi qu'à leurs facteurs de prédispositions génétiques retrouvés sur les gènes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à caractériser les variants de la 3'UTR du gène *LMF1* dans une population hypertriglycéridémique et à étudier leur régulation éventuelle par des microARN. *LMF1* est un gène découvert récemment et peu étudié, de ce fait nous n'avons que peu d'éléments de comparaison et d'arguments en faveur de notre hypothèse de travail. Après analyse de la 3'UTR de *LMF1* dans notre cohorte composée de 385 patients nous avons identifiés 18 variants sur l'intégralité de la 3'UTR de *LMF1* d'une longueur de 898 nucléotides. L'étude sur la régulation post-transcriptionnelle de *LMF1* par des microARN, au niveau des variants sélectionnés retrouvés sur la 3'UTR de *LMF1*, et testés fonctionnellement in vitro, permet de mettre en évidence trois variants : c*231C>A, c*512G>A et c*530G>A ayant une activité luciférase significativement diminuée par rapport à la séquence sauvage de la 3'UTR de *LMF1* dans notre modèle. Ce qui semblerait confirmer notre hypothèse de départ, à savoir la création d'un site de fixation d'un microARN en présence d'un variant sur la 3'UTR serait associée à l'HTG. Cependant, les études in silico nous donnent de nombreux microARN candidats que nous n'avons pas testés individuellement. Des manipulations supplémentaires sont nécessaires pour permettre de conclure sur l'effet spécifique d'un microARN particulier en présence d'un variant sur la 3'UTR du gène *LMF1*. Cependant il n'est pas exclu qu'aucun des microARN candidats sélectionnés ne montrent d'effet, ni que la régulation ne soit pas indirecte, ou que l'effet soit dû à un déséquilibre de liaison. Ainsi cette étude doit être complétée.

L'étude de la régulation par les microARN du gène *APOC3* s'avère être négative dans notre modèle, cependant l'étude sur *LMF1* semble être prometteuse. Au vu des résultats de l'équipe sur la régulation par les microARN pour les gènes *APOA5* et *LPL*, on

pourrait se demander si les gènes *GPIHBP1* et *APOC2*, gènes impliqués dans la lipolyse intravasculaire, ne pourraient pas eux aussi faire l'objet d'une régulation par microARN. En effet les variants des régions 3' non codantes des gènes impliqués dans la régulation de la triglycémie semblent régulés par les microARN comme le montrent plusieurs études, d'où l'importance des microARN dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines (223), avec par exemple la régulation de la LPL par le microARN miR-410 en présence du variant rs13702 (73).

Un facteur à prendre en considération lors de la régulation par les microARN est la longueur de la 3'UTR. En effet plus la 3'UTR est courte moins elle semble être régulée par les microARN. De plus, les ARNm ayant des cibles pour les microARN ont des vitesses de désintégration plus rapides. En outre, cette vitesse de dégradation semble corrélée positivement avec le nombre ou la densité de sites cibles situés dans le transcrite d'ARNm (224). La 3'UTR du gène *APOC3* fait 187 nucléotides, celle de *LMF1* 898 nucléotides, ce qui pourrait expliquer les résultats que nous avons obtenu. Pour le gène *GPIHBP1* la 3'UTR fait 1651 nucléotides, et celle du gène *APOC2* 316 nucléotides. Au vu de ce critère, le gène *GPIHBP1* ferait un bon candidat pour une régulation par un microARN. Cependant une étude sur *APOC2* montre que chez un patient la transcription de l'ARNm d'*APOC2* est diminuée en absence de variant rare sur ce gène, cependant il présente plusieurs SNP non causals notamment sur la région 3'UTR du gène. Ces résultats pourraient laisser penser à une régulation par les microARN (225).

Concernant les microARN candidats identifiés, les logiciels utilisés (PITA et RegRNA) sont des logiciels de prédiction et peuvent ne pas mettre en évidence tous les candidats potentiels. Les scores obtenus dans nos études avec ces logiciels de prédiction restent discutables selon les seuils sélectionnés. Lors de l'étude sur *APOA5* (6), les scores obtenus étaient meilleurs, cependant ceux obtenus sur l'étude de la *LPL* (7) étaient de même ampleur. De plus, on observe des discordances entre les scores de prédiction et les tests fonctionnels in vitro. Comme leurs noms l'indiquent ce sont des scores de prédiction qui ne peuvent pas refléter nécessairement ce qui se passe de manière physiologique.

La structure secondaire de l'ARNm est un critère très important pour la fixation des microARN. En effet selon les différents repliements, le microARN pourra accéder ou non à son site de liaison prédit par complémentarité. Cependant les scores de prédiction donnés par les logiciels PITA et RegRNA prennent en compte la structure secondaire.

Mais, il est possible que la conformation secondaire physiologique de l'ARNm d'*APOC3* ou de *LMF1* nécessite la présence de l'intégralité de la séquence de l'ARNm afin de pouvoir induire une perte de fixation d'un microARN. Or nos modèles n'intègrent que la 3'UTR de ces gènes pouvant potentiellement rendre inaccessible un site de fixation à un microARN. La structure secondaire de la 3'UTR d'*APOC3* seule (sans le reste de la séquence), en présence ou non de *SstI* est sensiblement différente. Une boucle est créée en présence de *SstI* (Figure 34), ceci serait en faveur d'une régulation par un microARN (226,227).

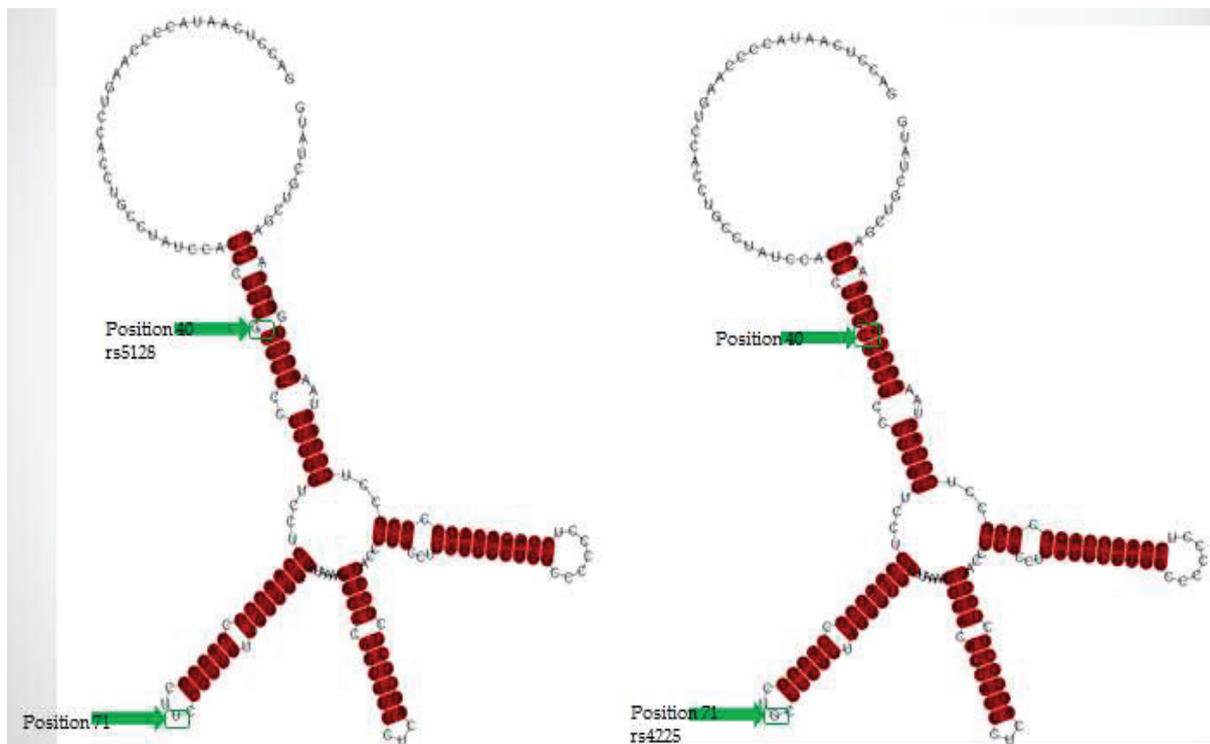


Figure 34 : Représentation de la structure secondaire de la 3'UTR d'*APOC3* via Freiburg RNA Tools-
LocARNA – Alignment and Folding

On peut voir au niveau de la flèche verte en position 40 la création d'une petite boucle en présence du variant *SstI*

Le modèle utilisé (constructions luciféras), ne représente donc pas la séquence de l'ARNm dans son ensemble mais uniquement la séquence de la 3'UTR. De plus, tous les tests sont réalisés *in vitro*, au vu des différentes données on peut penser que nos modèles sont assimilables à la physiologie humaine, cependant on ne peut pas garantir le même impact au niveau physiologique, ce qui reste une limite de notre modèle.

Perspectives des études de régulation par les microARN

L'expression des microARN est elle-même régulée, notamment par l'environnement nutritionnel. Par exemple une étude a montré que l'obésité influence l'expression des microARN dans le tissu adipeux avec une altération de l'expression de quelques microARN expérimentalement vérifiée chez l'homme (228). Ainsi, les gains ou pertes de fixation de certains microARN pourraient être impactés par l'environnement du patient. Or on sait que le phénotype complexe d'hyperchylomicronémie est en partie dû à de fortes interactions génétique-environnement. De plus, notre modèle est cellulaire et ne prend pas en compte l'état nutritionnel ou physiologique du patient. Ainsi, les résultats observés dans nos études pourraient s'avérer discordants avec ceux obtenus au niveau physiologique.

L'activité de la LPL, fortement régulée, est également modulée par des facteurs nutritionnels, son activité est diminuée en période de jeûne et augmentée en période postprandiale (198). Les mécanismes de cette régulation restent encore mal compris cependant ils pourraient faire intervenir des facteurs comme l'insuline ou les facteurs de transcription PPAR gamma ou SREBP-1 (197). Or comme décrit dans la revue bibliographique sur les microARN, certains microARN sont décrits comme régulant ces facteurs de transcription, avec par exemple les microARN miR-33a et miR-33b régulant *SREBP* (168). Ainsi les microARN joueraient un rôle dans la régulation de la triglycéridémie mais pas uniquement au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme des TG mais aussi au niveau de gènes ou facteurs les régulant, ce que nous ne prenons pas en compte dans nos modèles.

On pourrait penser à utiliser les microARN comme biomarqueur, notamment comme biomarqueur de l'état nutritionnel ou bien même de l'activité LPL. En effet leur concentration est fortement modulée par différents facteurs et également dans certaines pathologies (170,170,229,230). Par exemple, dans le cas de l'obésité il y a une altération de l'expression des microARN : miR-143 et miR-223, qui peuvent être utilisés comme biomarqueur des changements métaboliques de l'obésité (231). On pourrait donc imaginer mettre en évidence des microARN ayant leur expression modulée en présence d'hyperchylomicronémie et les utiliser en tant que biomarqueur afin de distinguer les

différents mécanismes impliqués dans la survenue de la pathologie, ce qui permettrait de faciliter le diagnostic.

Les microARN représentent une perspective thérapeutique, quelques thérapies sont développées ayant pour base les microARN. C'est le cas d'un oligonucléotide anti-miR-122 conjugué à un autre traitement, cette association permet une réduction significative de la charge virale de patients atteints d'affection chronique par l'hépatite C (232). Des thérapies ciblées sur les microARN pourraient être une nouvelle approche pour le traitement des dyslipidémies et des maladies cardiovasculaires associées. Cependant, le traitement chronique ou la suppression de l'expression des microARN : miR-122 et miR-33, microARN impliqués dans le métabolisme des TG, ont entraîné l'apparition d'effets indésirables incluant la dyslipidémie, l'obésité, la stéatose hépatique et le carcinome hépatocellulaire dans des modèles murins. Ces résultats, ainsi que l'incapacité à démontrer les mécanismes spécifiques par lesquels les microARN induisent ces effets phénotypiques ont soulevé des inquiétudes sur l'utilisation de thérapies à base de microARN dans les dyslipidémies (233). En outre, la compréhension du mécanisme d'action de certains microARN modulant le métabolisme des lipoprotéines permettrait de révéler de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les HTG. Sous réserve de la spécificité d'action du microARN, sa potentielle utilisation devra être ciblée au vu de son expression ubiquitaire.

Etude fonctionnelle des variants codants du gène *LMF1*

Nous avons mis au point les différentes techniques moléculaires permettant de rechercher des mutations sur le gène *LMF1* afin de compléter le diagnostic moléculaire d'hyperchylomicronémie. Cependant, au vu de la découverte récente de ce gène nous n'avons pas assez de recul pour conclure sur l'effet délétère des variants retrouvés. Après analyse des mutations avec le logiciel Alamut, en regardant les scores de prédictions Polyphen et SIFT (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> et http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html) (215,216), nous avons sélectionnés certains variants codants à tester fonctionnellement. De ce fait nous avons

mis en place un test fonctionnel in vitro. Nous avons utilisé la méthode de mesure de l'activité LPL post-héparinique avec substrat VLDL afin d'identifier les variants délétères qui induiraient une diminution de l'activité LPL (217).

Les résultats de cette étude montrent que certains variants *LMF1* influencent l'activité LPL et donc seraient en faveur de l'apparition de l'HTG chez les patients concernés et pourraient en partie expliquer le phénotype. Cependant au vu de l'hétérozygotie fréquente de ces variants ces résultats semblent avoir un impact faible. Cependant la technique de mesure d'activité LPL utilisée dans notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative d'activité LPL de patients hétérozygotes pour des mutations *LPL* ou *APOA5* tandis qu'on met en évidence une différence significative en présence de variants *LMF1*. Ainsi, l'effet de ces variants *LMF1* n'est peut-être pas si anodin. Ce test fonctionnel reste une méthode appréciable permettant d'avoir une idée de l'impact d'un variant retrouvé sur *LMF1* au vu de la faible bibliographie.

Cependant, les phénotypes observés chez des patients homozygotes, comme le patient homozygote p.Gly172Arg, le patient hétérozygote composite du variant p.Trp464Ter et le patient délété de l'exon 6, suggèrent que les variants retrouvés sur le gène *LMF1* pourraient induire une hyperchylomicronémie intermittente se déclarant transitoirement en présence de facteurs secondaires associés comme dans les cas présentés à un déséquilibre alimentaire, une grossesse ou une infection sévère aiguë.

Ainsi, le gène *LMF1* semble avoir un fort potentiel dans son implication dans la survenue de l'hyperchylomicronémie, mais au vu des variabilités phénotypiques observées en présence de variants l'association à d'autres facteurs génétiques de prédisposition ou facteurs secondaires, environnementaux semblent indispensable à la déclaration du phénotype.

Conclusions - Perspectives

L'hyperchylomicronémie est une maladie présentant un phénotype pléiotrope complexe. Cependant, au fil des ans, des découvertes permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les anomalies du métabolisme des LRTG. Nos travaux essaient d'appréhender certains mécanismes impliqués dans une physiopathologie seulement partiellement élucidés. La LPL est l'enzyme clef de la lipolyse intravasculaire, elle est fortement régulée, notamment par les gènes *APOC3* et *LMF1*, gènes que nous avons choisi d'étudier.

Dans un premier temps, nos travaux sur la 3'UTR du gène *APOC3* ont permis d'associer significativement le variant rs5128, SstI à l'HTG majeure des malades MCM, de mettre en évidence qu'il était en déséquilibre de liaison complet avec un autre variant rs4225, BbvI présent également sur la 3'UTR du gène *APOC3*, et de montrer qu'il ne mettait pas en jeu directement une régulation par un microARN.

Dans un deuxième temps, nos travaux sur la 3'UTR du gène *LMF1* ont permis de découvrir de nouveaux variants sur cette 3'UTR et leurs déséquilibres de liaison. Les résultats préliminaires obtenus permettent de dire qu'une régulation par les microARN est fort probable. Cependant ce travail nécessite d'être plus approfondi.

Dans un troisième temps, la mise en place du diagnostic moléculaire de *LMF1* au sein du laboratoire et la mise en place d'un test fonctionnel permettant de conclure sur l'effet délétère d'un variant *LMF1* nous permet de compléter le rendu diagnostic des patients hyperchylomicronémiques et de mieux comprendre l'impact de la présence de certains variants.

Ainsi, nos travaux permettent d'améliorer notre compréhension de la régulation des LRTG par la mise en évidence de régulation post-transcriptionnelles mettant en jeu les microARN des gènes impliqués dans la régulation de la lipolyse intravasculaire, et par le développement d'analyses fonctionnelles sur le gène *LMF1*. Cependant la forte influence de l'environnement nutritionnel du patient et de ses comorbidités est à prendre en considération. Il est donc indispensable de corrélérer le phénotype-génotype avec les

facteurs secondaires ou environnementaux de chaque patient. Nos études *in vitro* ne prennent pas en considération ce dernier aspect, ce qui reste une limite de nos modèles.

D'autres études sur la régulation post-transcriptionnelle par les microARN restent à mener afin de compléter nos connaissances des gènes impliqués dans la lipolyse intravasculaire, avec notamment les gènes candidats *GPIHPB1* et *APOC2*. De plus, il est essentiel de continuer le diagnostic moléculaire du gène *LMF1* et de poursuivre les travaux fonctionnels afin de pouvoir conclure sur l'effet potentiel des variants retrouvés chez des patients hypertriglycéridémiques.

Il reste encore beaucoup de travail et d'études à mener afin de comprendre la régulation de la lipolyse intravasculaire dans son ensemble. D'après les résultats présentés nous pouvons voir que différents mécanismes de régulation sont imbriqués les uns avec les autres, il n'y a pas de modèle type et l'impact de l'environnement joue un rôle primordial dans l'apparition de l'hyperchylomicronémie. La présence de certains variants ou d'association de variants ne restent que des facteurs de susceptibilité.

Le phénotype d'hyperchylomicronémie est généralement la résultante d'une association de variants prédisposant de gènes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie à des facteurs secondaires, environnementaux. Ainsi le développement au sein du laboratoire du diagnostic moléculaire avec la technique NGS (Next Generation Sequencing) permettant l'exploration simultanée des différents gènes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie chez des patients présentant une hypertriglycéridémie permettra de corrélérer plus finement l'association génotype-phénotype de chaque patient.

Références bibliographiques

1. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Jun;11(6):352–62.
2. Lewis GF, Xiao C, Hegele RA. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rev*. 2015 Feb;36(1):131–47.
3. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012 Aug;272(2):185–96.
4. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Jun;11(6):352–62.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
6. Caussy C, Charrière S, Marçais C, Di Filippo M, Sassolas A, Delay M, et al. An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site. *Am J Hum Genet*. 2014 Jan 2;94(1):129–34.
7. Caussy C, Charrière S, Meirhaeghe A, Dallongeville J, Lefai E, Rome S, et al. Multiple microRNA regulation of lipoprotein lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a triglyceride-lowering haplotype harboring p.Ser474Ter. *Atherosclerosis*. 2016 Jan 11;246:280–6.
8. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Jun;21(3):198–203.
9. Claude L. *Les lipides dans le monde vivant*. Lavoisier; 2010. 307 p.
10. Ball DW, Hill JW, Scott RJ. *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry*, v. 1.0. Flat World Education, Inc. 2016.
11. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2012 mai;1821(5):826–32.
12. Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J Gastroenterol*. 2015 Sep 28;21(36):10299–313.
13. Radder DJ, Hobbs HH. disorders of lipoprotein metabolism. In: *Harrison's principles of internal medicine*.
14. Gautier T, Masson D, Lagrost L. Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme. *EMC - Endocrinol - Nutr*. 2010 Jan;7(2):1–16.
15. Hooper AJ, Burnett JR, Watts GF. Contemporary aspects of the biology and therapeutic regulation of the microsomal triglyceride transfer protein. *Circ Res*. 2015 Jan 2;116(1):193–205.
16. toussaint J. *L'athérosclérose - Physiologie, diagnostics, thérapeutiques*. masson. masson, Paris; 2003. 808 p.

17. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Jun;25(3):200–6.
18. Di Filippo M, Moulin P, Roy P, Samson-Bouma ME, Collardeau-Frachon S, Chebel-Dumont S, et al. Homozygous MTP and APOB mutations may lead to hepatic steatosis and fibrosis despite metabolic differences in congenital hypocholesterolemia. *J Hepatol*. 2014 Oct;61(4):891–902.
19. Miller SA, Burnett JR, Leonis MA, McKnight CJ, van Bockxmeer FM, Hooper AJ. Novel missense MTP gene mutations causing abetalipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1842(10):1548–54.
20. Kolovou G, Vasiliadis I, Gontoras N, Kolovou V, Hatzigeorgiou G. Microsomal transfer protein inhibitors, new approach for treatment of familial hypercholesterolemia, review of the literature, original findings, and clinical significance. *Cardiovasc Ther*. 2015 Apr;33(2):71–8.
21. Blanc V, Farré J-C, Litvak S, Araya A. Réécriture du matériel génétique : fonctions et mécanismes de l'édition de l'ARN. *médecine/sciences*. 2002 Feb;18(2):181–92.
22. Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schürmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep*. 2013 Feb 22;33(1):1–9.
23. CISMef. CISMef [Internet]. [cited 2015 Apr 15]. Available from: <http://www.chu-roouen.fr/page/metabolisme-des-lipides>
24. Montalto MB, Bensadoun A. Lipoprotein lipase synthesis and secretion: effects of concentration and type of fatty acids in adipocyte cell culture. *J Lipid Res*. 1993 Mar;34(3):397–407.
25. Mao HZ, Ehrhardt N, Bedoya C, Gomez JA, DeZwaan-McCabe D, Mungrue IN, et al. Lipase Maturation Factor 1 (Lmf1) Is Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Through Activating Transcription Factor 6 α (Atf6 α) Signaling. *J Biol Chem*. 2014 Aug 29;289(35):24417–27.
26. Brunzell JD. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2016 Dec 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/>
27. Tan MH. The lipoprotein lipase system: new understandings. *Can Med Assoc J*. 1978 Mar 18;118(6):675–80.
28. Davies BSJ, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Feb;23(1):35–42.
29. Barter PJ, Rye K-A. Targeting High-Density Lipoproteins to Reduce Cardiovascular Risk: What Is the Evidence? *Clin Ther*. 2015 Aug 18;
30. Oliveira HCF, de Faria EC. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life*. 2011 Apr;63(4):248–57.
31. Chung B-H, Liang P, Doran S, Cho BHS, Franklin F. Postprandial chylomicrons: potent vehicles for transporting cholesterol from endogenous LDL+HDL and cell membranes to the liver via LCAT and CETP. *J Lipid Res*. 2004 Jul;45(7):1242–55.

32. Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS. High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(1):39–57.
33. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Sep;22(9):353–63.
34. Perret B, Azéma C, Jaspard B, Danet C, Barbaras R, Collet X. La triglycéride lipase hépatique : structure, régulation, rôles métaboliques et implications physiopathologiques. *Sang Thromb Vaiss*. 1995 Mar 18;7(3):165–74.
35. BIOCHIMIE - Constantes biologiques adultes_2009.pdf [Internet]. [cited 2016 Mar 10]. Available from: http://www.cnci.univ-paris5.fr/pharmacie/Constantes_biologiques_adultes_2009.pdf
36. Le risque cardio-vasculaire | Nouvelle Société Française d’Athérosclérose [Internet]. [cited 2016 Mar 10]. Available from: <http://www.nsfa.asso.fr/researchers/medical-resources/medical-help-decision-process/le-risque-cardio-vasculaire?language=en>
37. Brisson G. Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires. Presses Université Laval; 1982. 216 p.
38. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*. 1967 Feb 2;276(5):273–281 concl.
39. PMC E. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull World Health Organ*. 1970;43(6):891.
40. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Aug;2(8):655–66.
41. Ferri N, Corsini A, Macchi C, Magni P, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: experimental animal models and clinical evidence. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2015 Oct 20;
42. Brun N, Rodondi N. Dépistage et prise en charge des dyslipidémies familiales : point de vue du pédiatre et de l’interniste généraliste. *Rev Med Suisse*. 2012;(8):494–500.
43. Items 129, 129 bis : Dyslipidémies - cours.pdf [Internet]. [cited 2016 Mar 10]. Available from: http://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement/nutrition_28/site/html/cours.pdf
44. Wardell MR, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carrell RW. Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg---Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1987 Aug;80(2):483–90.
45. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(1):1–12.
46. Leaf DA. Chylomicronemia and the chylomicronemia syndrome: a practical approach to management. *Am J Med*. 2008 Jan;121(1):10–2.

47. Familial Chylomicronemia Syndrome [Internet]. [cited 2017 Jan 6]. Available from: <http://fcs.raredr.com/>
48. GUITARD MORET M, CUGNET C, CHARRIERE S, SASSOLAS A, MARCAIS C, MOULIN P. Diagnostic étiologique des hyperchylomicronémies. *Feuill Biol.* 2010;51(293):35–41.
49. Stroes E, Moulin P, Parhofer KG, Rebours V, Löhr J-M, Aversa M. Diagnostic algorithm for familial chylomicronemia syndrome. *Atheroscler Suppl.* 2017 Jan;23:1–7.
50. Chait A, Subramanian S, Brunzell JD. Genetic Disorders of Triglyceride Metabolism. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2015 Dec 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326743/>
51. Tremblay K, Méthot J, Brisson D, Gaudet D. Etiology and risk of lactescent plasma and severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol.* 2011 Feb;5(1):37–44.
52. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, Alexander VJ, Singleton W, Hughes SG, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med.* 2014 Dec 4;371(23):2200–6.
53. Gaudet D, Brisson D. Gene-based therapies in lipidology: current status and future challenges. *Curr Opin Lipidol.* 2015 Dec;26(6):553–65.
54. Julve J, Martín-Campos JM, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2016 Apr 1;455:134–48.
55. Hayne CK, Lafferty MJ, Eglinger BJ, Kane JP, Neher SB. Biochemical Analysis of the Lipoprotein Lipase Truncation Variant, LPL(S447X), Reveals Increased Lipoprotein Uptake. *Biochemistry (Mosc).* 2017 Jan 9;
56. Haute Autorité de Santé - GLYBERA (alipogène tiparvovec), thérapie génique [Internet]. [cited 2017 Jan 10]. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2579395/fr/glybera-alipogene-tiparvovec-therapie-genique
57. Wang LR, Hegele RA. Genetics for the Identification of Lipid Targets Beyond PCSK9. *Can J Cardiol.* 2017 Mar;33(3):334–42.
58. Schwarzova L, Hubacek JA, Vrablik M. Genetic predisposition of human plasma triglyceride concentrations. *Physiol Res.* 2015;64 Suppl 3:S341-354.
59. Hegele RA. Multidimensional regulation of lipoprotein lipase: impact on biochemical and cardiovascular phenotypes. *J Lipid Res.* 2016 Sep;57(9):1601–7.
60. Soto AG, McIntyre A, Agrawal S, Bialo SR, Hegele RA, Boney CM. Severe Hypertriglyceridemia due to a novel p.Q240H mutation in the Lipoprotein Lipase gene. *Lipids Health Dis.* 2015 Sep 4;14:102.
61. Rodrigues CEM, Bonfá E, Carvalho JF. Review on anti-lipoprotein lipase antibodies. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2010 Nov 11;411(21–22):1603–5.

62. Pruneta V, Moulin P, Labrousse F, Bondon PJ, Ponsin G, Berthezene F. Characterization of a new case of autoimmune type I hyperlipidemia: long-term remission under immunosuppressive therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Mar;82(3):791–6.
63. Rodrigues R, Artieda M, Tejedor D, Martínez A, Konstantinova P, Petry H, et al. Pathogenic classification of LPL gene variants reported to be associated with LPL deficiency. *J Clin Lipidol.* 2016 Apr;10(2):394–409.
64. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012 Feb 1;5(1):66–72.
65. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res.* 2011 Feb;52(2):189–206.
66. Johansen CT, Hegele RA. Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):833–42.
67. Patni N, Ahmad Z, Md DPW. Genetics and Dyslipidemia. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2017 Jan 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395584/>
68. Yu X-H, Zhao T-Q, Wang L, Liu Z-P, Zhang C-M, Chen R, et al. A novel substitution at the translation initiator codon (ATG-->ATC) of the lipoprotein lipase gene is mainly responsible for lipoprotein lipase deficiency in a patient with severe hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 3;341(1):82–7.
69. Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res.* 1996 Dec;37(12):2627–37.
70. De Castro-Orós I, Civeira F, Pueyo MJ, Mateo-Gallego R, Bolado-Carrancio A, Lamíquiz-Moneo I, et al. Rare genetic variants with large effect on triglycerides in subjects with a clinical diagnosis of familial vs nonfamilial hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol.* 2016 Aug;10(4):790–7.
71. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* 2002 Dec;43(12):1997–2006.
72. Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. *J Intern Med.* 2008 Apr;263(4):450–8.
73. Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, Tanaka T, Smith CE, Lai C-Q, et al. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. *Am J Hum Genet.* 2013 Jan 10;92(1):5–14.
74. Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Aug;22(4):247–53.
75. Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2002 Feb 8;277(6):4334–42.

76. de Graaf J, Hoffer MJ, Stuyt PM, Frants RR, Stalenhoef AF. Familial chylomicronemia caused by a novel type of mutation in the APOE-CI-CIV-CII gene cluster encompassing both the APOCII gene and the first APOCIV gene mutation: APOCII-CIV(Nijmegen). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 14;273(3):1084–7.
77. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar;19(3):472–84.
78. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Nov;27(11):2450–5.
79. Beckstead JA, Oda MN, Martin DDO, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry (Mosc)*. 2003 Aug 12;42(31):9416–23.
80. Schaap FG, Rensen PCN, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RAFM, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27941–7.
81. Gao X, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Oct 19;427(2):361–5.
82. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):15–21.
83. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 fifteen years anniversary: Lessons from genetic epidemiology. *Gene*. 2016 Oct 30;592(1):193–9.
84. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res*. 2011 Feb;52(2):189–206.
85. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*. 2002 Nov 15;11(24):3031–8.
86. Gombojav B, Lee SJ, Kho M, Song Y-M, Lee K, Sung J. Multiple susceptibility loci at chromosome 11q23.3 are associated with plasma triglyceride in East Asians. *J Lipid Res*. 2016 Feb;57(2):318–24.
87. Beigneux AP, Davies BSJ, Bensadoun A, Fong LG, Young SG. GPIHBP1, a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S57–62.
88. Gin P, Yin L, Davies BSJ, Weinstein MM, Ryan RO, Bensadoun A, et al. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29554–62.
89. Beigneux AP, Davies BSJ, Tat S, Chen J, Gin P, Voss CV, et al. Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2011 Jun 3;286(22):19735–43.

90. Adeyo O, Goulbourne CN, Bensadoun A, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 and the intravascular processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med.* 2012 Dec;272(6):528–40.
91. Beigneux AP, Fong LG, Bensadoun A, Davies BSJ, Oberer M, Gårdsvoll H, et al. GPIHBP1 missense mutations often cause multimerization of GPIHBP1 and thereby prevent lipoprotein lipase binding. *Circ Res.* 2015 Feb 13;116(4):624–32.
92. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, et al. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1675-1679.
93. Ariza MJ, Martínez-Hernández PL, Ibarretxe D, Rabacchi C, Rioja J, Grande-Aragón C, et al. Novel mutations in the GPIHBP1 gene identified in 2 patients with recurrent acute pancreatitis. *J Clin Lipidol.* 2016 Feb;10(1):92–100.e1.
94. Rios JJ, Shastry S, Jasso J, Hauser N, Garg A, Bensadoun A, et al. Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. *J Inherit Metab Dis.* 2012 May;35(3):531–40.
95. Patni N, Brothers J, Xing C, Garg A. Type 1 hyperlipoproteinemia in a child with large homozygous deletion encompassing GPIHBP1. *J Clin Lipidol.* 2016 Aug;10(4):1035–1039.e2.
96. Berge KE, Retterstøl K, Romeo S, Pirazzi C, Leren TP. Type 1 hyperlipoproteinemia due to a novel deletion of exons 3 and 4 in the GPIHBP1 gene. *Atherosclerosis.* 2014 May;234(1):30–3.
97. Lund-Katz S, Weisgraber KH, Mahley RW, Phillips MC. Conformation of apolipoprotein E in lipoproteins. *J Biol Chem.* 1993 Nov 5;268(31):23008–15.
98. den Hartigh LJ, Altman R, Hutchinson R, Petrlova J, Budamagunta MS, Tetali SD, et al. Postprandial apoE isoform and conformational changes associated with VLDL lipolysis products modulate monocyte inflammation. *PLoS One.* 2012;7(11):e50513.
99. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):707–13.
100. Song Y, Zhu L, Richa M, Li P, Yang Y, Li S. Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015;14:32.
101. Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JD, Wilson PW, et al. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis.* 2001 Sep;158(1):173–81.
102. Qi L, Liu S, Rifai N, Hunter D, Hu FB. Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2007 May;192(1):204–10.
103. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism Functional Differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Mar 1;19(3):472–84.

104. Jin J-L, Guo Y-L, Li J-J. Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2016 Sep 1;460:50–4.
105. Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Jun 15;541(2):234–40.
106. Bhanushali AA, Das BR. Influence of genetic variants in the apolipoprotein A5 and C3 gene on lipids, lipoproteins, and its association with coronary artery disease in Indians. *J Community Genet*. 2010 Sep;1(3):139–48.
107. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 1990 Aug 17;249(4970):790–3.
108. Dammerman M, Sandkuijl LA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 15;90(10):4562–6.
109. Meyers NL, Larsson M, Vorrsjö E, Olivecrona G, Small DM. Aromatic residues in the C-terminus of apolipoprotein C-III mediate lipid binding and LPL inhibition. *J Lipid Res*. 2017 Feb 3;
110. Graham MJ, Lee RG, Bell TA, Fu W, Mullick AE, Alexander VJ, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res*. 2013 May 24;112(11):1479–90.
111. Luo M, Peng D. The emerging role of apolipoprotein C-III: beyond effects on triglyceride metabolism. *Lipids Health Dis*. 2016 Oct 22;15(1):184.
112. Björnson E, Adiels M, Taskinen M-R, Borén J. Kinetics of plasma triglycerides in abdominal obesity. *Curr Opin Lipidol*. 2017 Feb;28(1):11–8.
113. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol*. 2015 Feb;26(1):56–63.
114. van Dijk KW, Rensen PCN, Voshol PJ, Havekes LM. The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr Opin Lipidol*. 2004 Jun;15(3):239–46.
115. Chhabra S, Narang R, Krishnan LR, Vasisht S, Agarwal DP, Srivastava LM, et al. Apolipoprotein C3 SstI polymorphism and triglyceride levels in Asian Indians. *BMC Genet*. 2002 Jun 6;3:9.
116. Marçais C, Bernard S, Merlin M, Uhlmann M, Mestre B, Rochet-Mingret L, et al. Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. *Diabetologia*. 2000 Nov;43(11):1346–52.
117. Yao Z, Wang Y. Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Jun;23(3):206–12.
118. Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: From Pathophysiology to Pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Oct;36(10):675–87.

119. Ariza M-J, Sánchez-Chaparro M-A, Barón F-J, Hornos A-M, Calvo-Bonacho E, Rioja J, et al. Additive effects of LPL, APOA5 and APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the ICARIA genetic sub-study. *BMC Med Genet*. 2010;11:66.
120. Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest*. 1992 Nov;90(5):1889–900.
121. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):32–41.
122. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitzel NO, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):22–31.
123. Crawford DC, Dumitrescu L, Goodloe R, Brown-Gentry K, Boston J, McClellan B, et al. Rare variant APOC3 R19X is associated with cardio-protective profiles in a diverse population-based survey as part of the Epidemiologic Architecture for Genes Linked to Environment Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Dec;7(6):848–53.
124. Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Zhou H, Jiang ZG, Zhao Y, et al. Functional analysis of the missense APOC3 mutation Ala23Thr associated with human hypotriglyceridemia. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1524–34.
125. Bochem AE, van Capelleveen JC, Dallinga-Thie GM, Schimmel AWM, Motazacker MM, Tietjen I, et al. Two novel mutations in apolipoprotein C3 underlie atheroprotective lipid profiles in families. *Clin Genet*. 2014 May;85(5):433–40.
126. Timpson NJ, Walter K, Min JL, Tachmazidou I, Malerba G, Shin S-Y, et al. A rare variant in APOC3 is associated with plasma triglyceride and VLDL levels in Europeans. *Nat Commun*. 2014;5:4871.
127. Peacock RE, Hamsten A, Johansson J, Nilsson-Ehle P, Humphries SE. Associations of genotypes at the apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B and lipoprotein lipase gene loci with coronary atherosclerosis and high density lipoprotein subclasses. *Clin Genet*. 1994 Oct;46(4):273–82.
128. Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S. Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin Genet*. 1994 Dec;46(6):385–97.
129. Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G, et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res*. 2001 Nov;42(11):1879–90.
130. Peacock RE, Temple A, Gudnason V, Rosseneu M, Humphries SE. Variation at the lipoprotein lipase and apolipoprotein AI-CIII gene loci are associated with fasting lipid and lipoprotein traits in a population sample from Iceland: interaction between genotype, gender, and smoking status. *Genet Epidemiol*. 1997;14(3):265–82.
131. Tilly P, Sass C, Vincent-Viry M, Aguillon D, Siest G, Visvikis S. Biological and genetic determinants of serum apoC-III concentration: reference limits from the Stanislas Cohort. *J Lipid Res*. 2003 Feb;44(2):430–6.

132. de França E, Alves JGB, Hutz MH. APOA1/C3/A4 gene cluster variability and lipid levels in Brazilian children. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2005 Apr;38(4):535–41.
133. Tsai MY, Hanson NQ, Copeland KR, Beheshti I, Garg U. Determination of a T/G polymorphism at nucleotide 3206 of the apolipoprotein C III gene by amplification refractory mutation system. *Clin Chem.* 1994 Dec;40(12):2235–9.
134. Rees A, Stocks J, Paul H, Ohuchi Y, Galton D. Haplotypes identified by DNA polymorphisms at the apolipoprotein A-1 and C-III loci and hypertriglyceridaemia. A study in a Japanese population. *Hum Genet.* 1986 Feb;72(2):168–71.
135. Garenc C, Couillard C, Laflamme N, Cadelis F, Gagné C, Couture P, et al. Effect of the APOC3 Sst I SNP on fasting triglyceride levels in men heterozygous for the LPL P207L deficiency. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2005 Oct;13(10):1159–65.
136. Hallman DM, Srinivasan SR, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. Longitudinal analysis of haplotypes and polymorphisms of the APOA5 and APOC3 genes associated with variation in serum triglyceride levels: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism.* 2006 Dec;55(12):1574–81.
137. Adams JN, Raffield LM, Freedman BI, Langefeld CD, Ng MCY, Carr JJ, et al. Analysis of common and coding variants with cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:77.
138. Arzumanyan A, Friedman T, Kotei E, Ng IOL, Lian Z, Feitelson MA. Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer. *Oncogene.* 2012 Feb 2;31(5):563–72.
139. Richardson K, Louie-Gao Q, Arnett DK, Parnell LD, Lai C-Q, Davalos A, et al. The PLIN4 variant rs8887 modulates obesity related phenotypes in humans through creation of a novel miR-522 seed site. *PLoS One.* 2011;6(4):e17944.
140. Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W. Allele-specific differences in apolipoprotein C-III mRNA expression in human liver. *Clin Chem.* 1999 Mar;45(3):331–9.
141. Herbeth B, Gueguen S, Leroy P, Siest G, Visvikis-Siest S. The lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism is associated with altered serum carotenoid concentrations in the Stanislas Family Study. *J Am Coll Nutr.* 2007 Dec;26(6):655–62.
142. Souverein OW, Jukema JW, Boekholdt SM, Zwinderman AH, Tanck MWT. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2005 Apr;13(4):445–51.
143. Su S, Tang M, Zhang M, Cheng C, Tang X. The relationship between apolipoprotein CIII gene polymorphism and serum lipid levels in Han Chinese males. *Meta Gene.* 2013 Dec;1:58–64.
144. Chien K-L, Chen M-F, Hsu H-C, Su T-C, Chang W-T, Lee C-M, et al. Genetic association study of APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and haplotypes on triglyceride and HDL cholesterol in a community-based population. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2008 Feb;388(1–2):78–83.
145. Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis.* 2010 Jul;211(1):1–8.

146. Ehrhardt N, Bedoya C, Péterfy M. Embryonic viability, lipase deficiency, hypertriglyceridemia and neonatal lethality in a novel LMF1-deficient mouse model. *Nutr Metab.* 2014;11:37.
147. Paterniti JR, Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K. Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. *Science.* 1983 Jul 8;221(4606):167–9.
148. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.* 2007 Dec;39(12):1483–7.
149. Péterfy M, Mao HZ, Doolittle MH. The cld mutation: narrowing the critical chromosomal region and selecting candidate genes. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 2006 Oct;17(10):1013–24.
150. Ben-Zeev O, Hosseini M, Lai C-M, Ehrhardt N, Wong H, Cefalù AB, et al. Lipase maturation factor 1 is required for endothelial lipase activity. *J Lipid Res.* 2011 Jun;52(6):1162–9.
151. Doolittle MH, Neher SB, Ben-Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM, Hosseini M, et al. Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2009 Nov 27;284(48):33623–33.
152. Péterfy M. Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):790–4.
153. Hosseini M, Ehrhardt N, Weissglas-Volkov D, Lai C-M, Mao HZ, Liao J-L, et al. Transgenic expression and genetic variation of Lmf1 affect LPL activity in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 May;32(5):1204–10.
154. Yin F, Doolittle MH, Péterfy M. A quantitative assay measuring the function of lipase maturation factor 1. *J Lipid Res.* 2009 Nov;50(11):2265–9.
155. Babilonia-Rosa MA, Neher SB. Purification, cellular levels, and functional domains of lipase maturation factor 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jul 18;450(1):423–8.
156. Lamiquiz-Moneo I, Blanco-Torrecilla C, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, et al. Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):82.
157. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11):4584–90.
158. Cefalù AB, Spina R, Noto D, Ingrassia V, Valenti V, Giammanco A, et al. Identification of a novel LMF1 nonsense mutation responsible for severe hypertriglyceridemia by targeted next-generation sequencing. *J Clin Lipidol.* 2017 Feb;11(1):272–281.e8.
159. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* 2009 Feb;10(2):109–21.
160. Deans C, Maggert KA. What do you mean, “epigenetic”? *Genetics.* 2015 Apr;199(4):887–96.
161. Epigénétique [Internet]. [cited 2017 Mar 10]. Available from: <http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/epigenetique>

162. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 décembre;75(5):843–54.
163. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901–6.
164. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *Isy-6* and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Sep 11;18(10):1139–46.
165. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Apr;13(4):239–50.
166. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92–105.
167. Deilüis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes* 2005. 2016 Jan;40(1):88–101.
168. Hartig SM, Hamilton MP, Bader DA, McGuire SE. The miRNA Interactome in Metabolic Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* TEM. 2015 Dec;26(12):733–45.
169. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215–33.
170. Prabu P, Rome S, Sathishkumar C, Aravind S, Mahalingam B, Shanthirani CS, et al. Circulating MiRNAs of “Asian Indian Phenotype” Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PloS One*. 2015;10(5):e0128372.
171. Can U, Buyukinan M, Yerlikaya FH. The investigation of circulating microRNAs associated with lipid metabolism in childhood obesity. *Pediatr Obes*. 2016;11(3):228–34.
172. Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Jun;23(3):220–5.
173. miRBase::Sequences [Internet]. [cited 2017 Mar 10]. Available from: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>
174. Raitoharju E, Seppälä I, Oksala N, Lyytikäinen L-P, Raitakari O, Viikari J, et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jun 25;391(1–2):41–9.
175. O’Carroll D, Schaefer A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2013 Jan;38(1):39–54.
176. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*. 2007 Apr;32(4):189–97.
177. Bhat SS, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulińska Z. MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation. *Acta Biochim Pol*. 2016;63(4):717–23.

178. Rome S. Use of miRNAs in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. *Genes Nutr.* 2015 Sep;10(5):483.
179. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004 Sep 3;305(5689):1437–41.
180. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):89–100.
181. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature.* 2010 Jun 3;465(7298):584–9.
182. Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):519–28.
183. Khorshid M, Hausser J, Zavolan M, van Nimwegen E. A biophysical miRNA-mRNA interaction model infers canonical and noncanonical targets. *Nat Methods.* 2013 Mar;10(3):253–5.
184. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet.* 2007 Oct;39(10):1278–84.
185. Nazari-Jahantigh M, Egea V, Schober A, Weber C. MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Dec;89(Pt A):35–41.
186. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Apr;22(2):86–92.
187. Yang Z, Cappello T, Wang L. Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Mar;5(2):145–50.
188. Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016 Oct;30(5):665–76.
189. Desgagné V, Bouchard L, Guérin R. microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Clin Chem Lab Med.* 2017 May 1;55(5):667–86.
190. Miśkowiec D, Lipiec P, Wierzbowska-Drabik K, Kupczyńska K, Michalski B, Wdowiak-Okrojek K, et al. Association between microRNA-21 concentration and lipid profile in patients with acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(1–2):48–57.
191. Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernández-Hernando C. microRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis.* 2016 Mar;246:352–60.
192. Sahebkar A, Watts GF. Developing role of microRNA-33 in lipid metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2016 Apr;27(2):197–9.
193. Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2009 Nov;20(9):452–9.
194. Can U, Buyukinan M, Yerlikaya FH. The investigation of circulating microRNAs associated with lipid metabolism in childhood obesity. *Pediatr Obes.* 2016;11(3):228–34.

195. Chen T, Li Z, Tu J, Zhu W, Ge J, Zheng X, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett.* 2011 Feb 18;585(4):657–63.
196. Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, Tanaka T, Smith CE, Lai C-Q, et al. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. *Am J Hum Genet.* 2013 Jan 10;92(1):5–14.
197. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul;1841(7):919–33.
198. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 2013 Mar 1;27(5):459–84.
199. Dancer M, Caussy C, Di Filippo M, Moulin P, Marçais C, Charrière S. Lack of evidence for a liver or intestinal miRNA regulation involved in the hypertriglyceridemic effect of APOC3 3'UTR variant SstI. *Atherosclerosis.* 2016 Dec;255:6–10.
200. Charriere S, Bernard S, Aqallal M, Merlin M, Billon S, Perrot L, et al. Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2008 Aug;394(1–2):99–103.
201. Surguchov A, Page G, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. Polymorphic Markers in Apolipoprotein C-III Gene Flanking Regions and Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* August 1996. 1996;16(8):941–7.
202. Renard E, Dupuy AM, Monnier L, Crastes de Paulet A. DNA restriction polymorphisms of the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster: a genetic determinant of atherosclerosis in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1991 May;8(4):354–60.
203. Karathanasis SK, Zannis VI, Breslow JL. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apoC-III alleles. *J Lipid Res.* 1985 Apr;26(4):451–6.
204. Masana L, Febrer G, Cavanna J, Baroni MG, Marz W, Hoffmann MM, et al. Common genetic variants that relate to disorders of lipid transport in Spanish subjects with premature coronary artery disease. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2001 Feb;100(2):183–90.
205. Hu S-L, Cui G-L, Huang J, Jiang J-G, Wang D-W. An APOC3 3'UTR variant associated with plasma triglycerides levels and coronary heart disease by creating a functional miR-4271 binding site. *Sci Rep.* 2016 Sep 14;6:32700.
206. Brown S, Ordovás JM, Campos H. Interaction between the APOC3 gene promoter polymorphisms, saturated fat intake and plasma lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2003 Oct;170(2):307–13.
207. Peter A, Kantartzis K, Machicao F, Machann J, Wagner S, Templin S, et al. Visceral obesity modulates the impact of apolipoprotein C3 gene variants on liver fat content. *Int J Obes* 2005. 2012 Jun;36(6):774–82.
208. Olivieri O, Bassi A, Stranieri C, Trabetti E, Martinelli N, Pizzolo F, et al. Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res.* 2003 Dec;44(12):2374–81.

209. Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusi AJ, de Bruin TW. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res.* 1996 Jan;37(1):136–47.
210. Hoffer MJ, Sijbrands EJ, De Man FH, Havekes LM, Smelt AH, Frants RR. Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism. *Eur J Clin Invest.* 1998 Oct;28(10):807–12.
211. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2003;5(1):R1.
212. 1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation [Internet]. [cited 2017 Mar 23]. Available from: <http://www.internationalgenome.org/>
213. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003 Nov;73(5):1162–9.
214. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2012 Aug;272(2):185–96.
215. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001 May;11(5):863–74.
216. Ng PC, Henikoff S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.* 2002 Mar;12(3):436–46.
217. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, et al. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One.* 2014;9(5):e96482.
218. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, et al. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One.* 2014;9(5):e96482.
219. Schmid CW, Jelinek WR. The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science.* 1982 Jun 4;216(4550):1065–70.
220. Rüdiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jan 25;23(2):256–60.
221. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA. The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2390–5.
222. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17450–5.
223. Goedeke L, Aranda JF, Fernández-Hernando C. microRNA regulation of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2014 Aug;25(4):282–8.

224. Mok Y-J, Park SG, Choi SS. Comparative analysis of the structural and expressional parameters of microRNA target genes. *Gene*. 2012 Apr 10;497(1):103–9.
225. Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, et al. Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):481–93.
226. Haas U, Sczakiel G, Laufer SD. MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure. *RNA Biol*. 2012 Jun;9(6):924–37.
227. Gan HH, Gunsalus KC. Tertiary structure-based analysis of microRNA-target interactions. *RNA N Y N*. 2013 Apr;19(4):539–51.
228. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 May;11(5):276–88.
229. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg*. 2012 Sep;256(3):544–51.
230. Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart Br Card Soc*. 2015 Jun;101(12):921–8.
231. Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, et al. MicroRNA -143 and -223 in obesity. *Gene*. 2015 Apr 15;560(2):140–2.
232. Stelma F, van der Ree MH, Sinnige MJ, Brown A, Swadling L, de Vree JML, et al. Immune phenotype and function of NK and T cells in chronic hepatitis C patients who received a single dose of anti-miR-122, RG-101. *Hepatol Baltim Md*. 2017 Mar 11;
233. Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2017 Mar 22;

Annexes

Annexe 1 : Correspondances code génétique - acides aminés

Code 1 lettre	Code 3 lettres	Acide aminé	Codons
A	Ala	Alanine	GCT,GCC,GCA,GCG
C	Cys	Cystéine	TGT,TGC
D	Asp	Acide Aspartique	GAT,GAC
E	Glu	Acide Glutamique	GAA,GAG
F	Phe	Phénylalanine	TTT,TTC
G	Gly	Glycine	GGT,GGC,GGA,GGG
H	His	Histidine	CAT,CAC
I	Ile	Isoleucine	ATT,ATC,ATA
K	Lys	Lysine	AAA,AAG
L	Leu	Leucine	TTG,TTA CTT,CTC,CTA,CTG
M	Met	Méthionine	ATG
N	Asn	Asparagine	AAT,AAC
P	Pro	Proline	CCT,CCC,CCA,CCG
Q	Gln	Glutamine	CAA,CAG
R	Arg	Arginine	CGT,CGC,CGA,CGG AGA,AGG
S	Ser	Serine	TCT,TCC,TCA,TCG AGT,AGC
T	Thr	Thréonine	ACT,ACC,ACA,ACG
V	Val	Valine	GTT,GTC,GTA,GTG
W	Trp	Tryptophane	TGG
X	Ter	Stop	TAA,TAG,TGA
Y	Tyr	Tyrosine	TAT,TAC

Annexe 2 : Nomenclature des variants

Les nombres des résidus correspondent au numéro de l'acide aminé dans le gène concerné ici par exemple dans le gène *LPL*, les trois lettres associées correspondent à l'abréviation du nom de l'acide aminé rapporté en annexe 1. Par exemple, pour un variant noté Exon 6, c.805G>A, p.Glu269Lys, rs761886494 ceci correspond à un variant situé sur l'exon 6 du gène concerné au niveau du nucléotide situé en position 805 sur la partie codante (c.) du gène, on observe une substitution d'une guanine en adénine qui induit le changement de l'acide aminé en position 229 de la protéine (p.) d'un acide glutamique en lysine. Le numéro rs associé correspond à la référence de ce variant dans la base de données dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database) de NCBI (National Center for Biotechnology Information). La nomenclature utilisée ci-dessus sera la même tout au long de ce manuscrit.

Annexe 3 : Séquences mutées des 3'UTR de *LMF1* étudiées

>3'UTR LMF1 41GA 231CA 835GC

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCAGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGAGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCTT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCCGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCCGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTCCAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 137 296 707

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACAGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGTGTGCCACCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCTT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCCGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCATCCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCCGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTCCAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 175G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG

CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCAAGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCTACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCCGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 242C>G

ACGTGCACCAGAAATAAAGGGGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTGTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCTACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCCGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 389G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGGGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCTACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCAATCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC

TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 c*512G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCTT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACAC^ACCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 c*512G>T

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCTT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACAC^TCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 530G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCACAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCAGCCAGGATGTGGGATTGGATGGGCCATTTTCTGTCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 625-626del(AT)

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCACAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCAGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCTATCCCTCATCTCCACC
 CCCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACAGTGTCTTG
 GCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACCCAG
 ACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGAGGA
 CAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCTTAT
 TCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCTATTATAACCACTTACCAGC
 TTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 746C>T

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCACAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG

GACACGCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGG**T**CCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 789G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATC**A**TGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 791C>T

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGT**T**GGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCCTATTATAACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 803G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCTACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCACTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCTATTATACCACTTACC
 AGCTTACTCGAAAA

>3'UTR LMF1 894G>A

ACGTGCACCAGAAATAAAGGCGAAGACCCAGCCCCTCGGCGGCTCAGCAACGTTTGGCCTTCC
 CTGCGCCCAGCCCAAGCTGGGCATCGCCAAGAGAGACGTGGAGAGGAGAGCGGTGGGACCCAG
 CCCCAGCACGGGGGTCCAGGGTGGGGTCTGTTGTCACATACTGTGGCGGCTCCCAGGCCCTG
 CCCACCTGGGGCCCCACATCCAGGCCAACCCTTGTCCCAGGCGCCAGGGGCTCTGATCTCCCAT
 CCATCCCACCCTCCTCCCAGAGGCCAGCCTGGGGCTGTGCCGCCACAGGAGTTGAGACAAT
 GGCCATCCTGACACCTTCTCCTACTACAGCCCTGACCATAGACCCAGCCAGGTAGCTCTTGGG
 GTCTCTAGCGTCCCAGGGCCTGGTTTCTGTTCCCTCTTCAATGGTGTGTTCCCAGCCAGGTCCT
 GACCCTCAGAGCCAAGTCCCTGTCACGTCTGGGGCAGCCAAACCCTCGCCCCACAGGGACCTG
 GACACGCCCCGGCCAGGATGTGGGGTTGGATGGGCCATTTTCTGTCCTATCCCTCATCTCCACC
 CCGCCACAGCCTACACGCATCCCACACATGCAGGCACACACAGCCTGTGCACACATGTGTTC
 TTGGCCCGGTTTCATCCCCCATGACTGGTGTCTGTGAGGTGCAGATGGACACAGCGCACACC
 CAGACCCTCCACCAGGCTGTGACCTCGCTGCCTCTGAGGCCCTTGACAAGGCCCTCAATCGGA
 GGACAGCCGGCCGTGCACACTTTCATCATCGTCGGACAAACAGCGTCTACTGCACATTTTCT
 TATTCCTATTCTTGAGCCATAGCTATGGCATATTCTTCTACTATTCTATTATACCACTTACC
 AGCTTACTCAAAAA

Annexe 4 : Etudes in silico de microARN candidats en présence de variants 3'UTR de *LMF1*

- Variant c.*41G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*41G	muté c*41A	sauvage c*41G	muté c*41A
hsa-miR-1205	<120	122	NA	-12,9
hsa-miR-1226*	126	130	NA	NA
hsa-miR-1288	<120	<120	NA	-16
hsa-miR-1301	<120	127	NA	NA
hsa-miR-149*	<120	139	NA	NA
hsa-miR-1909*	<120	124	NA	NA
hsa-miR-19a	<120	124	NA	NA
hsa-miR-19b	<120	120	NA	NA
hsa-miR-22	126	142	-14,1	-14,8
hsa-miR-3132	124	128	NA	NA
hsa-miR-3160	<120	120	NA	-13,72
hsa-miR-3176	<120	<120	NA	-8,4
hsa-miR-3184	<120	136	NA	NA
hsa-miR-3200-3p	<120	126	NA	NA
hsa-miR-3202	149	153	NA	NA
hsa-miR-3616-3p	<120	136	NA	NA
hsa-miR-3666	129	131	NA	NA
hsa-miR-367*	<120	120	NA	NA
hsa-miR-370	<120	120	NA	NA
hsa-miR-409-3p	138	139	NA	NA
hsa-miR-4303	130	134	NA	-16,1
hsa-miR-451	<120	120	NA	NA
hsa-miR-516a-5p	<120	<120	NA	-9,27
hsa-miR-556-5p	<120	120	NA	NA
hsa-miR-558	130	146	-16,6	-17,3
hsa-miR-571	<120	<120	NA	-13,83
hsa-miR-612	131	135	-17,8	-16,7
hsa-miR-645	<120	<120	NA	-12,8
hsa-miR-744	<120	<120	NA	-17,2
hsa-miR-93*	133	143	NA	-19,6

- Variants c*137G>A, c.*296G>A, c.*707C>T

	RegRNA		PITA		RegRNA		PITA		RegRNA		PITA	
	c*137G	c*137A	c*137G	c*137A	c*296G	c*296A	c*296G	c*296A	c*707C	c*707T	c*707C	c*707T
hsa-miR-1234	<120	<120	NA	NA	<120	<120	NA	NA	124.00	129	NA	-20,31
hsa-miR-1262	<120	<120	NA	NA	<120	120	NA	-15,4	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-1274a	<120	135	NA	-16,2	<120	<120	NA	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-1274b	<120	127	-18,5	-19,2	<120	<120	-18,5	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-1293	<120	<120	NA	NA	<120	129	NA	-19,6	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-146b-3p	<120	132	-17	-17,7	120.00	120	-17	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-150*	<120	<120	NA	NA	134.00	150	NA	-26,1	122	<120	NA	NA
hsa-miR-1914	136.00	152	-23,9	-24,6	136	128	NA	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-210	<120	<120	NA	NA	122.00	138	-23,8	-24,2	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-218	<120	120	-12,65	-13,35	<120	<120	-12,65	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-3134	<120	<120	NA	NA	<120	<120	NA	NA	<120	120	NA	-9,1
hsa-miR-326	126.00	129	NA	-17	<120	<120	-17,7	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-330-5p	132	136	NA	-16,2	122	<120	-23,6	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-331-3p	<120	137	-17,73	-18,43	<120	<120	-17,73	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-339-5p	<120	127	-18,7	-19,4	<120	<120	-18,7	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-363*	<120	<120	NA	NA	<120	122	NA	-16,8	124.00	<120	NA	NA
hsa-miR-3929	<120	<120	NA	NA	<120	<120	NA	NA	<120	125	NA	-15,4
hsa-miR-4292	135.00	139	-16,8	-17,5	<120	<120	NA	NA	<120	<120	NA	NA
hsa-miR-486-5p	<120	128	-20,5	-21,2	<120	<120	-20,5	NA	<120	<120	NA	NA

- Variants c*175G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*175 G	muté c*175A	sauvage c*175 G	muté c*175A
hsa-miR-3692	<120	127	NA	NA
hsa-miR-3918	145.00	149	NA	NA
hsa-miR-4254	128.00	132	NA	NA
hsa-miR-4300	135.00	151	-19,3	-20
hsa-miR-4314	128.00	132	NA	NA
hsa-miR-449a	127	131	NA	NA
hsa-miR-449b	127	131	NA	NA
hsa-miR-492	<120	125	-16,9	-17,6
hsa-miR-558	132.00	148	-15,7	-16,4
hsa-miR-571	<120	<120	NA	-13,8
hsa-miR-587	<120	<120	NA	-13,1
hsa-miR-608	<120	124	NA	NA
hsa-miR-612	163.00	167	NA	NA
hsa-miR-635	<120	123	NA	NA
hsa-miR-637	141	145	NA	NA
hsa-miR-708	<120	131	NA	NA
hsa-miR-744	140	144	NA	NA
hsa-miR-761	<120	120	NA	NA
hsa-miR-769-3p	125.00	129	NA	-19,1
hsa-miR-920	137.00	153	-24,5	-25,2
hsa-miR-933	<120	126	NA	NA

- Variants c*242C>G

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*242C	muté c*242G	sauvage c*242C	muté c*242G
hsa-miR-103-as	<120	132.00	-14,9	-19
hsa-miR-1910	<120	129.00	NA	NA
hsa-miR-194	<120	<120	NA	-15,49
hsa-miR-2110	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-27a	<120	130.00	NA	-15,2
hsa-miR-27b	<120	128.00	NA	-14,1
hsa-miR-3134	151.00	159	NA	NA
hsa-miR-3165	134.00	138	NA	NA
hsa-miR-3175	123.00	129	NA	NA
hsa-miR-3177	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-324-3p	120.00	128	NA	NA
hsa-miR-324-5p	<120	120.00	NA	-21,6
hsa-miR-3651	135.00	151	NA	-24
hsa-miR-3670	126.00	134	NA	-18,7
hsa-miR-3689a-5p	<120	120	NA	NA
hsa-miR-3689b	<120	120	NA	NA
hsa-miR-455-3p	<120	<120	NA	-17,4
hsa-miR-499-3p	<120	126.00	NA	-20
hsa-miR-513a-5p	<120	120.00	NA	-16,9
hsa-miR-542-5p	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-566	<120	<120	-14,1	-14,7
hsa-miR-608	149.00	155	NA	NA
hsa-miR-637	125.00	133	NA	NA

- Variants c*389G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*389G	muté c*389A	sauvage c*389G	muté c*389A
hsa-miR-105*	<120	126.00	NA	-16,9
hsa-miR-1193	<120	126.00	-16,5	-16,9
hsa-miR-1911*	154.00	158	NA	NA
hsa-miR-221*	120.00	124	NA	-11,3
hsa-miR-298	<120	126.00	NA	NA
hsa-miR-3065-5p	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-3146	138.00	154	-15,6	-16
hsa-miR-3152	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-3155	136.00	140	NA	NA
hsa-miR-3170	<120	120.00	NA	-19,1
hsa-miR-331-3p	136.00	140	NA	NA
hsa-miR-342-5p	120.00	136	NA	-19,66
hsa-miR-3668	<120	126.00	NA	NA
hsa-miR-3691	<120	134.00	NA	NA
hsa-miR-4320	<120	120	NA	NA
hsa-miR-449c*	<120	123.00	NA	-15,1
hsa-miR-450b-3p	<120	120	NA	-12,4
hsa-miR-497*	132.00	136	NA	NA
hsa-miR-504	124.00	128	-12,9	NA
hsa-miR-532-5p	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-539	125.00	128	NA	NA
hsa-miR-608	<120	<120	NA	-22,8
hsa-miR-613	<120	<120	NA	-10,4
hsa-miR-769-3p	<120	125	NA	-24,83

- Variants c*512G>T

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*512G	muté c*512T	sauvage c*512G	muté c*512T
hsa-miR-1207-5p	<120	124	NA	-26,81
hsa-miR-122	<120	144	NA	-17,8
hsa-miR-1228*	127	131	-23.8	NA
hsa-miR-1289	<120	125	NA	-18,9
hsa-miR-130a*	<120	124	NA	NA
hsa-miR-1305	<120	123	NA	NA
hsa-miR-1471	123	128	NA	NA
hsa-miR-149*	<120	125	NA	NA
hsa-miR-1538	120	124	-22.75	NA
hsa-miR-1909*	<120	132	NA	NA
hsa-miR-193a-3p	127	130	-19,07	NA
hsa-miR-199a-5p	<120	132	NA	NA
hsa-miR-199b-5p	<120	124	NA	NA
hsa-miR-216a	<120	120	NA	NA
hsa-miR-219-5p	<120	<120	NA	-10,1
hsa-miR-23a	<120	125	NA	NA
hsa-miR-23b	<120	125	NA	NA
hsa-miR-23c	<120	123	NA	NA
hsa-miR-3192	<120	141	NA	NA
hsa-miR-34a	<120	123	NA	-18,67
hsa-miR-34c-5p	<120	124	NA	-13,4
hsa-miR-3659	<120	139	NA	NA
hsa-miR-3692*	<120	121	NA	NA
hsa-miR-425*	<120	122	NA	NA
hsa-miR-4255	<120	134	NA	NA
hsa-miR-4270	<120	121	NA	NA
hsa-miR-4294	<120	120	NA	NA
hsa-miR-432	<120	<120	NA	-21,9
hsa-miR-449a	<120	124	NA	-14
hsa-miR-449b	<120	124	NA	-14,2
hsa-miR-574-5p	<120	124	-15	-16,8
hsa-miR-613	<120	122	NA	NA
hsa-miR-637	129	137	-25,3	NA
hsa-miR-648	<120	137	NA	-19,1
hsa-miR-665	<120	122	NA	NA
hsa-miR-762	122	124	-27	NA
hsa-miR-92a-1*	<120	123	NA	NA

- Variants c*625-626del

	RegRNA		PITA	
	sauvage	muté del(AT)	sauvage	muté del(AT)
hsa-miR-1255b	133.00	137	NA	NA
hsa-miR-1276	<120	122.00	NA	NA
hsa-miR-1537	121.00	123	NA	NA
hsa-miR-1972	133.00	135	NA	NA
hsa-miR-2278	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-31	123.00	127	NA	NA
hsa-miR-3621	<120	122.00	NA	NA
hsa-miR-3622a-5p	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-424*	<120	123.00	-14,6	-16,2
hsa-miR-425	<120	<120	NA	-11,7
hsa-miR-548e	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-602	<120	131.00	NA	NA
hsa-miR-611	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-649	<120	<120	NA	-8,6
hsa-miR-654-5p	<120	123.00	NA	NA
hsa-miR-886-3p	<120	<120	NA	-11,8

- Variants c*746C>T

	RegRNA		PITA	
	sauvage c.*746C	muté c.*746T	sauvage c.*746C	muté c.*746T
hsa-miR-1275	<120	126	NA	-18,39
hsa-miR-1470	120.00	122.00	NA	NA
hsa-miR-2117	<120	125	NA	NA
hsa-miR-3126-5p	<120	146	NA	-22,2
hsa-miR-3144-5p	<120	124	NA	-14,86
hsa-miR-3200-3p	<120	122	NA	-16,89
hsa-miR-3649	<120	150	NA	-18,9
hsa-miR-365*	135.00	149.00	-18,8	-23,8
hsa-miR-3661	<120	130	NA	NA
hsa-miR-3928	<120	138	NA	-24,8
hsa-miR-492	<120	121	NA	-16,1
hsa-miR-500a*	<120	120	NA	NA
hsa-miR-591	<120	120	NA	NA
hsa-miR-631	<120	139	NA	NA
hsa-miR-769-3p	<120	131.00	NA	-25,3
hsa-miR-769-5p	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-920	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-92a-1*	<120	123.00	NA	NA
hsa-miR-939	<120	120.00	NA	-28,6

- Variants c*789G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c.*789G	muté c.*789A	sauvage c.*789G	muté c.*789A
hsa-miR-1272	<120	158	-17,9	-18,3
hsa-miR-2355-3p	124.00	128	NA	NA
hsa-miR-297	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-3134	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-323b-5p	132.00	136	NA	NA
hsa-miR-34c-5p	<120	122.00	NA	NA
hsa-miR-3682	127.00	135	-16,3	-16,3
hsa-miR-375	124.00	126	NA	NA
hsa-miR-4299	<120	128.00	NA	NA
hsa-miR-433	<120	120	-14,96	-14,96
hsa-miR-485-5p	129.00	130	NA	NA
hsa-miR-545*	132	136	NA	NA
hsa-miR-632	<120	<120	NA	-10,22

- Variants c*791C>T

	RegRNA		PITA	
	sauvage c.*791C	muté c.*791T	sauvage c.*791C	muté c.*791T
hsa-miR-1305	<120	127.00	NA	NA
hsa-miR-130b	<120	123.00	NA	NA
hsa-miR-198	<120	<120	NA	-13,3
hsa-miR-200a	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-219-5p	<120	125.00	NA	NA
hsa-miR-3664	<120	126.00	NA	NA
hsa-miR-379	128.00	129	NA	NA
hsa-miR-411	141	145	NA	NA
hsa-miR-452	136.00	138	NA	NA
hsa-miR-515-5p	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-553	<120	122.00	NA	-11,5
hsa-miR-659	<120	<120	NA	-16,37
hsa-miR-891a	<120	127.00	NA	NA

- Variants c*803G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c.*803G	muté c.*803A	sauvage c.*803G	muté c.*803A
hsa-miR-1	<120	127.00	NA	NA
hsa-miR-106a	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-1244	138.00	154	-19,7	-19,7
hsa-miR-1250	<120	<120	NA	-19,4
hsa-miR-1265	125.00	129	NA	NA
hsa-miR-147	123.00	127	NA	NA
hsa-miR-147b	143.00	147	NA	NA
hsa-miR-17	<120	120	NA	NA
hsa-miR-18a	124.00	128	NA	NA
hsa-miR-18b	132	136	NA	NA
hsa-miR-194*	129.00	133	NA	NA
hsa-miR-20a	<120	121	NA	NA
hsa-miR-20b	<120	121	NA	NA
hsa-miR-206	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-3129	120.00	121	NA	NA
hsa-miR-3148	138.00	142	NA	NA
hsa-miR-3165	<120	131.00	NA	NA
hsa-miR-3185	120.00	124	NA	NA
hsa-miR-325	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-34a	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-34c-5p	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-3609	<120	120.00	NA	NA
hsa-miR-3647-3p	<120	125.00	NA	NA
hsa-miR-3662	133.00	136	NA	NA
hsa-miR-3666	<120	122.00	NA	NA
hsa-miR-3681	125.00	141	NA	-17,33
hsa-miR-3691	<120	131.00	NA	-15,25
hsa-miR-372	<120	<120	NA	-12,3
hsa-miR-376a*	<120	127.00	-7,4	-7,1
hsa-miR-3915	<120	123.00	NA	NA
hsa-miR-449a	122.00	126	NA	NA
hsa-miR-449b	122.00	126	NA	NA
hsa-miR-512-3p	<120	120.00	NA	-15,65
hsa-miR-574-5p	120.00	124	NA	NA
hsa-miR-576-3p	126.00	129	NA	-8,22
hsa-miR-595	147	151	NA	NA
hsa-miR-764	<120	125.00	NA	-17,7
hsa-miR-93	125	129	NA	NA

- Variant c.*835G>C

	RegRNA		PITA	
	sauvage c*835G	muté c*835C	sauvage c*835G	muté c*835C
hsa-miR-103-as	121	124.00	NA	NA
hsa-miR-1183	126	128.00	NA	NA
hsa-miR-1224-5p	<120	<120	NA	-11,3
hsa-miR-1252	<120	<120	NA	-6,8
hsa-miR-1262	<120	120.00	NA	-11,9
hsa-miR-15a*	124	129.00	NA	NA
hsa-miR-202	<120	<120	NA	-16,3
hsa-miR-3136	<120	129.00	NA	-11,7
hsa-miR-3137	129	136.00	NA	NA
hsa-miR-3160	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-338-5p	<120	126	NA	NA
hsa-miR-3651	<120	136.00	NA	NA
hsa-miR-3652	<120	<120	-16,9	-20,1
hsa-miR-3691	<120	<120	NA	-9,5
hsa-miR-370	<120	133.00	NA	NA
hsa-miR-3915	<120	143.00	NA	-8,7
hsa-miR-3918	<120	133.00	NA	NA
hsa-miR-3929	<120	133.00	NA	NA
hsa-miR-424*	<120	121.00	NA	NA
hsa-miR-4251	<120	<120	NA	-7,4
hsa-miR-500a*	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-550a	<120	<120	NA	-18,4
hsa-miR-558	<120	124.00	NA	NA
hsa-miR-566	<120	134.00	NA	NA
hsa-miR-604	<120	<120	NA	-18,3
hsa-miR-647	<120	<120	NA	-9,7

- Variants c*894G>A

	RegRNA		PITA	
	sauvage c.*894G	muté c.*894A	sauvage c.*894G	muté c.*894A
hsa-miR-1225-5p	<120	<120	NA	-12,34
hsa-miR-1262	<120	128	NA	NA
hsa-miR-129-5p	<120	123	-7	NA
hsa-miR-3915	<120	121	NA	NA

Annexe 5 : Mail de soumission de l'Article 2 présenté dans ce manuscrit

07/05/2017

JCEM / Submission Confirmation for New rare genetic vari... - CHARRIERE, Sybil

JCEM / Submission Confirmation for New rare genetic variants of
LMF1 gene associated with hyperchylomicronemia

em.jcem.0.530863.80e1cb32@editorialmanager.com de la part de
JCEM <em@editorialmanager.com>

dim. 07/05/2017 13:25

À : CHARRIERE, Sybil <sybil.charriere@chu-lyon.fr>;

Dear Dr. charriere,

Your submission entitled "New rare genetic variants of LMF1 gene associated with hyperchylomicronemia" has been received by The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jcem.edmgr.com/>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

The Journal Office

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
jcem@endocrine.org

De : em.jcem.0.530863.80e1cb32@editorialmanager.com
<em.jcem.0.530863.80e1cb32@editorialmanager.com> de la part de JCEM
<em@editorialmanager.com>

Envoyé : dimanche 7 mai 2017 13:25

À : CHARRIERE, Sybil

Objet : JCEM / jc.2017-01052 / Assigned Manuscript Number

Dear Dr. charriere,

Your submission entitled "New rare genetic variants of LMF1 gene associated with hyperchylomicronemia" has been assigned the following manuscript number: jc.2017-01052.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
The URL is <http://jcem.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

The Journal Office

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism
jcem@endocrine.org