



HAL
open science

Épidémiologie génétique et estimation du risque de maladie (pénétrance) des amyloses héréditaires à transthyrétine

Farida Gorram

► **To cite this version:**

Farida Gorram. Épidémiologie génétique et estimation du risque de maladie (pénétrance) des amyloses héréditaires à transthyrétine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2021. Français. NNT : 2021PESC0032 . tel-03663459

HAL Id: tel-03663459

<https://theses.hal.science/tel-03663459v1>

Submitted on 10 May 2022

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.

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

l'Université Paris-Est Créteil

Spécialité doctorale : Biologie cellulaire et Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Farida GORRAM

le 22 septembre 2021

**ÉPIDÉMIOLOGIE GÉNÉTIQUE ET ESTIMATION DU RISQUE DE
MALADIE (PÉNÉTRANCE) DES AMYLOSES HÉRÉDITAIRES À
TRANSTHYRÉTINE**

Directrice de thèse : Professeur Violaine Planté-Bordeneuve
Co-encadrants de thèse : Docteur Flora ALARCON
Professeur Grégory NUEL

Jury

M. Antoine DE PAUW	Examineur
M. Philippe LE CORVOISIER	Examineur
Mme. Magali COLOMBAT	Rapporteur
M. Aurélien LATOUCHE	Rapporteur
Mme. Violaine PLANTE-BORDENEUVE	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Violaine Planté-Bordeneuve, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

Je remercie le Docteur Flora Alarcon et le Professeur Gregory Nuel d'avoir co-encadré cette thèse. Merci pour votre aide précieuse concernant la méthodologie statistique.

Je remercie l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail : le Professeur Aurélien Latouche et le Docteur Magali Colombat pour avoir accepté d'être rapporteurs ; le Docteur Antoine De Paw et le Professeur Philippe Le Corvoisier pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci aux Professeurs Frédéric Relaix et Jérôme Authier de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de biologie du système neuromusculaire IMRB – Inserm U955. J'y ai trouvé le professionnalisme et l'encadrement propice à la réalisation de mon travail de recherche.

Merci à tous les membres de l'IMRB et du service de Neurologie du CHU Henri Mondor pour leur aide et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier particulièrement les familles et les centres collaborateurs qui ont participé à l'élaboration de ces travaux.

Enfin, un grand merci à ma famille, à mon mari et à mes amis qui m'ont encouragée à aller toujours plus loin.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	3
SUMMARY	4
TABLE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE	10
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. LES MALADIES AMYLOÏDES	14
1. Classification et caractéristiques des amyloses	14
2. Le dépôt amyloïde (DA)	16
2.1. Nature et caractéristiques	16
2.2. Les composants communs.....	16
2.2.1. Glycosaminoglycanes (GAG)/Protéoglycanes (PG)	16
2.2.2. Composant P amyloïde (SAP)	17
3. Historique des amyloses ATTRv	17
4. La transthyrétine (TTR)	20
4.1. Structure	20
4.2. Fonction	21
4.3. Métabolisme.....	22
4.4. Formation des fibrilles amyloïdes.....	23
4.5. Le gène de la TTR : structure et fonction.....	25
4.6. Variants du gène TTR	26
➤ Variants pathogènes	26
➤ Variants non pathogènes.....	28
5. Les amyloses héréditaires à transthyrétine (ATTRv)	30
5.1. Présentation clinique.....	30
5.1.1. Manifestations neurologiques.....	31
5.1.2. Manifestations extra-neurologiques	34
5.1.3. Formes cliniques et corrélations phéno-génotypique	35
5.1.4. Evolution - Survie.....	36
5.2. Diagnostic.....	37
6. Modèles animaux	37
7. Prise en charge des patients et familles ATTRv	38
7.1. Conseil génétique (CG) et diagnostic pré symptomatique	38
7.2. Traitements des ATTRv avec polyneuropathies	42
7.2.1. La transplantation hépatique (TH).....	43
7.2.2. Les stabilisateurs de la transthyrétine	44
7.2.3. Les thérapies de silençage du gène TTR	46
7.2.4. Autres approches de traitement	48
II. ETUDES DES AMYLOSES ATTRv	50
1. Épidémiologie génétique des ATTRv	50
1.1. Prévalence et incidence.....	50
1.2. Variation de l'âge de début selon l'origine géographique.....	51
1.3. Variation de l'âge de début selon le sexe	52
1.4. Variation de l'âge de début chez les jumeaux monozygotes	52
1.5. Anticipation	53
1.6. Pénétrance (Risque de maladie).....	54
2. Facteurs génotypiques modificateurs du phénotype	56
2.1. Haplotypes.....	57
2.2. Études d'association	57
2.3. Locus à séquences répétitives	58

2.4. L'ADN mitochondrial (ADNmt)	59
2.5. Autres études	59
PROJET DE RECHERCHE	62
DONNÉES D'ÉPIDÉMIOLOGIE GÉNÉTIQUE DES FAMILLES ATTRv	63
I. Méthodologie statistique pour l'estimation du risque de maladie	63
1. Description des données et problématiques méthodologiques	63
1.1. Analyses de Survie	65
1.1.1. Modélisation du problème	67
1.1.2. L'estimation de Kaplan Meier (KM)	69
1.1.3. L'estimateur de Kaplan Meier pondéré	73
1.1.4. L'algorithme Expectation-Maximisation	74
1.1.5. Covariables : Modèle de Cox	78
1.2. Prise en compte du recensement	84
II. Résultats	86
1. Descriptions des familles répertoriées dans notre population ATTRv en France. .	86
1.1. Descriptions des familles ATTRv en France	86
1.2. Répartition géographique des familles ATTRv en France et sa métropole.	88
2. Données familiales utilisées pour l'estimation du risque de maladie	89
3. Publications	93
3.1. Etude 1 : Estimation du risque de maladie dans notre population d'ATTRv en utilisant une approche non paramétrique (NPSE)	93
3.2. Etude 2 : Estimation du risque de maladie et données génétiques des familles ATTRV30M suédoises	98
3.3. Etude 3 : Estimation du risque de maladie dans un large spectre de familles ATTRv d'Europe.	108
III. ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE TTR CHEZ LES PATIENTS ATTRV30M	134
1. Introduction	134
2. But et déroulement du projet	134
3. Méthodologie	135
3.1. Biopsies hépatiques	135
3.2. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADNc	135
3.3. La PCR digitale	136
3.4. Statistiques	139
4. Résultats	139
5. Discussion	144
CONCLUSIONS GÉNÉRALE	147
PERSPECTIVES	148
REFERENCES	150
ANNEXES	170

RÉSUMÉ

L'amylose héréditaire à transthyrétine (ATTRv) est une maladie génétique rare progressive et d'évolution fatale, transmise sur un mode autosomique dominant. Les lésions organiques sont induites par des dépôts de fibrilles amyloïdes, consécutifs à une mutation dans le gène de la transthyrétine (TTR). Plus de 95 % de la TTR est synthétisée par le foie. Cette affection est caractérisée par une répartition géographique particulière, par des variations phéno-génotypiques entre les populations, avec d'importantes différences d'âge de début des symptômes ; notamment pour la mutation TTRVal30Met (V30M), la plus fréquente en Europe. Les facteurs génétiques et/ou environnementaux qui les sous-tendent restent inconnus. Récemment, deux thérapies de silençage génique ont été développées (ARN interférent et Oligonucléotide antisens) ciblant les hépatocytes pour supprimer l'ARNm de la TTR. Pour une plus grande efficacité, l'administration de ces traitements doit intervenir dès les premiers symptômes. L'objectif de ce travail a été d'améliorer nos connaissances des caractéristiques génétiques cliniques, notamment l'estimation du risque de la maladie (pénétrance) dans une large cohorte de 342 familles ATTRv. Ce travail a été réalisé dans notre centre expert ATTRv (Hôpital Universitaire Henri Mondor) en collaboration avec cinq centres experts internationaux : Espagne (Majorque-Hôpital Universitaire de Son Llätzer), Brésil (Université fédérale de Rio de Janeiro), Italie (Sicile-Hôpital AOU Policlinico), Suède (Hôpital Universitaire d'Umea) et Turquie (Hôpital Universitaire d'Istanbul). Cette cohorte reflète la situation phéno-génotypique hétérogène de l'amylose ATTRv observée en Europe.

La méthode NPSE (Non-Parametric Survival Estimation) utilisée a été récemment développée pour l'estimation du risque de maladie de transmission autosomique dominante. Il s'agit d'une approche statistique robuste non-paramétrique qui a l'avantage, de prendre en compte le recensement des familles et différentes covariables susceptibles d'influencer le risque. De plus, nous avons créé une extension de la méthode pour étudier les familles avec des individus homozygotes et prendre en compte le sexe du parent transmetteur.

Nous avons d'abord testé cette approche sur les variants TTR fréquemment observés en France. Les résultats montrent une pénétrance incomplète pour les variants analysés et une différence significative de risque entre les mutations. Nous avons ensuite étudié une population plus large en incluant des familles ATTRV30M et ATTR non-V30M d'origines diverses (France, Espagne, Italie, Portugal, Suède). Des profils de risques très différents ont été observés entre les 7 mutations TTR testées et nous avons précisé pour chaque variant, les intervalles d'âge où le risque d'être malade apparaît.

Dans les familles ATTRV30M, le risque était significativement différent selon l'origine géographique et le sexe du parent transmetteur qui était plus important en cas de transmission maternelle.

Enfin, nous avons étudié plus particulièrement les familles suédoises ATTRV30M, recensées de manière exhaustive. Le nord de la Suède est un foyer important en raison de la prévalence élevée de la mutation TTRV30M. Dans cette population, nous avons démontré l'existence d'une anticipation d'âge de début, plus importante dans les paires mère-fils. Nous avons confirmé que la pénétrance était faible, avec cependant une majoration du risque en cas de transmission maternelle. Le risque était similaire entre les individus homozygotes et hétérozygotes ATTRV30M suédois.

Pour finir, l'étude de l'expression du gène TTR dans des biopsies hépatiques de patients ATTRV30M par Digital Droplet PCR n'a pas permis de dégager de corrélations entre le taux d'expression de TTR et l'âge de début de la maladie.

L'ensemble de ces travaux a permis de préciser les risques de la maladie et de caractériser chez les individus TTRV30M des facteurs modificateurs de l'âge de début, tel le sexe du parent transmetteur. Ces données sont importantes pour orienter le conseil génétique et la prise en charge des porteurs asymptomatiques.

Mots-clés : Génétique, Neuropathie périphérique, Amylose héréditaire à Transthyrétine, Risque, pénétrance, Covariables

SUMMARY

Transthyretin amyloidosis (ATTRv) is a rare, progressive and lethal genetic disease transmitted by an autosomal dominant pattern. The organ lesions are induced by the deposition of amyloid fibrils, due to a mutation in the Transthyretin gene (TTR). More than 95% of the TTR is synthesized by the liver. This affection is characterized by a specific geographical distribution, by pheno-genotypic variations between populations, with important differences in the age of onset of symptoms, particularly for the TTRVal30Met (V30M) mutation, the most frequent TTR mutation in Europe. The genetic and/or environmental factors behind this variability remain unknown. Recently, two gene silencing therapies have been developed (Interference RNA and Antisense oligonucleotide) to target the hepatocytes and inhibit TTR mRNA. For a higher efficiency, these treatments should be administered at the first symptoms appear. The objective of this work was to improve our knowledge of the clinical genetic characteristics of this disease, particularly the estimation of the disease risk (penetrance) in a large cohort of 342 ATTRv families. This study was performed in our ATTRv expert center, The Henri Mondor University Hospital, in collaboration with five international centers: Spain (Mallorca- Son Llàtzer University Hospital), Brazil (Hospital Federal University of Rio de Janeiro), Italy (Sicily- AOU G. Martino University Hospital of Messina), Sweden (Umeå University Hospital) and Turkey (Istanbul University Hospital). The ATTRv families included in this study reflect the heterogeneous pheno-genotypic variability of ATTRv observed in Europe.

The NPSE (Non-Parametric Survival Estimation) method used in this study has been recently developed for the risk estimation of autosomal dominant diseases. It is a robust non-parametric statistical approach allowing to consider the ascertainment of families and the different covariates that may influence the risk. In addition, we have developed an extension of the method to study families with homozygous individuals and take into account the parent of origin (POO).

First, we tested this approach on the TTR variants frequently observed in France. The results showed incomplete penetrance for the variants analyzed and a significant difference in the risk between mutations. We then studied a larger population by including ATTRV30M and non-V30MATTR families from various origins (France, Spain, Italy, Portugal, and Sweden). Different risk profiles were observed between the 7 TTR mutations tested and the age intervals where the risk raised for each variant. In ATTRV30M families, the risk was significantly different according to the geographical origin and the POO that was higher in case of maternal transmission. Finally, we specifically studied the Swedish ATTRV30M families, which were exhaustively surveyed. Northern Sweden is an important focus for the disease associated with a high prevalence of the TTRV30M mutation. In this population, we demonstrated the existence of an earlier age of onset, which is more pronounced in mother-son pairs. We confirmed that the penetrance was lower, but with an increased risk in case of maternal transmission. The risk was similar between homozygous and heterozygous Swedish individuals ATTRV30M. In addition, the study of TTR gene expression in liver biopsies of ATTRV30M patients by Digital Droplet PCR did not reveal any correlation between the level of TTR expression and the age of onset of the disease.

Overall, this work allowed to specify the risks of the disease and characterize factors that modify the age of onset in TTRV30M individuals, such as the POO. These data are important to guide genetic counselling and the management of asymptomatic carriers.

Keywords: Genetics, Peripheral neuropathy, Hereditary transthyretin amyloidosis, Risk, Penetrance, Covariates

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Historique des amyloses ATTRv.....	19
Figure 2: (A) Structure aux rayons X de la TTR. Les contacts entre les dimères forment deux poches hydrophobes. Chaque monomère contient une petite hélice α et huit brins β (CBEF et DAGH). (B) Structure du tétramère de la transthyréine humaine (TTR) en complexe avec deux molécules de thyroxines (Bezzera et al. 2020)...	20
Figure 3: Deux molécules de T4 localisées sur le site de fixation de la TTR. Schéma adapté de (Guo et al., 2020).	21
Figure 4: Tétramère de transthyréine sauvage (4 monomères).	23
Figure 5: Synthèse et formation du tétramère de TTR (Buxbaum, 2018).....	23
Figure 6: Mécanisme possible du repliement et de l'agrégation des protéines TTR en fibrilles amyloïdes matures (Schmidt et al., 2019).	25
Figure 7: Structure du gène de la TTR humaine montrant les exons, les introns, ainsi que les régions traduites et non traduites.	25
Figure 8: Ensemble des signes et symptômes possibles de l'amylose héréditaire à transthyréine. Adapté d'après Conceição I, et al. 2016.	30
Figure 9: Evolution des troubles sensitifs thermoalgiques dans les ATTRv selon un mode longueur dépendant.	32
Figure 10: Progression des symptômes de l'ATTRv sur 10 ans suivant le début de l'affection (Adapté de https://atryvoirplusclair.fr/nos-actions/).....	32
Figure 11: Le système nerveux autonome. A gauche, le système sympathique et à droite le système parasympathique, qui assurent des effets opposés au niveau de chacun des organes qu'ils innervent parfois en commun (Kolb et al., 2019).	33
Figure 12: Coupe semi- fine (1 μ d'épaisseur) du nerf saphène externe d'un patient atteint d'une amylose ATTRVal30Met. On notera la raréfaction importante des fibres myéliniques et la présence de dépôts de la substance amyloïde dans l'endonèvre (Bleu de Thionine).	34
Figure 13: Déformation de la pupille chez un patient ATTRV30M (Benson and Kincaid, 2007).	35
Figure 14: Spectre des corrélations génotype-phénotype dans les ATTRv. L'expression phénotypique varie considérablement, allant d'une atteinte presque exclusivement neurologique à une atteinte prédominante ou exclusivement cardiaque. Entre les deux, plusieurs mutations sont associées à un phénotype mixte (neurologique et cardiaque) (Rapezzi et al. 2013).	36
Figure 15: Diagnostic des amyloses ATTRv (Planté-Bordeneuve and Said, 2011).	37
Figure 16: Déroulement du diagnostic présymptomatique dans notre centre (CHU Henri Mondor).	41
Figure 17: Stratégies thérapeutiques actuelles et expérimentales pour l'amylose ATTRv. Les interventions thérapeutiques ciblent différentes étapes du processus de formation du DA. Les approches faisant actuellement l'objet d'une étude clinique sont représentées en rouge (Obici et Adams, 2020)	42
Figure 18: Approches thérapeutiques dans les ATTRv (Obici and Adams, 2020).	42
Figure 19: Survie globale de patients ATTRV30M et ATTR non-V30M (Ericzon et al., 2015).	43
Figure 20: Résultats des critères de jugements dans le groupe patisiran et placebo (Adams et al., 2018). (A) Taux sériques de TTR (B) Evaluation du score neurologique mNIS+7. (C) Evaluation du score de la qualité de vie Norfolk.....	47
Figure 21: Mécanisme d'action de l'Inotersen et du Patisiran dans les ATTRv (Buxbaum, 2018).	48
Figure 22: Prévalence mondiale de l'ATTRv d'après Schmidt et al. 2018 (Inês et al., 2018).	51
Figure 23: Répartition mondiale de la moyenne d'âge de début des familles ATTRV30M. 52	52
Figure 24: Risques de maladie estimés selon le variant TTR dans la population Sicilienne (Mazzeo et al., 2015).....	56

Figure 25: Risques de maladie estimés à partir de 46 patients ATTRV30M chypriotes (Andreou et al., 2018).....	56
Figure 26: Représentation schématique des facteurs modificateurs associés à l'âge de début.....	61
Figure 27: Illustration des individus censurés et non censurés.	65
Figure 28: Arbre généalogique de la famille-exemple considérée.....	71
Figure 29: Courbe de survie obtenue avec la méthode de KM. La courbe de survie est représentée par un trait plein et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.	73
Figure 30: Arbre généalogique de la famille-exemple considérée avec des individus non génotypés.	76
Figure 31: Courbe de survie obtenue avec la méthode de KM simple (en bleu) et la méthode de KM pondérée (en rouge).	77
Figure 32: Estimation de la fonction de survie dans un modèle de Cox en tenant compte de la covariable "sexe". Les courbes de survie sont représentées par un trait plein (en noir pour les hommes et en bleu pour les femmes) et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.	80
Figure 33: Estimation de la fonction de survie dans un modèle de Cox en tenant compte du POO. Les courbes de survie sont représentées par un trait plein (en noir : transmission paternelle, en bleu : transmission maternelle) et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.	83
Figure 34: Répartition des mutations des 193 familles ATTRv non portugaises en France.	87
Figure 35: Organigramme des familles ATTRv.....	91
Figure 36: Comparaison de la méthode paramétrique et non paramétrique sur une cohorte de familles françaises ATTRV30M.....	94
Figure 37: Estimation du risque de maladie selon le variant TTR (NPSE).	94
Figure 38: Déroulement de l'étude et des méthodes utilisées.	135
Figure 39 : Générateur de gouttelettes de taille et de volume uniformes. (https://www.bio-rad.com).	137
Figure 40: Lecture individuelle des gouttelettes, mesure de la fluorescence dans deux canaux (https://www.bio-rad.com).....	138
Figure 41: Tracé électrophorétique montrant la substitution de la valine en méthionine en position 30 du gène TTR (V30M).	140
Figure 42: Représentation graphique du nombre de gouttelettes positives de l'allèle muté et sauvage du gène TTR.....	141
Figure 43: Expression de la TTR en fonction des 3 gènes de références.	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Protéines amyloïdes impliquées en pathologie humaine et organe(s) cible(s) (Benson et al., 2020).	15
Tableau 2: Principales caractéristiques des fibrilles amyloïdes de types A et B.	24
Tableau 3: Variants TTR associés à des dépôts amyloïdes leptoméningés.	28
Tableau 4: Variants TTR non amyloïdogènes.	28
Tableau 5: Hétérozygotes doubles identifiés dans les familles ATTRv.	29
Tableau 6: Les interactions des stabilisateurs avec le tétramère de TTR.	44
Tableau 7: Récapitulatif des gènes associés à la variation de l'âge de début dans les ATTRV30M.	58
Tableau 8: Distribution de la famille-exemple.	71
Tableau 9: Distribution de l'âge observé aux dernières nouvelles lorsque l'individu i n'est pas atteint ($\delta_i = 0$) et l'âge au diagnostic de la maladie lorsque l'individu i est atteint ($\delta_i = 1$).	72
Tableau 10: Distribution marginale a posteriori $\mathbb{P}(G_i = x ev)$ calculée avec la méthode BP (résultat de <i>bped</i>). Les individus génotypés sont représentés en gras.	77
Tableau 11: Distribution marginale a posteriori $i \mathbb{P}(G_i = x ev)$ calculée avec la méthode BP (résultat de <i>bped</i>), dans le cadre de l'utilisation de la covariable POO. Les probabilités (G_i) des individus génotypés sont représentées en gras.	83
Tableau 12: a) Mutations TTR identifiées dans les familles d'origine portugaises ATTRv en France ; b) Caractéristiques des familles d'origine portugaises ATTRv.	86
Tableau 13: Mutations TTR identifiées dans les 193 familles ATTRv en France (Classement par ordre de fréquence).....	88
Tableau 14: Caractéristiques des familles ATTRv.	92
Tableau 15: Caractéristiques des patients de l'étude.	139
Tableau 16: RIN des 6 patients ATTRV30M.....	140
Tableau 17: Nombre de copies par microlitre de TTR des 6 patients V30M.	141

ABREVIATIONS

A

Aa	Acide aminé
ADNmt	ADN mitochondrial
AEM	Agence européenne des médicaments
AMM	Autorisation de mise sur le marché
APCS	Amyloid P Component, Serum
APOE	Apolipoprotein E
AR	Androgen receptor
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASMR	Amélioration du service médical rendu
ATN1	Atrophin-1
ATTR-CM	Amylose à transthyréine avec cardiomyopathie
ATTR-PN	Amylose à transthyréine avec polyneuropathie
ATTRv	Amylose à transthyréine héréditaire (v pour variant)
ATXN	Ataxin

B

BGN	Biglycan
-----	----------

C

Cas9	Caspase 9
C/EBPs	CCAAT-enhancer-binding proteins
C1Q	Complement component 1q
CG	Conseil génétique
CPHPC	R-1-[6-[R-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2 carboxylic acid
CRISPER	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

D

DA	Dépôt amyloïde
ddPCR	Digital Droplet Polymerase chain reaction

E

ERK	Extracellular signal-regulated kinases
-----	--

F

FDA	Food and Drug Administration
-----	------------------------------

G

GAG	Glycosaminoglycanes
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GRE	Glucocorticoid responsive elements

H

hATTR	Hereditary transthyretin amyloidosis
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HSF1	Heat shock factor 1
HSP27	Heat shock protein 27

K

KM	Kaplan-Meier
----	--------------

L

LCR	Liquide céphalorachidien
-----	--------------------------

M

MEC	Matrice extracellulaire
MEK	Extracellular signal-regulated kinases
mNIS+7	Modified neuropathy impairment score plus 7

N

NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NIS	Neuropathy Impairment Score
NIS-LL	Neuropathy impairment score-lower limbs
NPSE	Non-parametric survival estimation

O

OAS	Oligonucléotides antisens
ORF	Open reading frame

P

Pb	Paire de base
PEL	Proband exclusion likelihood
PG	Protéoglycans
PSN	Polymorphisme d'un seul nucléotide

R

RBP	Rétinol binding protein
RIN	RNA integrity number

S

SA	Substance amyloïde
SAP	Serum Amyloid P
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux centrale
SNP	Système nerveux périphérique

T

Tc ^{99m} -HMDP	Technetium-99m hydroxy-méthylène-diphosphonate
T4	Thyroxine 4
TH	Transplantation hépatique
TPM	Transcripts per million
TTR	Transthyréline
TTRm	Transthyréline muté
TTRwt	Transthyréline wild-type
TUDCA	Tauroursodeoxycholic acid

U

UTR	Untranslated transcribed region
-----	---------------------------------

V

V122I	Valine 122 Isoleucine
V30M	Valine 30 Méthionine

W

WD	Weibull distribution
----	----------------------

Y

YWHAZ	Protein Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation
-------	--

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies rares, également appelées maladies orphelines, touchent un nombre restreint de patients. L'Union Européenne qualifie de « rare » une maladie touchant moins de cinq personnes sur 10 000 (Nguengang Wakap et al., 2020). En France, les maladies rares représentent un enjeu majeur de santé publique, car les 7 000 identifiées représentent plus de 3 millions de personnes soit 4,5 % de la population (DGOS, 2021). Les maladies rares sont généralement graves, chroniques, évolutives, invalidantes et parfois mortelles.

Soixante-dix pour cent des maladies rares sont d'origine génétique (Nguengang Wakap et al., 2020). Une grande majorité des maladies génétiques se caractérise par une hétérogénéité allélique, c'est-à-dire que des mutations différentes d'un même gène sont potentiellement en cause. Cependant, les phénotypes observés peuvent être différents, et ce pour plusieurs causes, notamment l'existence de polymorphismes associés du génome, une régulation complexe de l'expression des gènes ou encore des modifications épigénétiques.

Les amyloses sont des maladies rares ayant en commun la présence d'un dépôt de protéines (dépôt amyloïde, DA) dénaturées et insolubles dans les tissus. Ces dépôts extracellulaires sont organisés en feuillettes β -plissés antiparallèles leur conférant une propriété histologique commune en microscopie optique : un aspect rouge brique lorsqu'ils sont colorés au rouge Congo, associé à une biréfringence jaune-vert en lumière polarisée (Yakupova et al., 2019). Plus de 36 protéines amyloïdes différentes ont été recensées par le Comité de nomenclature de la Société Internationale des Amyloses (Benson et al., 2020).

Il existe deux formes d'amyloses à transthyrétine : une forme rare, héréditaire, où le précurseur est la transthyrétine (TTR) mutée, classiquement dénommée amylose à TTR héréditaire (hATTR) et récemment renommée ATTRv (v pour variant) ; une forme plus commune où le précurseur est la TTR non mutée, l'amylose sénile ou sauvage (Wild Type) (Benson et al., 2018). Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement à l'amylose à TTR héréditaire et utiliserons la nouvelle nomenclature, ATTRv.

L'ATTRv a d'abord été identifiée au Portugal par Andrade en 1952, puis au Japon en 1968 et en Suède en 1976 (Andrade, 1952 ; Araki et al., 1968; Andersson, 1976). Il s'agit des trois foyers où la prévalence est la plus importante. D'autres cas furent ensuite diagnostiqués dans plusieurs pays dont la France (Plante-Bordeneuve et al., 1998). Cent quarante six mutations TTR (dont 133 mutations amyloïdogènes) sont répertoriées dans la base de données internationales www.amyloidosismutations.com. Cette base de données reprend et met à jour les mutations identifiées. La plupart sont des mutations ponctuelles faux sens. La substitution TTRVal30Met (V30M) est la plus fréquente des mutations pathogènes en Europe. C'est quasiment la seule détectée au Portugal et en Suède. La majorité des mutations sont pathogènes, entraînant la formation de DA formée de TTR. Plus de 95 % de la TTR (sous forme de monomères) est synthétisée par le foie, tandis que les plexus choroïdes et la rétine sont des sources accessoires (Gertz et al., 2015). Traditionnellement, on utilise la numérotation de la séquence d'acides aminés (aa) de la protéine mature pour nommer les variants. Dans ce travail, nous utiliserons l'ancienne nomenclature. Pour exemple, Val30Met correspond à p.Val50Met en excluant la séquence signal.

De transmission autosomique dominante, l'ATTRv est caractérisée par la présence de DA dans différents organes et tissus, en particulier dans l'endonèvre des nerfs périphériques. Bien que d'autres manifestations, cardiaques en particulier, puissent dominer le tableau clinique, c'est la présence d'une neuropathie périphérique grave, sensitivomotrice et dysautonomique qui la caractérise (Planté-Bordeneuve and Said, 2011). La survie sans traitement est d'environ 10 ans.

Depuis 1990, la transplantation hépatique (TH) a permis d'améliorer le pronostic de la maladie (Holmgren et al., 1991; Carvalho et al., 2015). Cette dernière est efficace lorsqu'elle est réalisée à un stade précoce. Chez le sujet jeune ATTRV30M avec une neuropathie peu sévère, elle permettra 80% de survie à 15 ans post-greffe. Le bénéfice de la TH est nettement moindre pour les patients avec une mutation TTRV30M de présentation tardive ou d'une mutation TTR non-V30M (Herlenius et al., 2004; Ericzon et al., 2015). Il s'agit néanmoins d'une procédure lourde, accompagnée d'une mortalité péri-opératoire significative et n'empêchant pas la sécrétion de protéines TTR dans l'œil et le cerveau. Récemment, de nouvelles stratégies thérapeutiques moins invasives faisant appel à la thérapie de silençage

génique (ARN interférent, Oligonucléotides antisens) ont montré leur efficacité pour ralentir ou arrêter la progression de la maladie. Elles sont maintenant disponibles pour les patients (Adams et al., 2018; Benson et al., 2018). À ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible pour les patients ATTRv.

Plusieurs travaux d'épidémiologie génétique réalisés dans les familles ATTRv ont révélé d'importantes variations phénotypiques, notamment d'âge de début de la maladie et de présentation clinique. Le nombre croissant de mutations TTR a conduit à l'identification d'un spectre phénotypique plus large (Planté-Bordeneuve and Said, 2011; Parman et al., 2016). La pénétrance (ou risque d'être malade) variait selon les populations ATTRV30M (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Hellman et al., 2008; Saporta et al., 2009b). La pénétrance correspond au pourcentage d'individus symptomatiques parmi les porteurs de mutations pathogènes. Les facteurs de variation génétiques et/ou environnementaux à l'origine de ces différences restent non élucidés.

Les études d'épidémiologie génétique ont une importance pour le clinicien dans sa stratégie de diagnostic et pour la recherche afin de mieux comprendre les facteurs à l'origine des variations phéno-génotypique. C'est dans ce contexte que s'intègre mon projet de thèse, qui a pour objectif de préciser les données d'épidémiologie génétique des familles ATTRv et de cerner les facteurs biologiques impliqués dans la variation de l'âge de début de la maladie dans les familles ATTRV30M.

Objectifs de thèse

L'objectif principal de ma thèse était d'améliorer les connaissances sur les données d'épidémiologie génétique en étudiant une large cohorte de familles ATTRv d'origines diverses.

Les objectifs spécifiques de ce projet de recherche étaient les suivants :

- Préciser les caractéristiques des familles telles que l'âge du début de la maladie et la répartition hommes/femmes ;
- Préciser les estimations du risque de maladie, en tirant partie d'une approche statistique récemment développée, permettant la prise en compte de covariable sur un large échantillon de familles ;
- Détecter la présence d'un phénomène d'anticipation, définie par un âge de début plus précoce ou un état clinique plus grave au cours des générations successives.

Enfin, le dernier objectif de ce travail était d'identifier les facteurs qui pourraient influencer sur l'âge de début de la maladie. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à étudier le rôle du gène de la TTR dans un groupe de patients ATTRV30M d'âges de début variables.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES MALADIES AMYLOÏDES

Les amyloses sont un groupe de maladies rares qui se caractérisent par la présence de dépôts protéiques insolubles dans les organes et tissus (Wechalekar et al., 2016). Les précurseurs protéiques à l'origine des DA sont des protéines circulantes ou produites localement (β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer). Ces protéines solubles et riches en feuillet β plissés, vont subir une modification conformationnelle. Ensuite, elles s'incorporent et/ou interfèrent avec d'autres précurseurs qui vont conduire à leur polymérisation puis à la formation des fibrilles amyloïdes. La formation de ces fibrilles va altérer les organes et tissus. La pathologie peut résulter d'une modification structurale de la protéine précurseur, d'une surproduction ou encore d'une réduction de sa dégradation dans l'organisme. Par exemple, l'amylose AL est caractérisée par l'agrégation et le dépôt de fibrilles amyloïdes dû à une surproduction des chaînes légères d'immunoglobulines produites par les plasmocytes. Dans l'amylose AA, l'augmentation du taux de la protéine sérique amyloïde A est causée par un syndrome inflammatoire chronique. Notons, que les principaux organes cibles des DA sont le cœur, le rein, le tube digestif, le foie, les nerfs périphériques, la peau, l'œil, etc. (Bustamante and Zaidi, 2021).

1. Classification et caractéristiques des amyloses

Les types d'amyloses se distinguent par leur protéine précurseur. En 1993, le comité de nomenclature des amyloses a été créé pour unifier les noms et mettre à jour les différentes classes d'amyloses, en tenant compte à la fois de la protéine précurseur et d'autres caractéristiques, telle que la présence du DA dans un seul (amylose localisée) ou plusieurs organes (amylose systémique, généralisée ou diffuse), des organes cibles et du caractère héréditaire ou non de la maladie (Sipe et al., 2010). En pathologie humaine, 36 protéines précurseurs de substance amyloïde sont répertoriées (tableau 1) (Benson et al., 2020).

Protéine amyloïde	Précurseur	Systémique (S) et/ou locale(L)	Acquis (A) ou héréditaire (H)	Organes ou tissus atteints
AL	Chaîne légère des immunoglobulines	S, L	A, H	Tous les organes en général, excepté le système nerveux central
AH	Chaîne lourde des immunoglobulines	S, L	A	Tous les organes, excepté le système nerveux central
AA	(Apo) Sérum amyloïde A	S	A	Tous les organes, excepté le système nerveux central
ATTR	Transthyrétine normale	S	A	Cœur, majoritairement chez les hommes, ligaments, tenosynovium
	Transthyrétine mutée	S	H	Système nerveux périphérique, système nerveux autonome, cœur, œil, rein, leptoméninges
Aβ2M	β2-Microglobuline normale	S	A	Système musculosquelettique
	β2-Microglobuline mutée	S	H	Système nerveux autonome
AApoAI	Apolipoprotéine A I mutée	S	H	Cœur, foie, poumon, système nerveux autonome, testicules, larynx (variants en C-terminale), peau (variants en C-terminale)
AApoAII	Apolipoprotéine A II mutée	S	H	Poumons
AApoAIV	Apolipoprotéine A IV normale	S	A	Médullaire rénale et systémique
AApoCII	Apolipoprotéine C II mutée	S	H	Poumon
AApoCIII	Apolipoprotéine C III mutée	S	H	Poumon
AGel	Gelsoline mutée	S	H	Système nerveux autonome, cornée
ALys	Lysosyme mutée	S	H	Poumon
ALECT2	Facteur chimiotactique leucocytaire-2	S	A	Poumon, en premier
AFib	Fibrinogène α mutée	S	H	Poumon, en premier
ACys	Cystatine C mutée	S	H	Système nerveux autonome, peau
ABri	ABriPP mutée	S	H	Système nerveux central (SNC)
ADan	ADanPP mutée	L	H	Système nerveux central (SNC)
Aβ	Précurseur de la protéine Aβ normale	L	A	Système nerveux central (SNC)
	Précurseur de la protéine Aβ mutée	L	H	Système nerveux central (SNC)
AαSyn	α-Synucléine	L	A	Système nerveux central
ATau	Tau	L	A	Système nerveux central
APrP	Protéine Prion normale	L	A	Maladie de Creutzfeldt-Jakob, insomnie fatale
	Protéine Prion mutée	L	H	Maladie de Creutzfeldt-Jakob, Syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, insomnie fatale
	Protéine Prion mutée	S	H	Système nerveux périphérique
ACal	(Pro)Calcitonine	L	A	Cancer médullaire de la thyroïde
AIAPP	Amyline	L	A	Ilots de Langerhans, insulinome
AANF	Facteur Atrial Natriurétique	L	A	Atrium cardiaque
APro	Prolactine	L	A	Prolactinome, hypophyse sénile
AIns	Insuline	L	A	latrogène, injection locale
ASPC	Protéine du surfactant pulmonaire	L	A	Poumon
ACor	cornéodesmosine	L	A	Épithéliums kératinisés, follicules pileux
AMed	Lactadhérine	L	A	Aortique (média)
AKer	Kératoépine	L	A	Cornée, héréditaire
ALac	Lactoferrine	L	A	Cornée
AOAAP	Protéine associée aux améloblastes odontogènes	L	A	Tumeur odontogène
ASem1	Séménogéline 1	L	A	Vésicules séminales
Aenf	Enfuvirtide	L	A	Latrogène
ACatK	Cathepsine K	L	A	Associé à la tumeur
AEFEMP1	Protéine 1 de la matrice extracellulaire de type fibuline contenant de l'EGF	L	A	Veines portales Associé au vieillissement

Tableau 1: Protéines amyloïdes impliquées en pathologie humaine et organe(s) cible(s) (Benson et al., 2020).

2. Le dépôt amyloïde (DA)

2.1. Nature et caractéristiques

L'amylose se caractérise par des agrégats de protéines fibrillaires anormales insolubles, amorphes et éosinophiles qui se forment au contact des matrices extracellulaires (MEC). On reconnaît le DA par sa forte affinité tinctoriale pour le rouge Congo et une biréfringence jaune-vert en lumière polarisée. En microscopie électronique, l'organisation des protéines précurseurs se présente sous forme de fibrilles linéaires de 7,5 à 10 nm de diamètre organisées en feuillets β -plissés antiparallèles. Les extrémités N- et C- terminales des fibrilles sont orientées dans des directions opposées ce qui permet au rouge Congo de s'intercaler entre les fibrilles (Yakupova et al., 2019). L'identification de la protéine à l'origine du DA repose principalement sur l'immunohistochimie ou la spectrométrie de masse. Le DA est composé principalement de la protéine précurseur, le reste représente les composants communs à tous les dépôts.

2.2. Les composants communs

Le DA est composé d'environ 90 % de protéines fibrillaires qui sont caractéristiques de chaque variété d'amylose. Parmi les 10 % restant, environ 5 % sont des glycosaminoglycanes (GAG) et 5 % des glycoprotéines nommée composant-P amyloïde (ou protéine SAP). La protéine SAP est toujours présente quel que soit le type d'amylose (Benson et al., 2018a). D'autres composants, comme des protéases et des inhibiteurs de protéases, sont retrouvés de manière variable dans le DA.

2.2.1. Glycosaminoglycanes (GAG)/Protéoglycanes (PG)

Les GAG (dermatane-sulfates) et les PG (l'héparane sulfate) sont retrouvés dans tous les DA (Lindahl and Li, 2009 ; Iannuzzi et al., 2015). Les GAGs sont des polymères saccharidiques linéaires à longue chaîne présents dans de nombreux tissus du corps humain. Ils jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que la croissance et la prolifération cellulaire. Les PG sont des glycoconjugués constitués d'une protéine liée à une ou plusieurs chaînes de GAG. Les PG peuvent être transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose et s'intégrer à la MEC. Ils

peuvent aussi entrer dans la constitution de la membrane plasmique ou du glycocalyx, jouant un rôle dans les interactions cellule-matrice. Le rôle des GAGs et des PG dans le DA reste incertain. Des travaux suggèrent que les protéoglycanes (type héparane sulfate) semblent jouer un rôle dans la stabilisation, dans l'induction de la structure β plissée ou encore qu'ils pourraient servir de matrice sur laquelle se fixeraient les protéines précurseurs pour la formation et la croissance des fibrilles amyloïdes (Kisilevsky et al., 2007).

2.2.2. Composant P amyloïde (SAP)

La SAP est une protéine glycosylée plasmatique de structure pentagonale formée de 5 sous-unités globulaires, de 25 kDa chacune (Emsley et al., 1994). La SAP est une protéine de liaison de ligand dépendant du calcium liant l'ADN et la chromatine ainsi que tous les types de fibrilles amyloïdes (Pepys et al., 1997). Une étude suggère que la SAP pourrait jouer un rôle important dans la résistance à la dégradation des fibrilles amyloïdes (Pepys, 2017).

3. Historique des amyloses ATTRv

Bien que le terme "amylose" ait été introduit dans la littérature scientifique en 1838 pour décrire "un constituant amylicé des plantes", ce n'est qu'en 1842 qu'il a été utilisé pour la première fois dans la littérature médicale par Von Rokitansky (Rokitansky, 1842). Environ, un siècle plus tard, en 1952, Corino Andrade rapporte la première série de patients ATTRv, originaires du nord du Portugal, qui reste aujourd'hui la zone avec la prévalence la plus élevée. Il décrit les aspects cliniques et anatomopathologiques de cette neuropathie et reconnaît le mode de transmission autosomique dominant (Andrade, 1952). De façon intéressante, Andrade décrit cette maladie, connue depuis des générations dans la population locale sous le nom de « maladie des petits pieds », comme une forme particulière de neuropathie périphérique. Plus tard, la maladie fut identifiée au Japon (1968), en Suède (1976), puis dans d'autres pays à travers le monde (Araki et al., 1968 ; Andersson, 1976; Parman et al., 2016). La TTR était anciennement appelée pré-albumine car elle migre devant la bande d'albumine à l'électrophorèse, en raison de sa charge légèrement plus négative. Suite à l'identification de sa séquence d'aa en 1974, la

TTR a été associée pour la première fois à l'amylose par Costa et al. (Kanda et al., 1974; Costa et al., 1978). Ce n'est qu'en 1984 que Saraiva et Araki ont identifié une TTR anormale causée par une mutation (substitution de la valine en position 30 par une méthionine) chez des patients ATTRv portugais et japonais. Les principales découvertes sur l'amylose ATTRv sont présentées dans la figure 1.



Figure 1: Historique des amyloses ATTRv.

4. La transthyréline (TTR)

4.1. Structure

La structure de la TTR a été déterminée pour la première fois dans les années 70 par Blake et al. (Kanda et al., 1974). Il s'agit d'une protéine plasmatique de 55kDa qui circule sous forme de tétramère. Elle est composée de 4 monomères identiques de 127 aa liés de manière non covalente (Judge et al., 2019). Chaque monomère est formé de 8 brins de A à H. Les brins forment deux feuillettes β antiparallèles : le premier à la surface du canal (brins ADGH) et le second à la surface externe du tétramère (brins BCEF) (figure 2 A) (Sebastião et al., 2001). Les liaisons hydrogènes permettent l'association de deux monomères et les interactions atomiques contribuent à l'association des dimères (figure 2 B) (Wojtczak et al., 1996). Ces interactions jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la protéine. Le tétramère peut comporter de 1 à 4 monomères de TTR mutées. Les formes mutées représentent 65 à 75 % de la TTR extraite des DA (Benson and Kincaid, 2007). Dans ce dernier, la TTR est présente soit sous forme entière, soit sous forme de fragments issus du clivage de la protéine native aux résidus 46, 49 ou 52 (Bergström et al., 2005 ; Suhr et al., 2019).

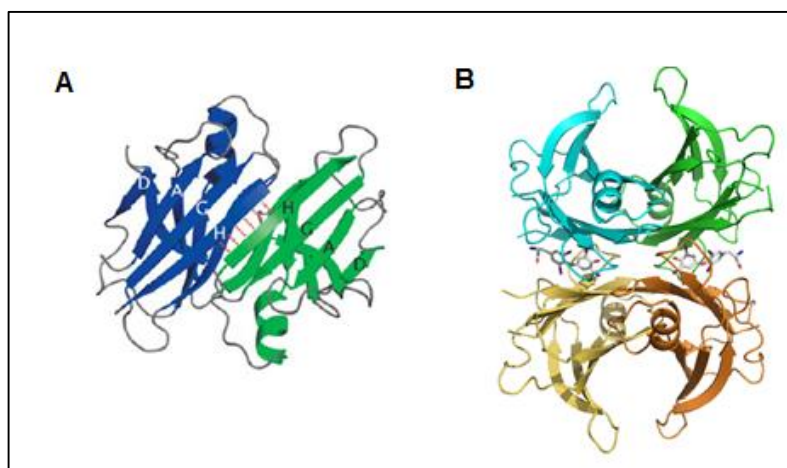


Figure 2: (A) Structure aux rayons X de la TTR. Les contacts entre les dimères forment deux poches hydrophobes. Chaque monomère contient une petite hélice α et huit brins β (CBEF et DAGH). (B) Structure du tétramère de la transthyréline humaine (TTR) en complexe avec deux molécules de thyroxines (Bezzera et al. 2020).

4.2. Fonction

Le nom de "transthyrétine" décrit ses fonctions de transport de la thyroxine 4 (T4) et de la protéine de liaison au rétinol dans le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR). La TTR contient 2 sites de liaison T4 en forme d'entonnoir, qui se situent au niveau des contacts dimère-dimère (figure 3). Seul 1 site de liaison de la TTR est occupé, car la première interaction peut diminuer l'affinité de liaison du second site. Les résidus d'aa clés dans cette cavité de liaison comprennent Glu54, Lys15, Leu17, Ala108, Thr119, Leu110 et Ser117. Les extrémités N- et C-terminales de T4 interagissent avec Glu54 et Lys15, respectivement, en formant des liaisons hydrogène (Petrassi et al., 2000). La structure cristalline du complexe TTR-T4 montre qu'il existe 3 poches de liaison aux halogènes nommées P1, P2 et P3 orchestrées de façon continue mais indépendante dans la cavité de liaison de la T4. P1, constituée de Lys15, Leu17, Thr106, Ala108, et Val121 est située à l'entrée de la cavité de liaison à la T4. P2, constituée de Lys15, Leu17, Ala109, et Leu110, est positionnée au centre de la cavité de liaison. Enfin, P3 est située dans la partie la plus interne de la cavité et est composée des aa Ala108, Leu110, Leu17, et Thr119 (Wojtczak et al., 1996).

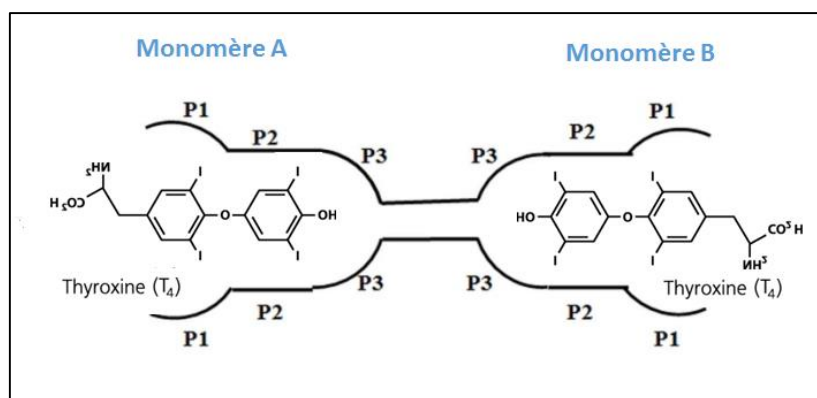


Figure 3: Deux molécules de T4 localisées sur le site de fixation de la TTR. Schéma adapté de (Guo et al., 2020).

Chez l'homme, 15 % de la T4 plasmatique est transportée par la TTR (Bezerra et al., 2020). Dans le LCR, la TTR est le principal transporteur de la T4, transportant environ 80 % de l'hormone chez l'homme. La TTR a été décrite comme essentielle pour la rétention de la T4 dans le LCR (Hu et al., 2006 ; Chen et al., 2016). Elle possède 4 sites de liaison de surface pour la protéine de liaison au rétinol (RBP). En considérant l'encombrement stérique, 2 molécules de RBP peuvent se lier.

Néanmoins, comme les niveaux de RBP dans le plasma sont inférieurs au niveau de TTR, seule 1 molécule de RBP se fixe au site de liaison (Folli et al., 2010). L'assemblage du complexe TTR-RBP est essentiel pour le transport du rétinol (ou de la vitamine A), permettant son acheminement vers les cellules (Raghu and Sivakumar, 2004). Des études *in vivo* menées sur des souris déficientes du gène TTR ont montré une diminution des niveaux de rétinol et de RBP dans le plasma, et une accumulation de RBP hépatique, par rapport aux souris de type sauvage (Wei et al., 1995 ; van Bennekum et al., 2001). Ces travaux suggèrent le rôle pivot important de la TTR qui en tant que porteur du complexe rétinol-RBP empêche sa filtration glomérulaire par le rein (van Bennekum et al., 2001 ; Gaetani et al., 2002). La TTR a été décrite comme ayant une activité protéolytique. *In vitro*, elle est capable de cliver le domaine terminal carboxyle de l'apo A-I. Elle participe également au clivage du neuropeptide Y et du peptide A β , sécrétés par les neurones (Liz et al., 2004 ; Costa et al., 2008 ; Liz et al., 2009). Un rôle neuroprotecteur de la TTR a été décrit dans des conditions d'ischémie cérébrale chez des souris déficientes pour le facteur de transcription de choc thermique HsF1. Dans ces conditions, la TTR présente dans le LCR contribue à contrôler la mort des cellules neuronales, l'œdème et l'inflammation, ce qui influence la survie des neurones menacés lors de l'ischémie (Santos et al., 2010). Des travaux plus récents indiquent que la TTR agit comme un facteur neurotrophique, par interaction avec la mégaline, en stimulant la croissance des neurites et en favorisant la neuroprotection dans les conditions ischémiques (Gomes et al., 2016, 2019).

4.3. Métabolisme

Les concentrations normales de TTR plasmatique chez l'homme varient entre 0,20 et 0,40 g/L et sa demi-vie est d'environ 2 à 3 jours (Dellière et al., 2016). La TTR est synthétisée dans le foie sous forme de monomère. Elle est assemblée et repliée dans le réticulum endoplasmique puis exportée vers l'appareil de Golgi pour ensuite être sécrétée dans la circulation (figure 4 et 5) (Poulsen et al., 2012; Niemietz et al., 2015; Buxbaum, 2018). Comme précisé précédemment, plus de 95 % de la TTR sont synthétisés par le foie, tandis que les plexus choroïdes et la rétine sont des sources accessoires (Herbert et al., 1986).

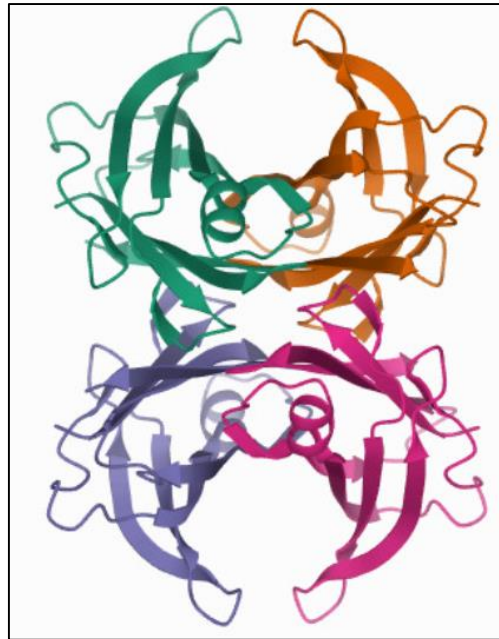


Figure 4: Tétramère de transthyréine sauvage (4 monomères).

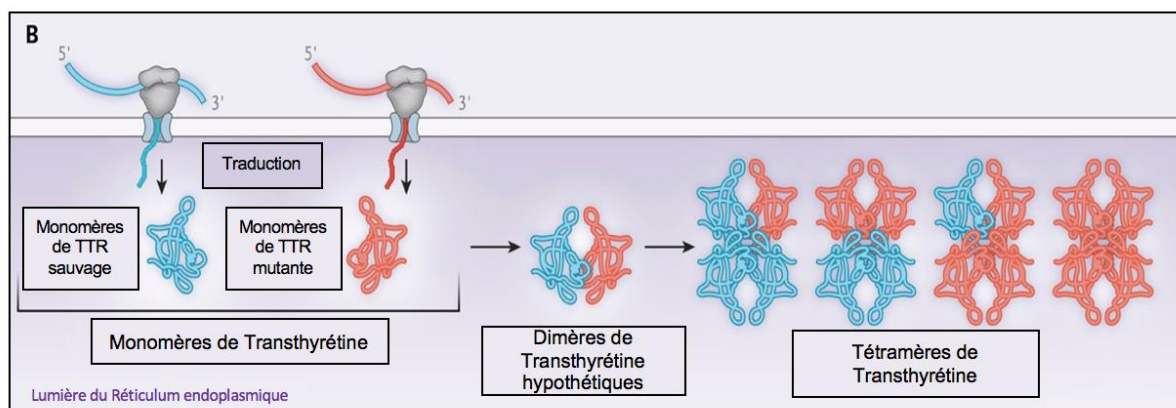


Figure 5: Synthèse et formation du tétramère de TTR (Buxbaum, 2018).

4.4. Formation des fibrilles amyloïdes

La formation des fibrilles amyloïdes fait probablement intervenir différents facteurs tels que la structure intrinsèque primaire, secondaire ou tertiaire de la TTR, son métabolisme, sa protéolyse ainsi que l'environnement biochimique tissulaire. Le mécanisme intime de formation du dépôt fibrillaire reste inconnu. Les mutations de la TTR déstabilisent le tétramère de TTR qui se dissocie en monomères. Ces monomères mal repliés vont s'agréger d'abord sous forme d'oligomères solubles non-fibrillaires, puis en protofibrilles, qui vont contribuer à la formation des DA (figure 6) (Ruberg et al., 2019 ; Schmidt et al., 2019). La déstabilisation de la TTR induit des changements de conformation conduisant à la dissociation du tétramère

et au dépliage partiel des monomères résultants. Les mutations pathogènes de TTR diminuent aussi la stabilité thermodynamique, ce qui favorise le passage à des espèces monomères mal repliées et à l'instabilité cinétique (Goyal and Mozaffar, 2015). La formation des fibrilles amyloïdes est considérée comme un processus dépendant de la nucléation, ce qui signifie que la croissance des fibrilles nécessite la formation d'une structure oligomérique à haute énergie avant que l'addition de monomères ne devienne énergétiquement favorable. En microscopie électronique, les DA sont visibles sous forme de fibrilles linéaires, non branchées, disposées en amas désordonnés. Leur longueur est variable, contrairement à leur diamètre, compris entre 7,5 et 10 nm. Comme précisé précédemment, les fibrilles sont biréfringentes en lumière polarisée et possèdent une forte affinité pour le rouge Congo. L'hypothèse d'un clivage protéolytique spécifique des résidus 48-49, situés entre les brins C et D, favoriserait la formation du DA *in vitro* (Mangione et al., 2018). Les fibrilles amyloïdes provenant de patients ATTRv sont de deux formes : une forme avec des fibrilles de TTR complète et fragmentée (au niveau C-terminal allant des résidus 46-127 à 55-127) nommée Type A et une forme composée uniquement de fibrilles de TTR complètes nommée Type B (Ihse et al., 2013). A partir d'une étude réalisée sur des patients ATTRv, une corrélation entre le type de fibrille et le phénotype a été proposée (tableau 2) (Ihse et al., 2013). Récemment, une étude a montré que la composition des fibrilles amyloïdes était la même chez des patients d'âge de début différent de la maladie (Suhr et al., 2019).

Caractéristiques	Type de fibrilles	
	A	B
Type de fibrilles	A	B
Composition	Complète + Fragment C terminale	Complète
V30M	Phénotype mixte d'apparition tardive	Phénotype neurologique d'apparition précoce
Autres variants	Majorité de TTR non-V30M	Quelques TTRV30M
Coloration au rouge Congo	Faible affinité	Haute affinité

Tableau 2: Principales caractéristiques des fibrilles amyloïdes de types A et B.

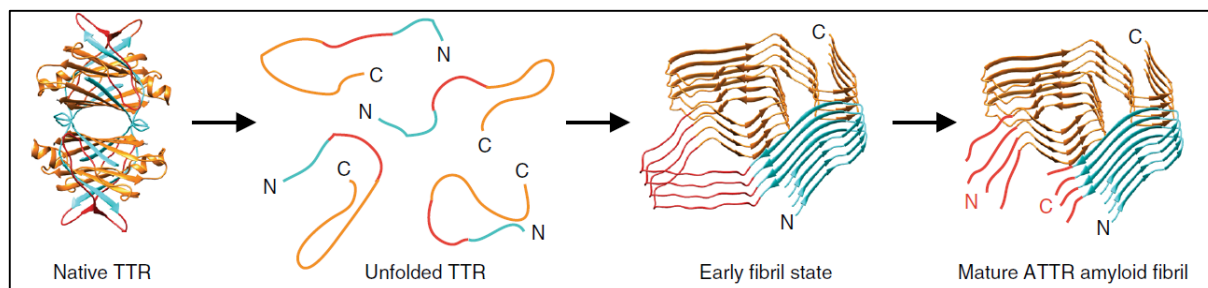


Figure 6: Mécanisme possible du repliement et de l'agrégation des protéines TTR en fibrilles amyloïdes matures (Schmidt et al., 2019).

4.5. Le gène de la TTR : structure et fonction

Le gène de la TTR est situé sur le chromosome 18 (18q11.26-12.1) et s'étend sur 7 kb. Il est composé de 4 exons, 3 introns et d'une région 5' (26-27 nucléotides) et 3' (145-148 nucléotides) non traduites. L'exon 1 code pour le peptide signal et pour les 3 premiers aa de la protéine mature (1-3). L'exon 2 pour les aa 4 à 47, l'exon 3 pour les résidus 48 à 92 et l'exon 4 pour les résidus 93 à 127. Les 3 introns, de tailles respectives 934, 2090, et 3308 paires de bases, s'intercalent entre les exons (figure 7) (Hiroyuki et al., 1985).

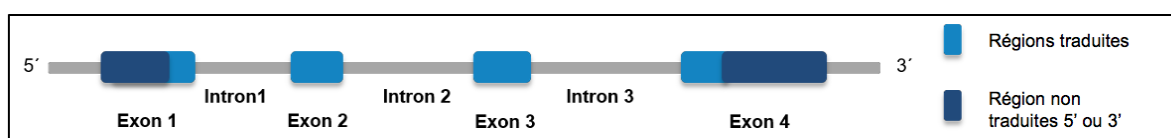


Figure 7: Structure du gène de la TTR humaine montrant les exons, les introns, ainsi que les régions traduites et non traduites.

Deux phases ouvertes de lectures indépendantes (ORF pour open reading frame), ORF1 et ORF2 sont localisées dans le 1^{er} et le 3^{ème} intron du gène (Tsuzuki et al., 1985). La région 5' UTR est composée de 26 bases et la région 3' UTR de 139 bases. Deux séquences Alu de directions opposées, impliquées dans la régulation du gène, sont situées dans les introns 2 et 3. La région 5' flanquante comporte plusieurs éléments régulateurs, à savoir une TATA box en position -24-30, suivie d'une région de 20 pb riche en nucléotide GC. Ces 2 éléments sont sensibles au récepteur des glucocorticoïdes (*glucocorticoid responsive elements* ou GRE), des facteurs nucléaires spécifiques du foie (*Hepatocyte Nuclear Factor -1, 3, 4* ou HNF)

et des facteurs de transcriptions (C/EBPs) (Sakaki Y et al., 1989 ; Wang and Burke, 2010). La région 3' contient un signal de polyadénylation situé à 123 pb en aval de la région codante (Tsuzuki et al., 1985). Trois séquences amplificatrices ont été identifiées dans les introns de la région 3' (Hiroyuki et al., 1985).

Afin d'étudier les effets de la TTR endogène sur la formation du DA, un gène TTR humain portant la mutation V30M et 6kb de la région régulatrice situé en amont du gène a été introduit chez les souris TTR $-/-$ et TTR $+/+$. Le transgène (6.0-hTTR30Met) était exprimé dans le foie, les plexus choroïdes, les reins et le sac vitellin avec des taux d'expression semblables aux gènes murins endogènes. Cette région de 6kb en amont du gène est donc suffisante pour une expression de TTR. En revanche, la région couvrant 600 pb en amont du gène était limitée au sac vitellin et au foie. Les niveaux d'expression du gène 6.0-hMet30 dans le foie et le sérum étaient environ 10 fois plus élevés que ceux du gène 0.6-hMet30 (Nagata et al., 1995). La présence d'une région d'environ 300 pb incluant le promoteur entre -1.86 à -1.96 kpb et d'un amplificateur entre -70 à -200 pb par rapport au site de la coiffe de l'ARNm permet une expression hépatocytaire quantitativement normale. En revanche, la région couvrant 3kb en amont du gène permet une expression spécifique de la TTR dans les plexus choroïdes et le foie (Yan et al., 1990). Ces résultats suggèrent que cette région contient un ou plusieurs éléments nécessaires à l'expression de la TTR dans les plexus choroïdes. Dans le modèle murin, l'expression spécifique de la TTR dans les plexus choroïdes paraît régulée par des facteurs transcriptionnels différents des facteurs transcriptionnels hépatocytaires (Costa et al., 1990 ; Yan et al., 1990).

4.6. Variants du gène TTR

➤ Variants pathogènes

Plus de 130 mutations amyloïdogènes de la TTR sont répertoriées dans la base de données www.amyloidosismutations.com qui reprend et met à jour l'ensemble des mutations identifiées dans le monde, et permet ainsi de décrire l'ensemble des polymorphismes génétiques. La base « Genome Aggregation Database » (gnomAD) collecte les données génétiques de 125.748 séquences d'exomes et 15.708 séquences du génome entier, comprend plus de 250 variants du gène TTR (y compris les régions non codantes). Toutes les mutations du gène TTR sont des

mutations faux-sens, à l'exception d'une microdélétion (Val122del) (Uemichi et al., 1997). Les mutations sont localisées uniquement dans les exons 2, 3, 4, et la microdélétion dans l'exon 4. La mutation TTRV30M est la plus fréquente en Europe. Par exemple, en suède, en 2016, la prévalence des patients ATTRV30M a été estimée à 253 cas pour 9,8 millions d'habitants, avec une moyenne de 35 nouveaux cas par an (Parman et al. 2016 ; Schmidt et al. 2018). Environ 46 % des mutations TTR sont associées à un phénotype neurologique et cardiaque, 23 % à une atteinte neurologique seule, 17 % n'affectent que le cœur, et 3 % sont associées à des phénotypes non neurologiques et cardiaques. Les 11 % restants sont des mutations non amyloïdogènes (www.amyloidosismutations.com).

La substitution TTRVal122Ile est associée à une cardiomyopathie amyloïde tardive (après 60 ans) avec une mortalité importante due à une insuffisance cardiaque. C'est la mutation la plus courante aux États-Unis et identifiée chez 4% des individus afro-américains. Ce variant a une stabilité presque équivalente à celle de la forme sauvage elle-même responsable d'un phénotype cardiaque dans les amyloses séniles (Robinson and Reixach, 2014). Il existe des phénotypes variables pour une substitution différente au sein du même codon. Par exemple, en position 30, la mutation TTRVal30Ala est associée à une polyneuropathie tandis que la substitution TTRVal30Gly est associée à des DA leptoméningés avec une expression neurologique centrale isolée (Jones et al., 1992; Petersen et al., 1997). En position 109, les substitutions TTRAla109Thr et TTRAla109Val entraînent une hyperthyroxinémie euthyroïdienne, alors que la substitution TTRAla109Ser est associée à une ATTRv (Date et al., 1997; Saraiva, 2001). Certaines substitutions sont associées à des formes cliniques spécifiques. Par exemple, le variant TTRLeu55Pro est lié à des formes précoces et particulièrement agressives, avec atteinte cardiaque et vitrénne (Jacobson et al., 1992; Yamamoto et al., 1994). Des mutations du gène TTR responsables de DA leptoméningés à l'origine de manifestations du SNC (démence, accidents vasculaires ischémiques ou hémorragiques) ont également été décrits (tableau 3).

Mutation TTR (Nouvelle nomenclature)	Modification du Codon	Localisation	Références
Leu12Pro (p.Leu32Pro)	CTG>CCG	Exon 2	(Brett et al., 1999)
Asp18Gly (p.Asp38Gly)	GAT>GGT	Exon 2	(Vidal, 1996)
Val30Gly (p.Val50Gly)	GTG>GGG	Exon 2	(Petersen et al., 1997)
Val30Met (p.Val50Met)	GTG>ATG	Exon 2	(Saraiva et al., 1984)
Thr49Pro (p.Thr69Pro)	ACC>CCC	Exon 3	(Nakagawa et al., 2008)
Gly53Arg (p.Gly73Arg)	GGA>AGA	Exon 3	(Liepnieks et al., 2011)
Gly53Glu (p.Gly73Glu)	GGA>GAA	Exon 3	(Ellie et al., 2001)
Gly53Ala (p.Gly73Ala)	GGA>GCA	Exon 3	(Douglass et al., 2007)
Leu55Arg (p.Leu75Arg)	CTG>CGG	Exon 3	(Long et al., 2012)
Phe64Ser (p.Phe84Ser)	TTT>TCT	Exon 3	(Uemichi et al., 1999)
Ile84Ser (p.Ile104Ser)	ATC>AGC	Exon 3	(Dwulet and Benson, 1986)

Tableau 3: Variants TTR associés à des dépôts amyloïdes leptoméningés.

➤ Variants non pathogènes

D'autres variants n'entraînent pas d'amyloïdogenèse. Ils peuvent être associés soit à une hyperthyroxinémie euthyroïdienne comme les substitutions en position 109 (TTRAla109Thr et TTRAla109Val). Ils peuvent aussi n'entraîner aucune pathologie connue, comme la Gly6Ser. Sur des études à grande échelle, la fréquence de la Gly6Ser à l'état hétérozygote est retrouvé chez environ 12 % des caucasiens (Bergen, 2004).

Mutation TTR (Nouvelle nomenclature)	Modification du Codon	Localisation	Références
Gly6Ser (p.Gly26Ser)	GGT>AGT	Exon 2	(Jacobson and Buxbaum, 1994)
Met13Ile (p.Met33Ile)	ATG>ATC	Exon 2	(Altland et al., 1999)
Asp74His (p.Asp94His)	GAC>CAC	Exon 3	(Uemichi et al., 1994)
His90Asn (p.His110Asn)	CAT>AAT	Exon 3	(Skare et al., 1994)
Gly101Ser (p.Gly121Ser)	GGC>AGC	Exon 4	(Kishikawa et al., 1998)
Pro102Arg (p.Pro122Arg)	CCC>CGC	Exon 3	(do Rosário Almeda et al., 1991)
Arg104Cys (p.Arg124Cys)	CGC>TGC	Exon 4	(Saraiva et al., 1999)
Arg104His (p.Arg124His)	CGC>CAC	Exon 4	(Terazaki et al., 1999)
Ala108Ala (p.Ala128Ala)	GCC>GCT	Exon 4	(Palha et al., 1997)
Ala109Thr (p.Ala129Thr)	GCC>ACC	Exon 4	(Moses et al., 1990)
Ala109Val (p.Ala129Val)	GCC>GTC	Exon 4	(Izumoto and Herbert, 1993)
Thr119Met (p.Thr139Met)	ACG>ATG	Exon 4	(Harrison et al., 1991)
Pro125Ser (p.Pro145Ser)	CCC>TCC	Exon 4	(Ferlini et al., 1996)

Tableau 4: Variants TTR non amyloïdogènes.

➤ Variants doubles ou composites

Des polymorphismes peuvent être identifiés chez les porteurs d'une mutation pathogène (hétérozygotes doubles) (tableau 4). Prenons pour exemple la mutation

TTRV30M. Les patients hétérozygotes doubles TTRArg104His/V30M et Thr119Met/V30M présentaient une maladie moins sévère ou plus tardive que les patients ATTRV30M seul, suggérant un effet protecteur de ces variants sur le pouvoir pathogène de la TTRV30M (Alves et al., 1996 ; Coelho et al., 1996; Terazaki et al., 1999). Ces substitutions semblent stabiliser le tétramère TTR et confèrent ainsi une plus grande résistance à la formation de DA (Hammarstrom, 2001 ; Matsumoto et al., 2017).

Hétérozygotes composés	Phénotype associés	Références
Gly6Ser/Val30Met	Phénotype identique à la mutation V30M hétérozygote	(Alves et al., 1996)
Gly6Ser Phe33Ile	Polyneuropathie	(Jacobson and Buxbaum, 1994)
Gly6Ser/Ser77Phe	Neuropathie/cardiopathie	(Plante-Bordeneuve et al., 1998)
Gly6Ser/Tyr114Cys	Neuropathie, opacité vitréenne, œdème des membres inférieurs	(Connors et al., 1998; Ueno et al., 1990)
Gly6Ser/Val122Ala	Cardiopathie	(Théberge et al., 1999)
His90Asn/Val30Met	Phénotype identique à la mutation V30M hétérozygote	(Saraiva et al., 1991)
His90Asn Glu42Gly	Neuropathie, opacité vitréenne, cardiomyopathie	(Skare et al., 1994)
His90Asn/Thr119Met	Asymptomatique	(Alves et al., 1993)
Arg104His/Val30Met	Neuropathie, glaucome, anomalie pupillaire	(Terazaki et al., 1999)
Thr119Met/Val30Met	Asymptomatique	(Alves et al., 1997)
Thr59Lys/Arg104His	Neuropathie/cardiopathie	(Lim et al., 2002)
Val30Met/ Lys80Arg	Neuropathie/cardiopathie	(Matsumoto et al., 2017)
Val30Met/Val122Ile	Neuropathie, cardiopathie, néphropathie	(Da Silva-Batista et al., 2020)

Tableau 5: Hétérozygotes doubles identifiés dans les familles ATTRv.

➤ Mutations homozygotes

Plusieurs cas d'homozygotie ont été rapportés. Des individus homozygotes pour les mutations TTRV30M ont été identifiés dans des familles Suédoises, Portugaises et Turques. Leur tableau clinique est de sévérité comparable aux individus hétérozygotes (Holmgren, 2005). Certains patients homozygotes ATTRV30M suédois ne présentaient qu'une atteinte vitréenne isolée (Holmgren et al., 1988 ; Sandgren, 1990 ; Skare et al., 1990). Seul un cas homozygote ATTRV30M avec une maladie extrêmement précoce et sévère que les hétérozygotes a été rapporté (Tojo et al., 2008). Les autres cas d'homozygotie décrits sont essentiellement des sujets porteurs de la mutation TTRVal122Ile. Ces patients développent des

symptômes en moyenne 10 ans plus tôt que les hétérozygotes et présentent une évolution plus agressive de la maladie (Reddi et al., 2014). D'autres cas pour les variants TTRLeu58His, TTRPhe64Leu et TTRlle68Leu ont été décrits au Royaume-Uni et en Italie (Ferlini et al., 1996 ; Perfetto et al., 2011).

5. Les amyloses héréditaires à transthyrétine (ATTRv)

5.1. Présentation clinique

Si le mécanisme de l'amyloïdogénèse est mieux compris, le tropisme des DA pour certains tissus et les facteurs de variabilités phénotypique restent inexpliqués. La présentation clinique associe des manifestations neurologiques périphériques, cardiologiques, rénales ou ophtalmologiques. Exceptionnellement, des signes d'atteintes du SNC peuvent survenir (figure 8) (Conceição et al., 2016).

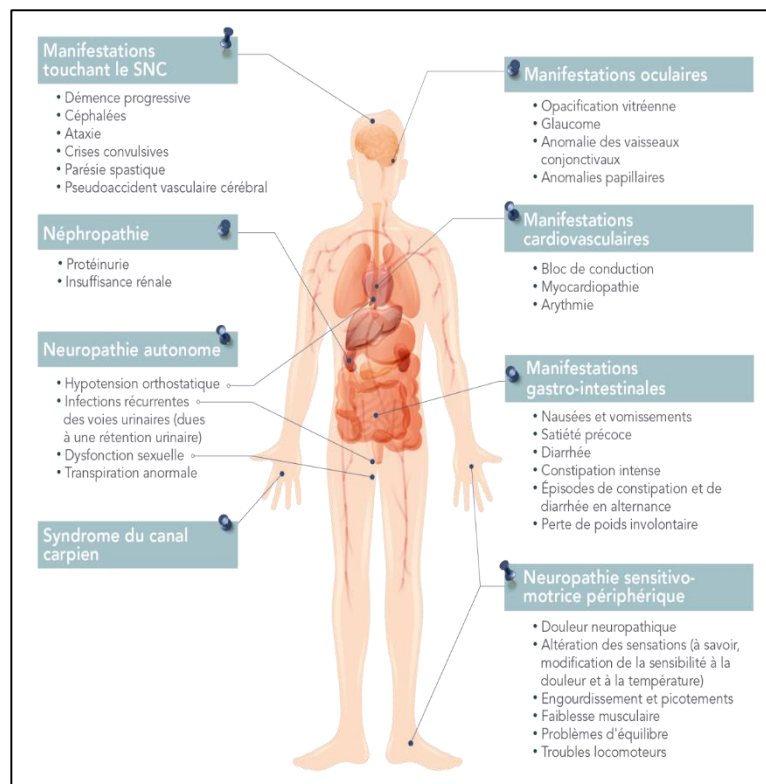


Figure 8: Ensemble des signes et symptômes possibles de l'amylose héréditaire à transthyrétine. Adapté d'après Conceição I, et al. 2016.

Dans cette partie, nous ne détaillerons que les principales atteintes cliniques des ATTRv.

5.1.1. Manifestations neurologiques

L'ATTRv est une neuropathie périphérique axonale qui débute par une atteinte des petites fibres nerveuses, c'est-à-dire une atteinte de la sensibilité thermo-algique et/ou une dysautonomie. La neuropathie est longueur-dépendante. Elle commence aux extrémités des membres inférieurs et remonte progressivement à la racine des membres inférieurs, puis aux membres supérieurs selon une évolution centripète (figure 9). L'atteinte motrice survient dans un second temps et progresse de la même façon (Planté-Bordeneuve and Said, 2011). A un stade avancé, le tableau est celui d'un déficit sensitivo-moteur des 4 membres diffus ou d'une tétraparésie périphérique. Après une dizaine d'années, la sévérité de l'atteinte nerveuse périphérique est responsable d'un état grabataire (figure 10) (Coutinho P et al., 1980). Le DA atteint également le système nerveux autonome (SNA) responsable d'une neuropathie dysautonomique qui évolue parallèlement au déficit sensitivo-moteur. Ce sont les fibres amyéliniques qui sont touchées à un stade précoce de la maladie. Pour rappel, le SNA comporte les systèmes sympathiques et parasympathiques responsable de l'innervation des principaux organes (circulation sanguine, pression artérielle, digestion...) (figure 11) (Kolb et al., 2019). Les symptômes souvent retrouvés sont les troubles digestifs (alternance diarrhée constipation, nausées, satiété précoce), les troubles génitaux (dysfonction sexuelle ...) les troubles urinaires (incontinence ou rétention) les troubles du rythme cardiaque (palpitations...) et une dysrégulation de la tension artérielle avec une hypotension orthostatique (figure 8).

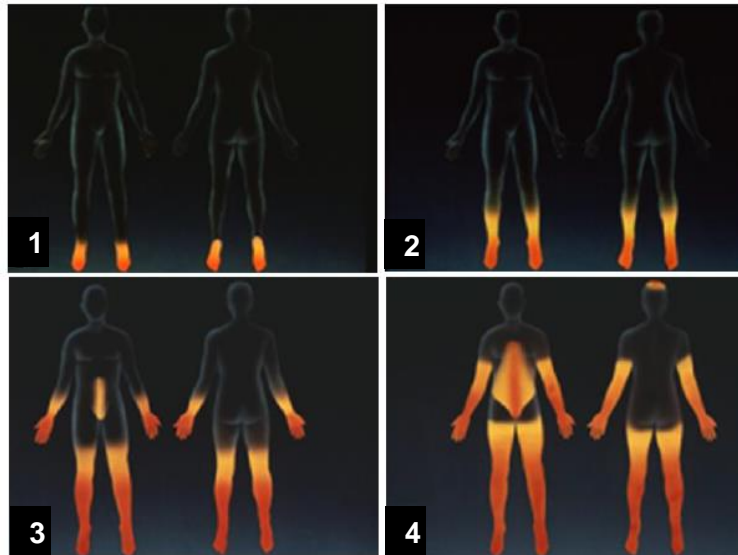


Figure 9: Evolution des troubles sensitifs thermoalgiques dans les ATTRv selon un mode longueur dépendant.

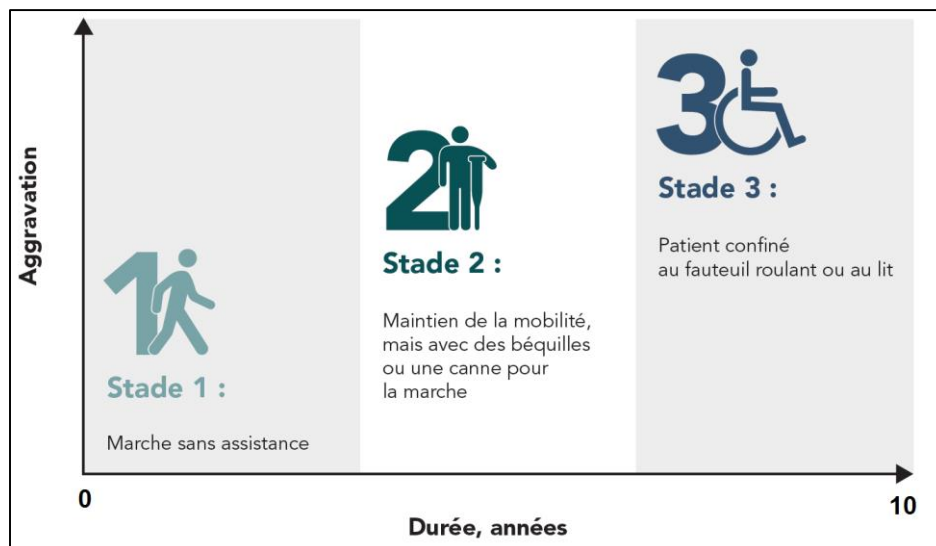


Figure 10: Progression des symptômes de l'ATTRv sur 10 ans suivant le début de l'affection (Adapté de <https://attrvoirplusclair.fr/nos-actions/>).

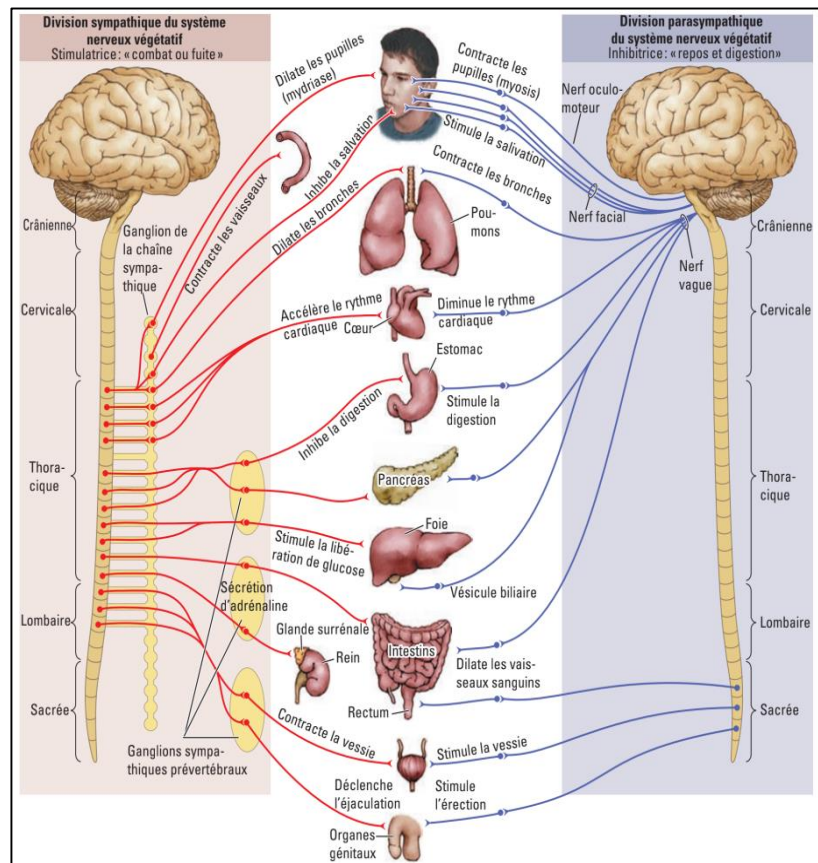


Figure 11: Le système nerveux autonome. A gauche, le système sympathique et à droite le système parasympathique, qui assurent des effets opposés au niveau de chacun des organes qu'ils innervent parfois en commun (Kolb et al., 2019).

Quel que soit le tissu affecté, l'amylose se caractérise toujours par des dépôts extracellulaires de taille variable. Ces DA de TTR sont à l'origine des lésions organiques. Le tropisme de ces dépôts pour le SNP reste mal compris. D'un point de vue histologique, les DA prédominent habituellement dans l'endonèvre autour des capillaires endoneuraux qu'ils peuvent déformer, voire occlure (figure 12).

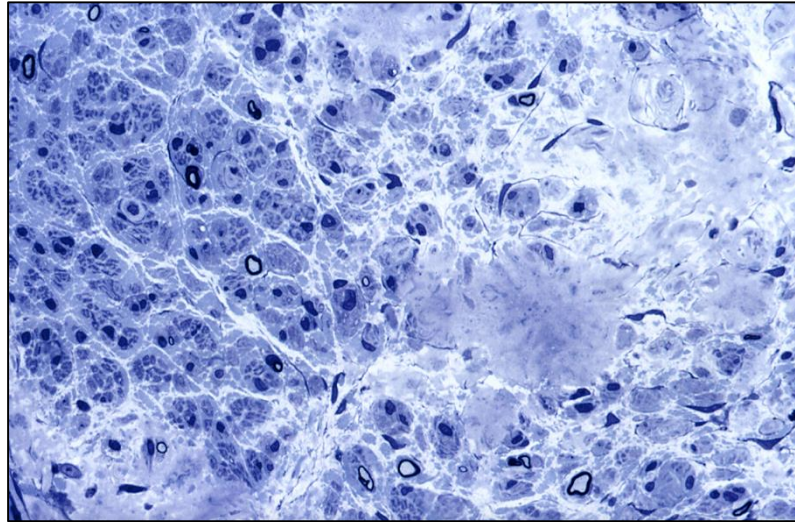


Figure 12: Coupe semi-fine (1 μ d'épaisseur) du nerf saphène externe d'un patient atteint d'une amylose ATTRVal30Met. On notera la raréfaction importante des fibres myéliniques et la présence de dépôts de la substance amyloïde dans l'endonèvre (Bleu de Thionine).

5.1.2. Manifestations extra-neurologiques

L'atteinte cardiaque

L'infiltration progressive du DA dans le myocarde et le tissu de conduction cardiaque engendre des troubles du rythme et/ou de la conduction (auriculo-ventriculaire ou intra-ventriculaire) et une cardiopathie hypertrophique. Les principales manifestations sont des lipothymies, des syncopes et des signes d'insuffisance cardiaque progressive (voir figure 8) (Hörnsten et al., 2010 ; Kristen, 2020).

L'atteinte rénale

Elle touche environ 30 % des patients. L'atteinte glomérulaire est la plus fréquente responsable d'une insuffisance rénale progressive avec ou sans protéinurie (Lobato and Rocha, 2012).

L'atteinte oculaire

Les manifestations ophtalmologiques sont plus rares environ 10 % des patients probablement en raison de la synthèse de TTR dans l'épithélium rétinien (figure 13) (Benson and Kincaid, 2007 ; Buxbaum et al., 2019). Les principales atteintes oculaires sont résumées dans la figure 8.

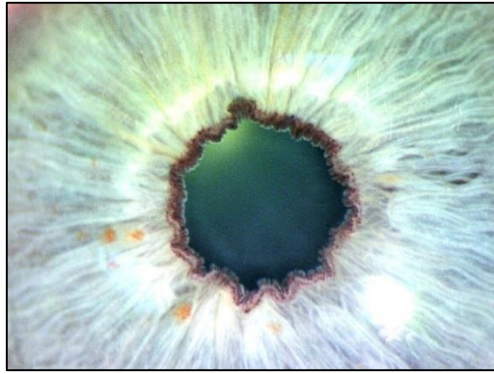


Figure 13: Déformation de la pupille chez un patient ATTRV30M (Benson and Kincaid, 2007).

5.1.3. Formes cliniques et corrélations phéno-génotypique

L'ATTRv se présente le plus souvent comme un phénotype mixte (neurologique et cardiaque). Cependant, quelques mutations sont associées à une expression clinique spécifique. Par exemple, les mutations (telles que TTRVal122Ile et TTRLeu111Met) sont associées à un phénotype cardiaque, tandis que d'autres (telles que TTRSer50Arg et TTRAla97Ser) sont associées à un phénotype neurologique (figure 14) (Yang et al., 2010 ; González-Duarte et al., 2012 ; Maurer et al., 2016). Les formes cardiaques sont principalement d'expression tardive. Des formes très agressives de la maladie sont décrites chez les patients porteurs de substitutions TTR au codon 54 ou 55 (Glu54Lys, Leu55Pro) (Benson and Kincaid, 2007). L'implication d'autres organes en association avec des mutations spécifiques reste floues. L'atteinte rénale, qui se manifeste par un syndrome néphrotique et/ou une insuffisance rénale progressive, a été décrite principalement chez les patients hétérozygotes présentant la mutation TTRV30M, notamment dans un sous-groupe de patients portugais (Lobato and Rocha, 2012).

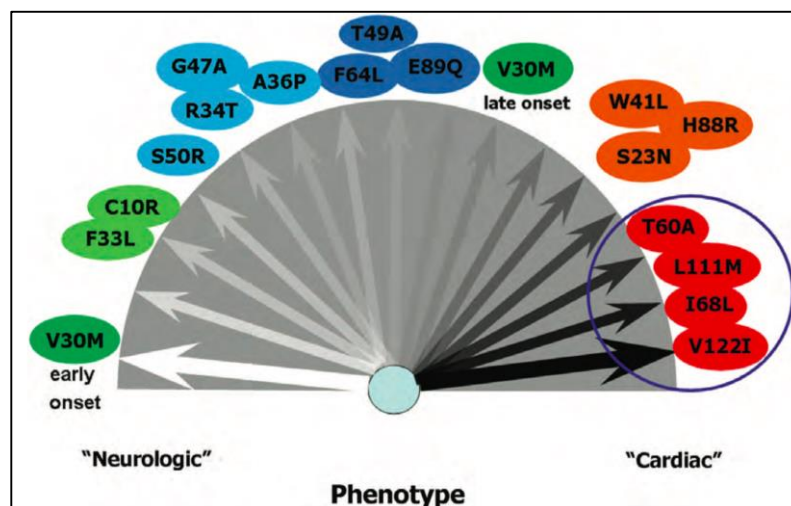


Figure 14: Spectre des corrélations génotype-phénotype dans les ATTRv. L'expression phénotypique varie considérablement, allant d'une atteinte presque exclusivement neurologique à une atteinte prédominante ou exclusivement cardiaque. Entre les deux, plusieurs mutations sont associées à un phénotype mixte (neurologique et cardiaque) (Rapezzi et al. 2013).

Pour la mutation TTRV30M, la plus fréquente en Europe on distingue 2 formes ; la forme précoce (< 50 ans) et la forme tardive (> 50 ans). Pour la forme précoce, il s'agit le plus souvent d'un sujet d'une trentaine d'années d'origine portugaise avec une histoire familiale. Le tableau clinique est celui d'une polyneuropathie axonale distale d'évolution lente avec dysautonomie. À l'inverse, dans les formes tardives, les antécédents familiaux sont souvent absents ou inconnus. Le tableau clinique est celui d'une atteinte sensitivo-motrice plus rapide, peu de troubles dysautonomiques et dans certains cas l'atteinte cardiaque est au premier plan.

5.1.4. Evolution - Survie

L'histoire naturelle se caractérise par l'aggravation progressive de la neuropathie et des autres atteintes extra neurologique. La survie moyenne varie selon l'âge de début. Les patients à âge de début précoce ATTRV30M des régions endémiques présentent une survie d'environ 10 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes (Ando et al., 2013). En revanche, les patients avec un âge de début tardif ATTRV30M et ATTR non-V30M sont associés à une survie médiane d'environ 7 ans (Yang et al., 2010 ; Koike et al., 2012 ; Mariani et al., 2015). Notons, que la mutation TTRVal107Ile est de très mauvais pronostic avec une médiane de survie limitée à 6,8 ans (Mariani et al., 2015). Le pronostic est, de loin, moins bon pour les phénotypes exclusivement cardiaques, avec une espérance de vie de

l'ordre de 2 à 5 ans après l'apparition de la maladie (Ruberg et al., 2012 ; Gillmore et al., 2018).

5.2. Diagnostic

La présentation clinique des neuropathies amyloïdes est très hétérogène et peut être trompeuse (voir figure 8). D'ailleurs, le nombre d'erreurs diagnostiques est important et entraîne un retard diagnostique de 3 à 4 ans (Plante-Bordeneuve, 2007). Devant un tableau clinique compatible, la démarche diagnostique sera initiée par la démonstration du DA avec des biopsies non invasives (glandes salivaires accessoires, peau, graisse sous-cutanée abdominale ...). Par ailleurs, la scintigraphie myocardique est devenue un outil diagnostique non invasif équivalent à la biopsie. Elle permet de mettre en évidence une hyperfixation cardiaque très spécifique de l'amylose ATTR (Gillmore et al., 2016). En parallèle, le séquençage du gène TTR est réalisé pour confirmer le diagnostic (figure 15). L'analyse protéomique pourra jouer un rôle important pour le typage de la protéine causale devant une situation de diagnostic difficile (spectrométrie de masse). Les premiers signes de la maladie restent néanmoins difficiles à détecter en raison des manifestations cliniques très hétérogènes. Il n'existe pas de biomarqueur fiable de la neuropathie décrit à ce jour.

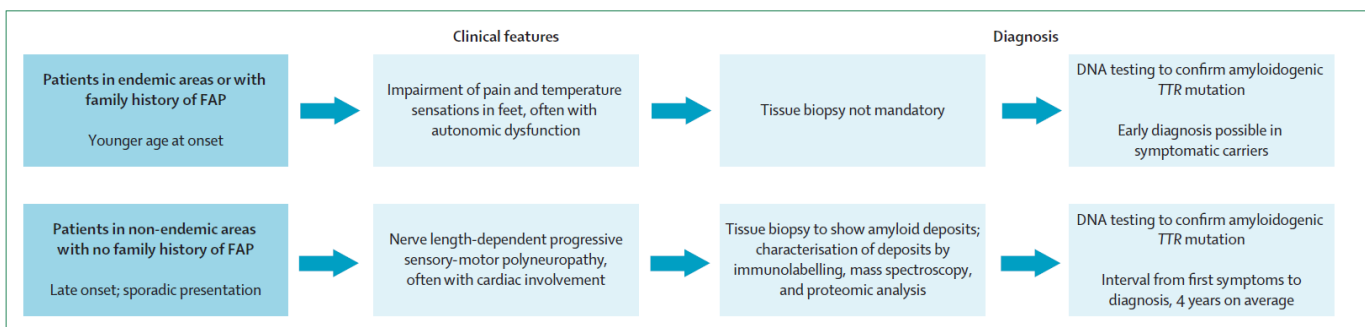


Figure 15: Diagnostic des amyloses ATTRv (Planté-Bordeneuve and Said, 2011).

6. Modèles animaux

Différents modèles de souris transgéniques TTRV30M ont été construits. Dans les lignées de souris transgéniques, la protéine TTRV30M se dépose sous forme

d'agrégat ou fibrilles dans plusieurs tissus (Sousa et al., 2002). La différence remarquable avec l'affection humaine est l'absence de dépôts dans le SNP. Cependant, ces modèles aident à mieux comprendre le processus amyloïdogène. Pour reproduire et étudier l'expression tissulaire spécifique du gène TTR, Santos et al. ont généré une lignée transgénique TTRV30M humaine déficiente pour le gène Hsf1 (TTRV30M/Hsf1⁻). Hsf1 est connu pour contrôler l'expression des protéines de chocs thermiques produites par les cellules en réponse à une exposition au stress. L'absence d'expression de Hsf1 mène à la présence de TTR non fibrillaire dans le nerf sciatique et le système nerveux autonome des souris (Santos et al., 2010). La présence d'agrégats de TTR a aussi été observée dans le nerf sciatique des souris porteuses des gènes TTR et RBP4 humains (Li et al., 2018). Des lignées de souris « knock out » (TTR^{-/-}) obtenues par recombinaisons homologues présentent des taux plasmatiques faibles de T4 et de RBP avec un phénotype et une durée de vie normale (Episkopou et al., 1993). Ce qui suggère que la TTR ne semble pas affecter la survie chez la souris. Enfin, aucune différence n'a été observée dans la survenue, la progression et la distribution tissulaire de TTR entre des souris transgéniques TTR^{-/+} (hétérozygote) et TTR^{-/-} (homozygote) (Kohno et al., 1997). Ces résultats sont en accord avec les observations des patients hétérozygotes et homozygotes ATTRv (Holmgren et al., 1992 ; Connors et al., 2009). Aucun des modèles animaux n'a, à ce jour, développé de neuropathie périphérique et ne fait l'objet d'étude plus approfondies.

7. Prise en charge des patients et familles ATTRv

Le traitement des ATTRv comporte plusieurs aspects incluant la prise en charge symptomatique, les traitements à visée étiologique et le conseil génétique.

7.1. Conseil génétique (CG) et diagnostic pré symptomatique

Le CG est encadré par les lois de bioéthique n° 94-653 du 29 juillet 1994 relatives au respect du corps humain et n° 2002-303 du 4 mars 2002 relatives aux droits des malades et à la qualité du système de santé. Il s'agit d'une consultation pluridisciplinaire qui regroupe un médecin spécialiste de la maladie, un conseiller en génétique et un psychologue. Le test génétique moléculaire offre la possibilité d'un diagnostic prédictif présymptomatique.

L'information des sujets à risque est importante, car elle contribue à réduire le délai diagnostique.

En pratique, le CG se déroule en plusieurs étapes. En premier lieu, le médecin et le conseiller en génétique, rassemblent les données existantes sur la maladie dans la famille (dossier médical, résultats d'examens, histoire familiale...). Lors d'une première consultation, les informations sur la transmission génétique, les principales manifestations, l'évolution de la maladie et les thérapies disponibles sont explicitées. À l'issue de cette consultation, un délai de réflexion est requis pour une orientation éventuelle vers une démarche de diagnostic présymptomatique. Un premier contact avec un psychologue est également proposé. Cet entretien a pour but de permettre à la personne d'exposer ses interrogations et ses inquiétudes liées au test génétique, de l'aider à réfléchir à l'impact de ce résultat dans sa vie future. À tout moment, la personne est libre de renoncer à sa démarche. Un second entretien est programmé avec le psychologue, le médecin et le conseiller en génétique. Cette étape permet de reprendre les points précédents, de répondre aux nouvelles interrogations et d'effectuer le prélèvement sanguin pour l'analyse génétique après recueil du consentement écrit. Le prélèvement d'ADN peut se faire sur différents tissus (cheveux, salive...). Dans notre centre, ce dernier est réalisé à partir du sang. En pratique, le prélèvement sanguin est divisé en deux échantillons, afin de réaliser deux extractions d'ADN. Ces échantillons seront manipulés et analysés de manière indépendante.

Lorsque le résultat est disponible dans un délai variant de 6 semaines à 3 mois, un troisième rendez-vous est proposé pour le rendu du résultat. Le sujet est informé qu'il peut interrompre sa démarche à tout moment. Le sujet peut également demander la destruction de son prélèvement.

Le résultat de l'analyse génétique est communiqué par le médecin lors d'une consultation. Le médecin explicite le résultat et ses conséquences pour le sujet ainsi que pour sa famille. Si la personne est porteuse de la mutation pathogène, un suivi médical est proposé. Ce dernier est adapté en fonction

de l'âge du porteur, des données familiales, de l'origine géographique. Un entretien avec psychologue est proposé au moment du rendu du résultat et dans certains cas, un suivi psychologique est initié.

Les modalités d'information de la parentèle devenues obligatoires sont également abordées lors du CG (décret n° 2013-527 du 20 juin 2013). Si une mutation pathogène est identifiée, le médecin avertit le sujet de l'importance d'informer ses apparentés susceptibles d'être porteurs. Dans ce cas, le sujet informe directement sa famille ou autorise le médecin à leur transmettre l'information anonymement.

D'autres approches prédictives comme un diagnostic prénatal ou pré-implantatoire sont discutés au cas par cas et proposés dans des contextes de familles à début précoce. Dans notre centre, la période moyenne durant laquelle se déroule cette démarche est de l'ordre de six mois. Le protocole complet utilisé est décrit dans la figure 16.

Les données sur la prise en charge des porteurs asymptomatiques sont rares (Obici et al., 2016 ; Schmidt et al., 2016 ; Conceição et al., 2019 ; Dohrn et al., 2020 ; Ueda et al., 2020). Dans ce contexte, il est important d'estimer plus précisément le risque de maladie à différents âges pour adapter la surveillance des sujets à risques afin de détecter les premières manifestations de la maladie pour initier un traitement au stade le plus précoce.

**PROTOCOLE DU TEST PRESYMPTOMATIQUE
DE PREDISPOSITION HEREDITAIRE A LA NEUROPATHIE
AMYLOIDE FAMILIALE**

ORGANISATION ET FONCTIONNEMENT DE L'EQUIPE PLURIDISCIPLINAIRE

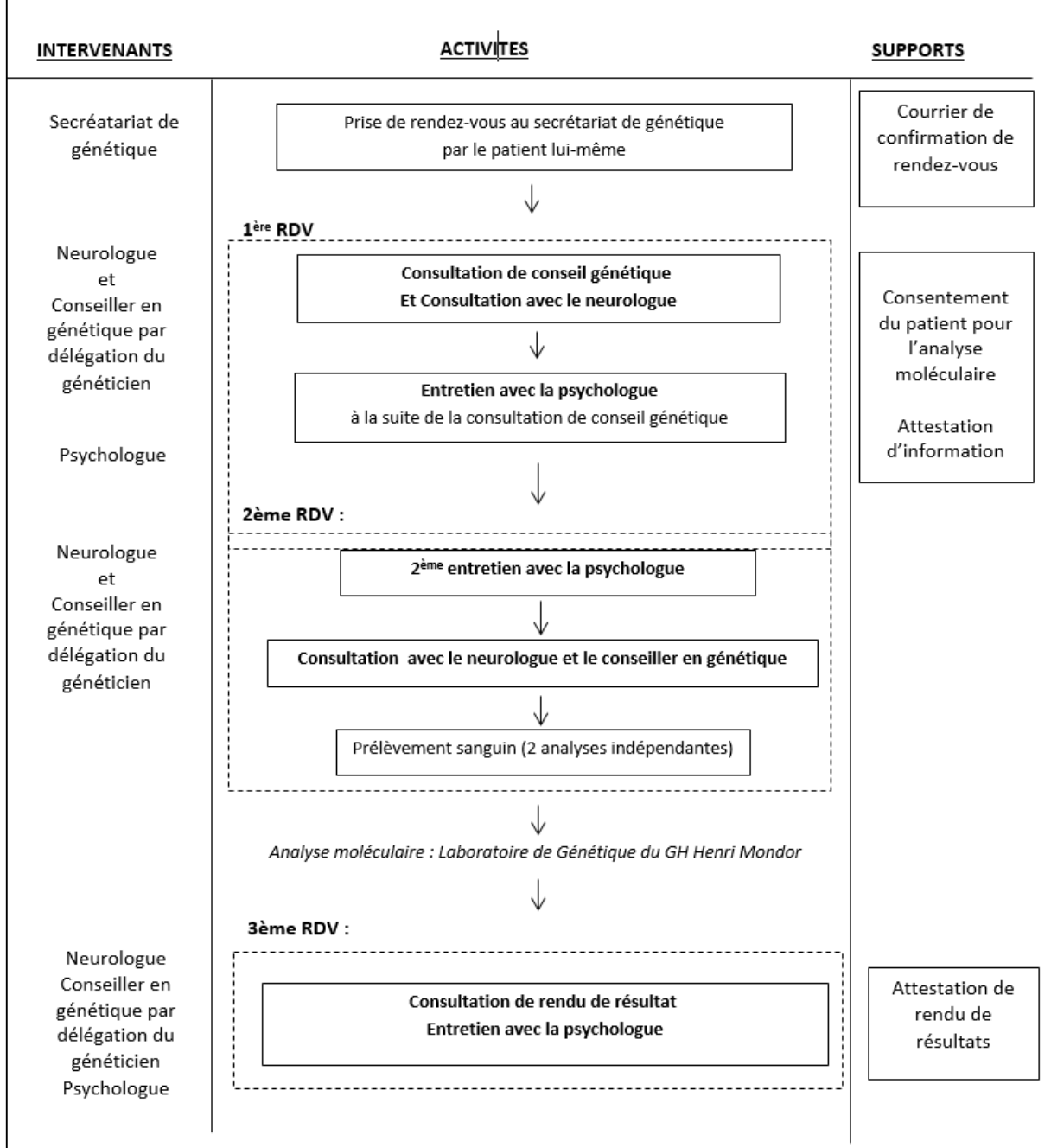


Figure 16: Déroulement du diagnostic présymptomatique dans notre centre (CHU Henri Mondor).

7.2. Traitements des ATTRv avec polyneuropathies

La prise en charge des patients ATTRv est complexe et requiert une approche multidisciplinaire. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont disponibles ou en cours de développement. Celles-ci visent à : (i) l'élimination de la source de TTR, TTRm (ii) la stabilisation de la TTR ou (iii) la réduction des DA (figure 17). Depuis 30 ans, ces avancées thérapeutiques ont permis une amélioration significative de la prise en charge ainsi que de l'histoire naturelle de la maladie (figure 18).

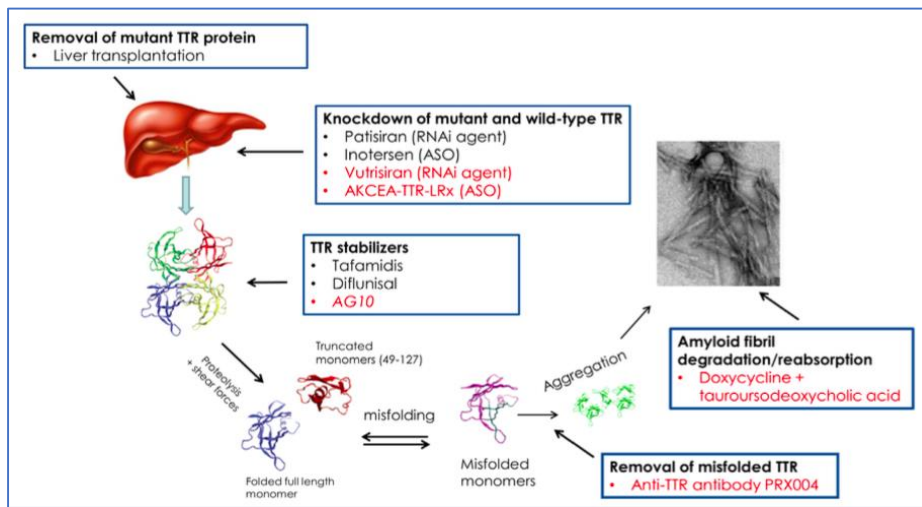


Figure 17: Stratégies thérapeutiques actuelles et expérimentales pour l'amylose ATTRv. Les interventions thérapeutiques ciblent différentes étapes du processus de formation du DA. Les approches faisant actuellement l'objet d'une étude clinique sont représentées en rouge (Obici et Adams, 2020)

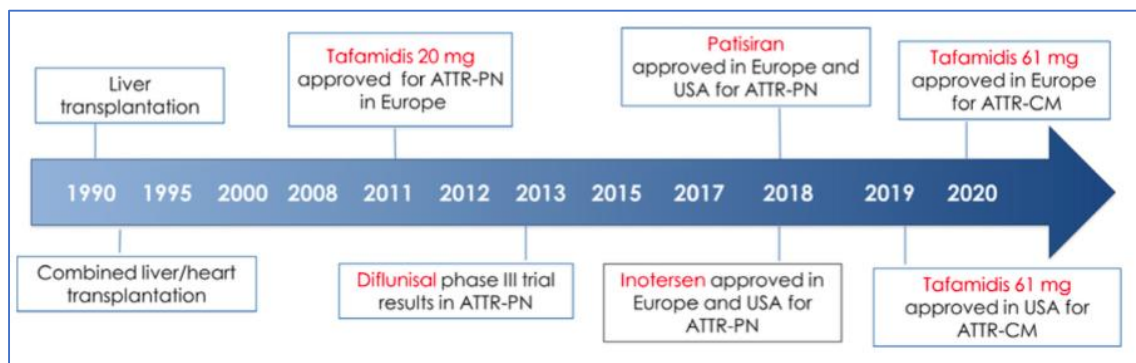


Figure 18: Approches thérapeutiques dans les ATTRv (Obici and Adams, 2020).

7.2.1. La transplantation hépatique (TH)

La TH pratiquée à partir de 1990 a pour objectif de supprimer la principale source de TTRm pour prévenir la formation de nouveaux DA (Holmgren et al., 1991). Plus de 2000 patients ont été transplantés pour cette indication (www.fapwtr.org). Une analyse rétrospective des données du registre international des TH dans les ATTR « Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry » a défini des critères d'éligibilité basés sur la mutation, l'âge de début des symptômes, la durée de la maladie et l'état nutritionnel du patient. Une analyse rétrospective portant sur 1940 patients a montré que la TH augmentait la survie, en particulier chez les patients ATTRV30M de stade précoce (< 50 ans), avec une survie à 15 ans proche de 80 %. En revanche, la survie à 10 ans est inférieure à 50 % chez les patients ATTR non-V30M et chez les patients ATTRV30M plus âgés (figure 19) (Ericzon et al., 2015). Ainsi, un âge de début inférieur à 50 ans, une TH précoce et être porteur du variant TTRV30M sont les meilleurs facteurs prédictifs de survie. Néanmoins, une aggravation de la neuropathie et/ou de la cardiomyopathie résultant du dépôt de TTRwt peut survenir après la TH, en particulier pour les patients à début tardif (après 50 ans) ou les porteurs de mutation TTR non-V30M (Liepnieks et al., 2010 ; Koike et al., 2012).

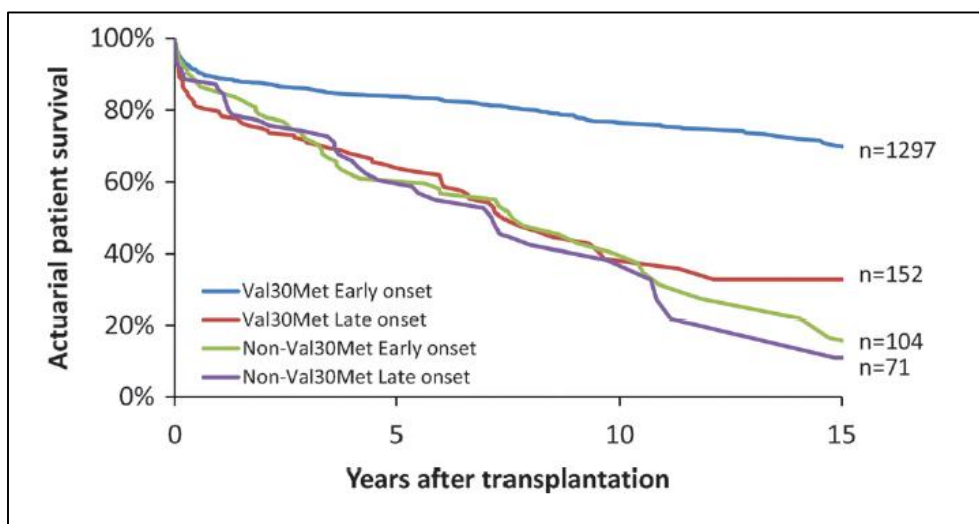


Figure 19: Survie globale de patients ATTRV30M et ATTR non-V30M (Ericzon et al., 2015).

7.2.2. Les stabilisateurs de la transthyréine

Leur principe est d'augmenter la stabilité cinétique des tétramères de TTR limitant leur dissociation en monomères et la formation du DA. Ces stabilisateurs sont de petites molécules ayant une affinité pour les sites de liaison de la thyroxine. Plusieurs stabilisateurs sont disponibles ou en cours de développement (tableau 6).

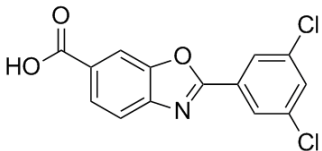
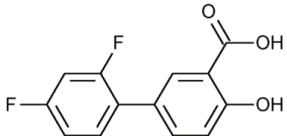
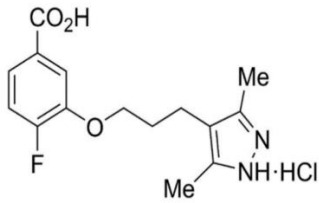
Stabilisateur de la transthyréine	Nomenclature UICPA	Références
<p>TAFAMIDIS</p> 	Acide 2-(3,5-dichlorophényl)-1,3-benzoxazole-6-carboxylique	(Bulawa et al., 2012)
<p>DIFLUNISAL</p> 	Acide 5-(2,4-difluorophényl)-2-hydroxybenzoïque	(Adamski-Werner et al., 2004)
<p>AG10</p> 	3[3-(3,5-diméthyl-1H-pyrazol-4-yl)propoxy]-4-fluorobenzoic acid	(Penchala et al., 2013)

Tableau 6: Les interactions des stabilisateurs avec le tétramère de TTR.

Le Tafamidis (Vyndaqel®)

Le tafamidis est une molécule dont la structure est dérivée d'un anti-inflammatoire (Bulawa et al., 2012). Un essai de phase II/III, mené sur des patients ATTRV30M avec atteinte neurologique précoce a montré après 18 mois de traitement une stabilité ou un ralentissement de l'évolution de la neuropathie chez 60 % des patients dans le groupe traité versus 38 % dans le groupe placebo, selon le score de déficience neuropathique des membres inférieurs, NIS-LL (Neuropathy Impairment Score in the Lower Limbs) (Coelho et al., 2012). Sur la base de cet essai, en 2011, le tafamidis 20 mg a été approuvé en Europe, au Japon et dans

plusieurs pays d'Amérique latine et non aux USA dans le traitement de l'ATTRv chez les patients avec polyneuropathie de stade I de Coutinho (Marche sans aide), pour ralentir la progression de la neuropathie. A plus long terme, deux études de phase IV menées sur des patients ATTRV30M et ATTR non-V30M français et Italiens, montrent une stabilité de la neuropathie à 2 ans mais pour seulement 30 % des patients (Plante-Bordeneuve, 2007; Cortese et al., 2016).

Sur un échantillon de 210 patients d'origine portugaise ATTRV30M traités par tafamidis 20mg suivis sur une période de 18 à 66 mois, il a été observé une stabilisation de la neuropathie chez 1/3 des patients (répondeurs), une faible progression chez 1/3 (répondeurs partiels) et une progression significative chez 30 % des patients (non-répondeurs) (Monteiro et al., 2019). En 2018, un essai de phase III évaluant le tafamidis 20 et 80 mg dans les cardiopathies (ATTRv et ATTRwt) versus placebo a montré une diminution significative de la mortalité et des hospitalisations liées aux maladies cardiovasculaires dans le groupe traité (Maurer et al., 2018). Cette étude a permis l'obtention d'une AMM (Autorisation de mise sur le marché) dans les ATTR avec cardiomyopathie (ATTR-CM). Dans l'ensemble des études réalisées, le tafamidis est bien toléré.

Le Diflunisal (Dolobis®)

Le diflunisal, un anti-inflammatoire non stéroïdien repositionné dans les ATTRv en raison de sa capacité à stabiliser la TTR et à inhiber la formation de fibrilles amyloïdes in vitro (Sekijima et al, 2006) (tableau 6). L'efficacité du diflunisal a été étudiée dans un essai de phase III où le critère principal de jugement était le score composite NIS modifié + 7 (mNIS+7). Le mNIS+7 est un score combiné clinique et neurophysiologique évaluant la sévérité de la neuropathie aux membres inférieurs et supérieurs. Dans cette étude multicentrique de phase III menée sur des patients ATTRV30M et ATTR non-V30M, une différence significative du score mNIS+7 a été observée après 24 mois de traitement. Cependant, 52 % des patients ont interrompu l'essai soit en raison d'une TH due à une progression de la maladie ou à des effets indésirables du médicament (ulcères, hémorragies, troubles vasculaires) (Berk et al., 2013). Ce traitement a obtenu une désignation de drogue orpheline pour l'ATTRv, il n'a pas d'AMM. Il est utilisé de manière sporadique dans les pays où il est disponible comme aux USA, en Italie ou en Suède.

L'AG10

L'AG10 est une petite molécule administrée par voie orale. Elle possède une très forte affinité pour la TTR avec une occupation quasi-complète du site de liaison de la thyroxine (Miller et al., 2018). Un essai de phase III est en cours, chez des patients atteints de cardiomyopathie ATTRv ou sauvage (NCT03860935) et les patients ATTRv avec polyneuropathie (ATTRv-PN) (NCT04418024).

7.2.3. Les thérapies de silençage du gène TTR

Depuis 2012, deux traitements de silençage génique ont été développés : le patisiran (ARN interférent, ARNi) et l'inotersen (Oligonucléotide antisens, OAS).

Le patisiran est un ARNi double-brin formulé en nanoparticules lipidiques. Sa formulation en nanoparticule permet de cibler spécifiquement la région 3' de l'ARNm de TTR ; dans les hépatocytes. L'ARNm ciblé est dégradé, provoquant le blocage de la production de TTR muté (TTRm) et TTRwt. Les hépatocytes contiennent des récepteurs de l'apolipoprotéine E qui reconnaissent les protéines ApoE opsonisées sur les nanoparticules. Ce qui permet à l'ARNi d'être internalisé dans le cytoplasme par endocytose. La liaison du brin guide de l'ARNi à la séquence 3' de l'ARNm de TTR permet son clivage par le complexe RISC (RNA-induced silencing).

Dans l'essai de phase III (APOLLO), 225 patients ATTRv-PN (stade I et II) ont reçu du patisiran ou du placebo toutes les 3 semaines pendant 18 mois (Adams et al., 2018). Le patisiran a été évalué à la dose de 0,3 mg/kg, administrée par perfusion intraveineuse. Une réduction durable d'environ 84 % de TTR sérique a été observée. Le critère de jugement principal était le score mNIS+7. Le score mNIS+7 a diminué chez les patients traités par patisiran (figure 20 A). À 18 mois, 56 % des patients ont amélioré leur score mNIS+7 et 51 % leur qualité de vie (figure 20 B et C). En 2018, le patisiran a obtenu une AMM par l'AEM (Agence européenne des médicaments) et la FDA (Food and Drug Administration) pour l'ATTRv avec polyneuropathie de stade I et II avec une amélioration du service médical rendu modérée (ASMR III) par la Haute Autorité de Santé. Une forme sous-cutanée (Vutrisiran) administrée tous les 3 mois est en cours d'essai de phase III (NCT03759379). Dans cette formulation, un ligand d'adressage, le N-

acétylgalactosamine (GalNAC) est directement conjugué à l'ARNi permettant une meilleure stabilité et spécificité par rapport au patisiran (Brown et al., 2020).

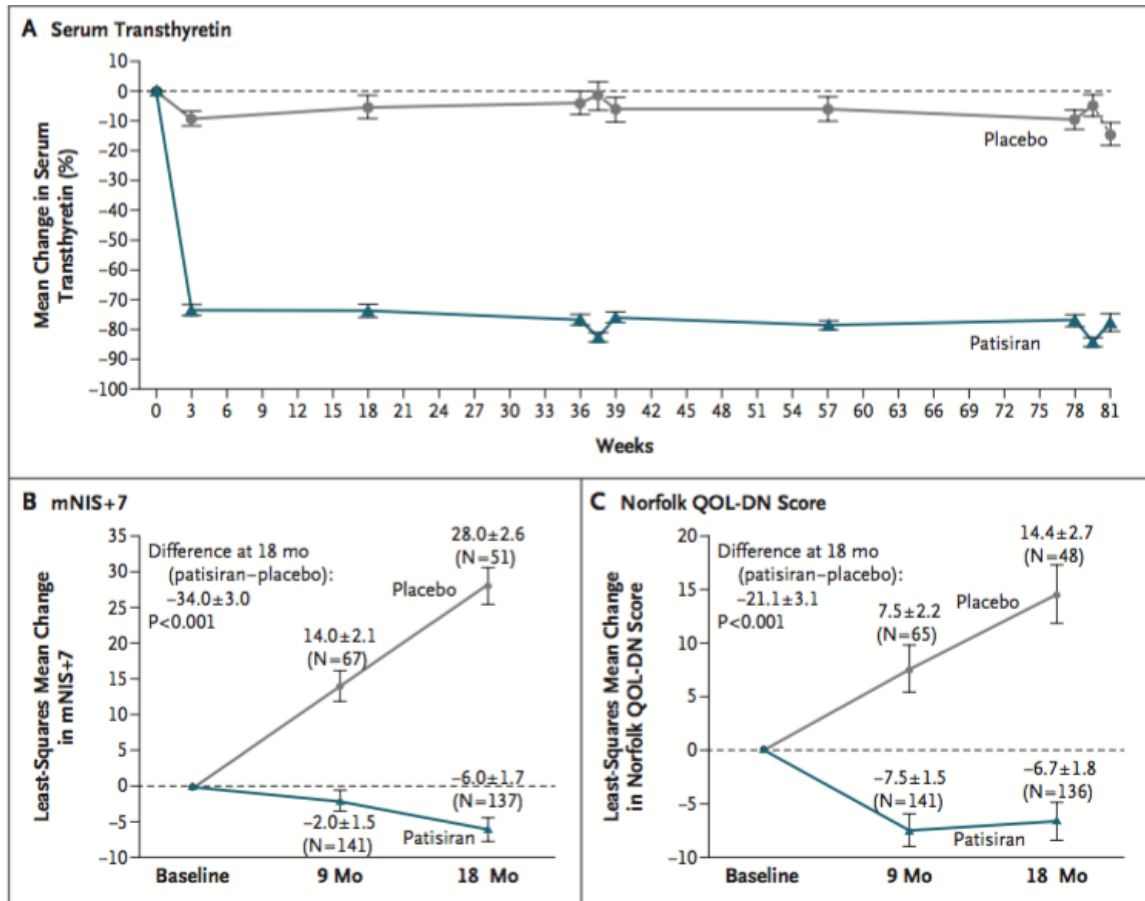


Figure 20: Résultats des critères de jugements dans le groupe patisiran et placebo (Adams et al., 2018). (A) Taux sériques de TTR (B) Evaluation du score neurologique mNIS+7. (C) Evaluation du score de la qualité de vie Norfolk.

L'inotersen est un OAS simple brin de deuxième génération qui dégrade l'ARNm de TTR, réduisant la concentration sérique d'environ 79 %. L'inotersen se lie de façon complémentaire à la région 3'UTR de l'ARNm de TTR, provoquant sa dégradation enzymatique via une ribonucléase H (figure 21). La tolérance et l'efficacité ont été étudiées dans un essai de phase III dans lequel des patients ATTRv-PN (stade I et II) ont reçu de l'inotersen 284 mg par semaine ou du placebo par injection sous-cutanée. À 15 mois, il existait une différence significative en faveur de l'inotersen pour les deux critères de jugement principaux : l'échelle neurologique (mNIS+7) et le questionnaire de qualité de vie (Norfolk-QL-DN) (Benson et al., 2018). Sur le plan de la tolérance, des thrombopénies ont été observées dans 13,4 % des cas, incluant

1 décès par hémorragie intracrânienne possiblement liée au traitement. D'autre part, des cas d'insuffisance rénale aigüe et glomérulonéphrites ont été rapportés comme possiblement liés au traitement. Ce profil de tolérance a conduit à la mise en place d'une surveillance rapprochée de la NFS toutes les 2 semaines et de la fonction rénale toutes les 8 semaines. L'inotersen a obtenu une AMM par l'AEM et la FDA pour ATTRv-PN de stade I et II avec une ASMR mineure (ASMR IV). Il s'agit donc d'un traitement de deuxième intention chez les patients ATTRv qui ne peuvent recevoir le patisiran.

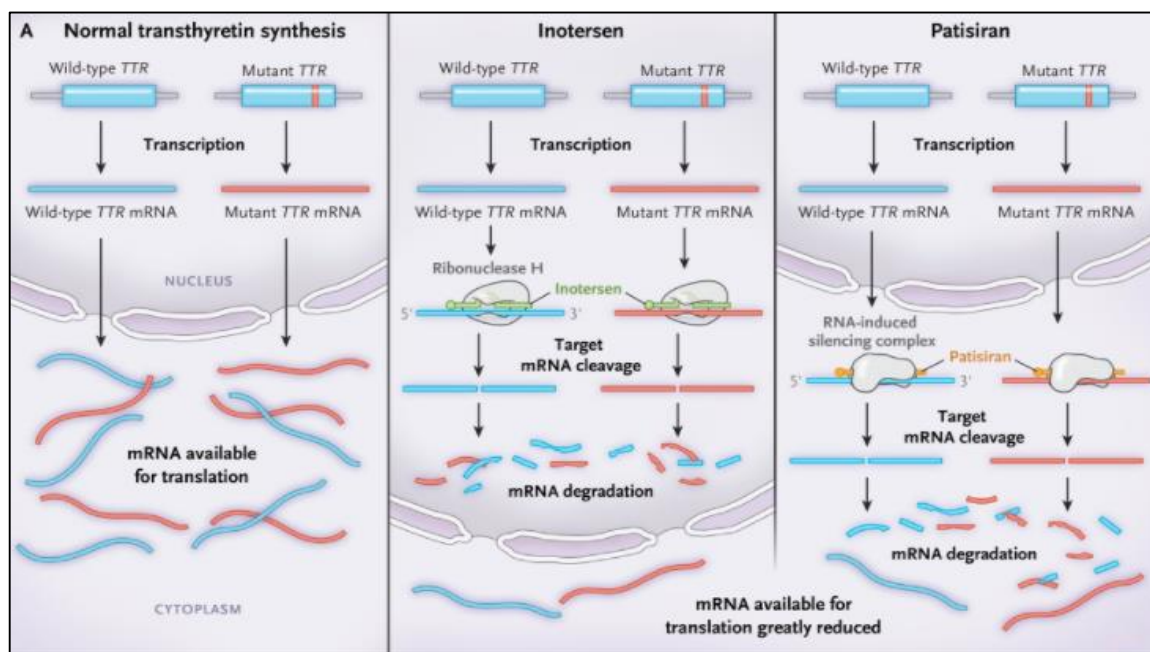


Figure 21: Mécanisme d'action de l'Inotersen et du Patisiran dans les ATTRv (Buxbaum, 2018).

7.2.4. Autres approches de traitement

La résorption de DA est une des approches thérapeutiques à l'étude. L'anticorps monoclonal IgG1 qui cible le composant P amyloïde sérique, un constituant commun de tous les DA a fait l'objet de travaux. Cependant, en raison d'une balance bénéfice-risque défavorable le développement clinique de cet anticorps a été interrompu (Richards et al., 2015). La doxycycline (antibiotique) en association avec l'acide tauroursodésoxycholique a été développée. Après la phase II, aucun essai de phase III n'est pour l'instant proposé (NCT01171859) (Obici et al., 2012).

Plus récemment, un anticorps anti TTR est en cours de développement, le PRX004. Il s'agit d'un anticorps qui neutralise la TTR mal repliés. Une étude de phase 1 sur

les neuropathies et les cardiopathies suivant un schéma thérapeutique d'escalade de dose est en cours. Des résultats prometteurs sur 10 patients ont été présentés (NCT03336580) (Congrès de l'American Academy of Neurology 2021 ; 17 - 22 avril 2021).

La technologie récente du CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a été proposée dans les ATTRv. Distingué par un prix Nobel de chimie (2020), le CRISPR est un complexe formé de deux éléments : d'un côté, un brin d'ARN guide, de séquence homologue à celle de l'ADN que l'on veut cibler, et de l'autre, un ARNm qui code pour une endonucléase, la Caspase 9 (Cas9). Dans la cellule, le brin d'ARN va reconnaître la séquence homologue sur l'ADN et s'y placer. L'enzyme Cas9 se charge alors de couper l'ADN complémentaire. Ainsi, le complexe CRISPR-Cas9 peut supprimer, remplacer ou introduire une séquence (Jinek et al., 2012). Depuis 2020, cette technologie est en cours de développement dans les ATTRv-PN avec le NTLA-2001. Dans le NTLA-2001, l'ARN guide est complémentaire à la TTR et l'ARNm code pour la protéine Cas9 de la bactérie *Streptococcus*. NTLA-2001 est formulé en nanoparticules lipidiques pour délivrer le complexe spécifiquement au foie. Chez les modèles de souris et primates (singes cynomolgus), des doses uniques de NTLA-2001 ont entraîné des réductions de la protéine TTR sérique de plus de 95 % pendant 12 mois et permet donc une élimination de la TTR plus importante que les thérapies actuellement disponibles (Finn et al., 2018). Le NTLA-2001 fait actuellement l'objet d'un essai de phase 1 sur 21 patients ATTRv-PN, en escalade de dose et dose unique (NCT04601051). Des résultats préliminaires sur 6 patients ont été publiés. Vingt-huit jours après l'administration du traitement, le NTLA-2001 était associé à une diminution de 52 % de la TTR sérique dans le groupe ayant reçu une dose de 0,1 mg/kg et de 87 % dans le groupe ayant reçu 0,3 mg/kg. L'effet était dose-dépendant, avec des réductions plus importantes de la concentration de TTR chez les patients ayant reçu une dose plus élevée de NTLA-2001. Aucun effet indésirable grave n'a été associé au NTLA-2001 (Gillmore et al., 2021).

II. ETUDES DES AMYLOSES ATTRv

1. Épidémiologie génétique des ATTRv

1.1. Prévalence et incidence

Jusqu'en 1990, l'ATTRv était considérée comme une maladie rare circonscrite au nord du Portugal et de la Suède ainsi que dans deux régions du Japon (Sousa et al., 1993, 1995 ; Kato-Motozaki et al., 2008). Depuis, elle a été identifiée dans de nombreux pays d'Europe, mais également en Amérique du Sud, en Chine et en Inde (Pan et al., 2015; Parman et al., 2016; Liu G et al., 2017 ; Yuan et al., 2019). Récemment, à partir d'une seule étude la prévalence mondiale a été estimée sur des données publiées (figure 22). Dans ce travail, la prévalence a été évaluée à environ 10 186 cas (5 526-38 468). La prévalence la plus élevée est rapportée au nord du Portugal (1 631,20/1 million) et la plus faible en Sicile (0,20/1 million) (Schmidt et al., 2018).

L'incidence à travers le monde demeure inconnue, probablement très hétérogène. Elle a été étudiée dans deux régions : au nord du Portugal et au nord de la Suède. Elle atteint 2 % soit 35 nouveaux cas par an en Suède et 0,87 pour 100 000 personnes au Portugal, soit 71 nouveaux cas chaque année. En Europe, le seuil est fixé à <5/10 000 personnes (Inês et al., 2018).

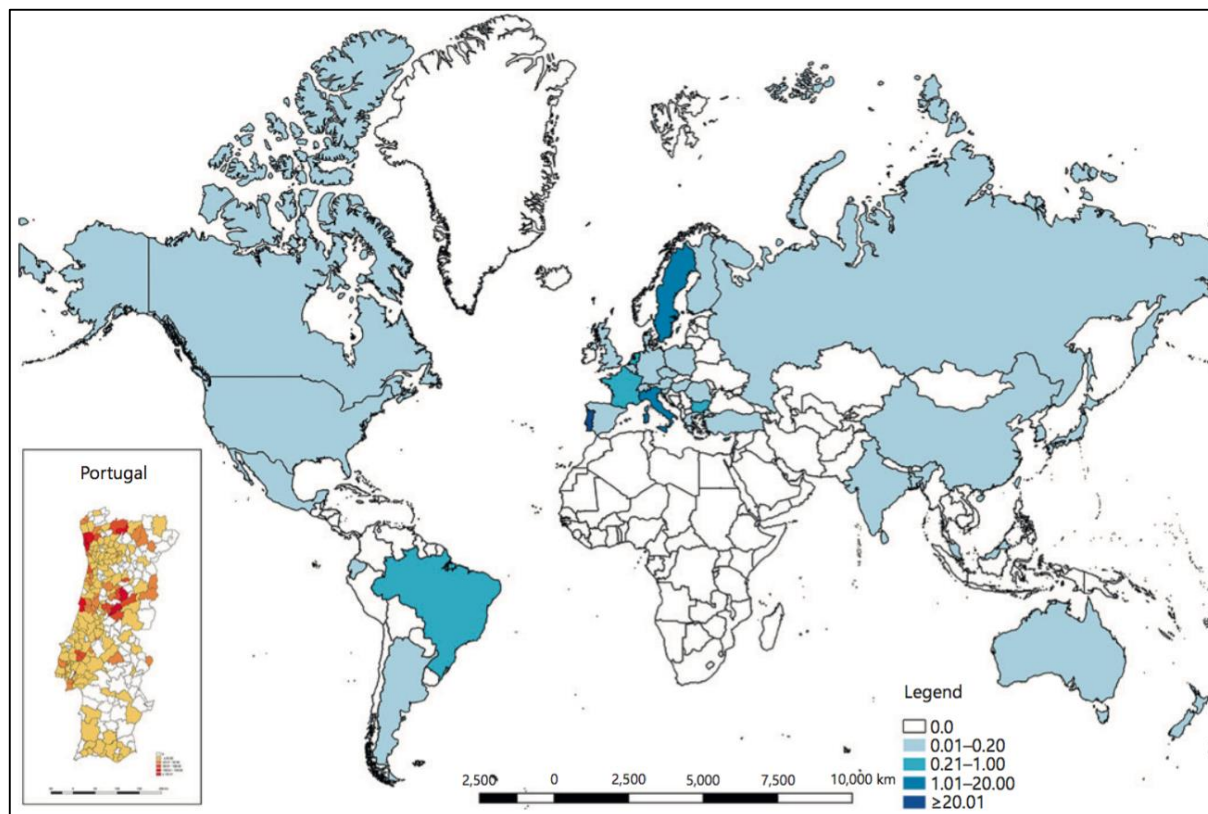


Figure 22: Prévalence mondiale de l'ATTRv d'après Schmidt et al. 2018 (Inês et al., 2018).

1.2. Variation de l'âge de début selon l'origine géographique

L'âge d'apparition des symptômes liés à la maladie varie entre la troisième et la neuvième décennie de la vie, avec de grandes variations selon les populations (figure 8). Les études réalisées sur les populations ATTRV30M montrent d'importantes disparités d'âge de début (figure 23). On distingue les patients avec un âge de début précoce des symptômes (< 50 ans) et tardif (> 50 ans). Pour la même mutation TTRV30M, les premiers symptômes apparaissent en moyenne vers 33 ans au Portugal et au Brésil tandis qu'en Suède l'âge de début est plus tardif (56 ans) (Hellman et al., 2008 ; Saporta et al., 2009b ; Lemos et al., 2014). Au Japon, les deux formes coexistent : l'une identifiée dans deux régions circonscrites, à début précoce (34 ans) superposable à celle des familles portugaises et l'autre plus disséminée sur le territoire, de survenue tardive, en moyenne à 63 ans (Misu et al., 1999 ; Koike et al., 2012). À Majorque, foyer important de la maladie, l'âge de début est intermédiaire (47 ans) (Buades-Reinés et al., 2016). En France, il existe d'une part, des familles Portugaises ayant migré ou nées en France et dont le phénotype

est comparable à celui observé au Portugal et d'autre part, des familles d'origine française qui sont très hétérogènes (Planté-Bordeneuve et al., 2003).

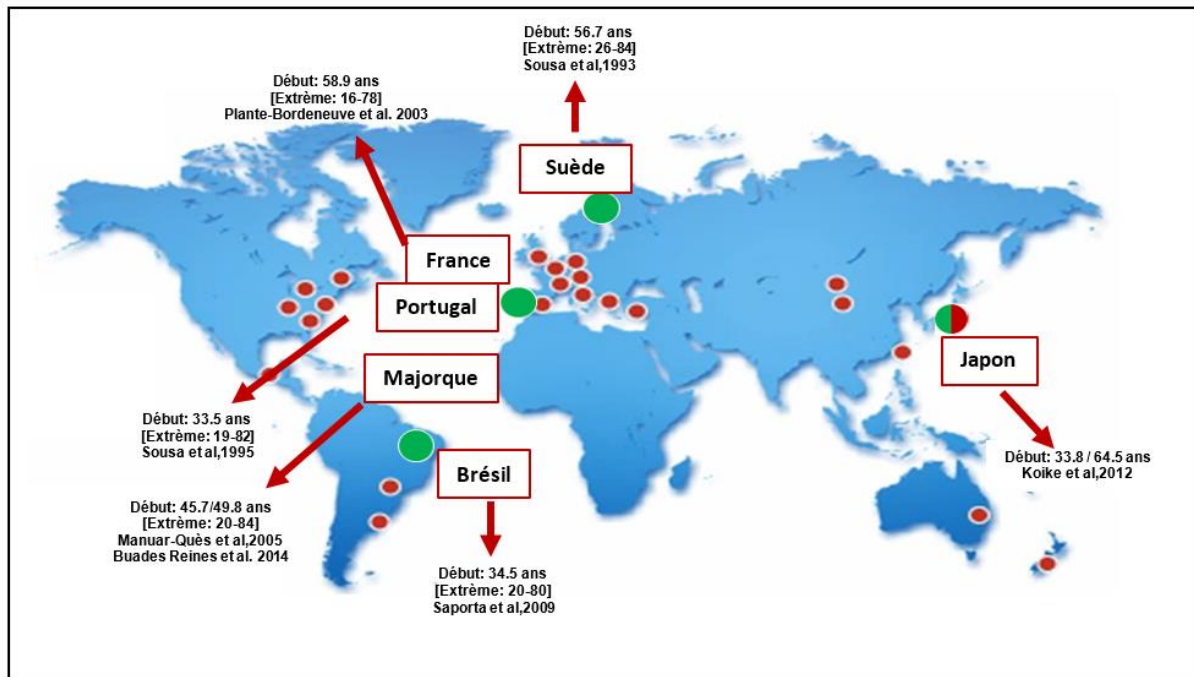


Figure 23: Répartition mondiale de la moyenne d'âge de début des familles ATTRV30M.

1.3. Variation de l'âge de début selon le sexe

Dans certaines populations, l'âge de début diffère selon le sexe, comme cela a bien été démontré au Brésil et au Portugal. Les femmes développent la maladie plus tard (moyenne : 37 ans au Portugal et 35 ans au Brésil) que les hommes (moyenne : 35 ans au Portugal et 31 ans au Brésil) (Sousa et al., 1995 ; Saporta et al., 2009b ; Lemos et al., 2014). Dans d'autres populations, aucune différence n'est démontrée (Suède, Italie, France) (Planté-Bordeneuve et al., 2003; Rapezzi et al., 2008 ; Hellman et al., 2008; Koike et al., 2012; Mazzeo et al., 2015 ; Buades-Reinés et al., 2016 ; Andreou et al., 2018).

1.4. Variation de l'âge de début chez les jumeaux monozygotes

Une différence d'âge de début a été identifiée chez des jumeaux monozygotes ATTRv. Au total, 10 cas de jumeaux monozygotes ont été signalés (dont 3 ATTR non-V30M). Une différence d'âge de début chez des jumeaux monozygotes ATTRV30M est décrite chez des patients originaires de Majorque, du Portugal, de

Suède et du Brésil. La différence la plus importante est observée chez les jumeaux de Majorque avec un écart de plus de 12 ans. (Munar-Qués et al., 1999 ; Holmgren et al., 2004 ; Saporta et al., 2009a). D'autres cas de jumeaux monozygotes avec des différences d'âge de début ont été décrits chez des patients ATTRLys35Thr originaires des Etats-Unis, des patients ATTRGlu89Gln de Bulgarie, et des patients ATTRTyr114Cys de Russie (Ruzhansky et al., 2014; Igor et al., 2015; Yordanova et al., 2019). Ceci suggère que d'autres polymorphismes génétiques ou mécanismes épigénétiques influent sur l'âge de début.

1.5. Anticipation

L'anticipation est caractérisée par l'existence d'un âge de début plus précoce ou d'une aggravation du phénotype au fil des générations (Fraser, 1997). Comme cela a déjà été mentionnée dans différents travaux de génétique notamment dans l'étude de Penrose en 1948 sur la dystrophie myotonique (DM), l'anticipation est un paramètre difficile à analyser (Penrose et al., 1948). Selon Penrose, elle pourrait être un artefact produit par la sélection des arbres généalogiques. Ces biais peuvent être liés à (1) une sélection préférentielle des parents avec une apparition tardive des symptômes ; (2) une sélection préférentielle des descendants avec une atteinte précoce et un phénotype plus grave et (3) l'inclusion de toutes les paires parents-enfants de la famille.

Dans les ATTRv, une anticipation d'âge de début a été mentionnée initialement dans les familles ATTRV30M portugaises. L'analyse de 147 paires parents-enfants portugaises montrait une anticipation significativement plus importante si la transmission est maternelle que si elle est paternelle (Sousa et al., 1990). Ensuite, elle a été rapportée dans les familles ATTRV30M suédoises et japonaises (Drugge et al., 1993 ; Tashima et al., 1995). Dans les familles suédoises, 44 paires parents-enfants ont été analysées et montrent une anticipation plus importante en cas de transmission maternelle (moyenne de 15 ans) (Drugge et al., 1993). D'autre part, Tashima et al., décrivent dans les familles japonaises ATTRv (53 patients) une corrélation entre l'âge de début des symptômes et l'année de naissance, plus marquée chez les femmes (Tashima et al., 1995). Notons, que ces résultats sont d'interprétation difficile, car le nombre de patients était faible et appartenait tous à

la même famille. De plus, les données sur les premiers symptômes des patients décédés étaient insuffisantes pour déterminer l'âge de début de la maladie (Araki 1995).

L'ensemble de ces études sur les ATTRv ont été réalisées à partir de toutes les paires parents-enfants sans considérer les biais potentiels.

D'autres travaux ont été réalisés dans les familles ATTRv japonaises et portugaises en tenant compte des différents biais. Yamamoto et al., ont analysé 68 paires parents-enfants ATTRV30M japonaises avec un minimum de biais d'observation (exclusion des paires impliquant le cas index) et confirment une anticipation lorsque la mutation provient de la mère (Yamamoto et al., 1998). En 2014, Lemos et al l'ont étudié spécifiquement dans une large cohorte de 284 familles ATTRV30M portugaises. L'analyse de 291 paires parents-enfants issus des 284 familles a montré une large anticipation d'âge de début (≥ 10 ans) en cas de transmission maternelle. Elle était plus importante dans les paires mères-fils (10 ans), que dans les paires pères-filles (1 an). L'anticipation est restée significative après exclusion des biais de recensement suivant : (1) exclusion du cas index ; (2) exclusion des paires avec le même âge de début ; et (3) exclusion des enfants nés après 1960. Ainsi, cette étude a permis de démontrer formellement la présence d'une anticipation dans les familles portugaises ATTRV30M (Lemos et al., 2014).

1.6. Pénétrance (Risque de maladie)

La pénétrance (ou risque d'être malade) est le pourcentage d'individus symptomatiques parmi les porteurs de mutations pathogènes qui augmente avec le temps. Peu d'études d'estimation du risque de maladie ont été réalisées dans les ATTRv. L'étude historique de Andrade au Portugal concluait à une affection avec une forte pénétrance (Andrade, 1952). Plus tard, d'autres études généalogiques, avec analyse de ségrégation ont suggéré que la pénétrance était très probablement incomplète et variable selon les populations. Elle paraissait élevée dans les familles avec histoire familiale du nord du Portugal et, au contraire très faible dans l'échantillon de cas sporadiques (Sequeiro et al., 1990; Coelho et al., 1994; Sousa et al., 1995). Une seule estimation chiffrée du risque de maladie fut réalisée au Japon, dans 9 familles de la province d'Arao. Cette étude basée sur une analyse de

ségrégation avance un chiffre de pénétrance de 83 % dans cet échantillon (Sakoda et al., 1983). Compte-tenu des problématiques méthodologiques que pose l'estimation du risque de maladie, plusieurs méthodes ont été proposées. L'une d'entre elles, appelée méthode prospective est basée sur la probabilité du phénotype conditionnellement au génotype et au mode de recensement des familles. Cette dernière a permis l'estimation du risque de maladie des ATTRv dans divers échantillons de familles d'origines diverses: portugaise, brésilienne, française et suédoise. Il a ainsi été observé que la pénétrance à 80 ans reste incomplète dans tous les échantillons. Elle atteint 85 % dans les familles portugaises, brésiennes et françaises. Dans les familles suédoises, elle est nettement inférieure (69 %) au même âge (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Hellman et al., 2008; Saporta et al., 2009b). Le risque de maladie variait aussi selon le sexe et le sexe du parent transmetteur. Le risque de maladie était plus important en cas de transmission maternelle dans les familles ATTRV30M Portugaises et Suédoises (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Bonaiti et al., 2009). Bonaiti et al ont montré qu'une modélisation de la fonction de pénétrance selon une transmission mitochondriale pourrait expliquer la différence observée en fonction du sexe du parent transmetteur dans l'échantillon portugais et suédois ATTRV30M (Bonaiti et al., 2010).

Nous reviendrons sur les avantages et les limitations de cette méthode utilisée pour l'estimation du risque de maladie. Pour illustrer les difficultés à estimer les fonctions de pénétrances, on peut remarquer que récemment 2 études publiées, l'une chez les siciliens (Mazzeo et al., 2015) et l'autre chez les chypriotes (Andreou et al., 2018) ont rapporté des estimations de risques de maladie à partir d'une approche basique où les courbes étaient obtenues en calculant le pourcentage de patients affectés (axe des ordonnées) à un âge donné (axe des abscisses) (figure 24 et 25) (Mazzeo et al., 2015; Andreou et al., 2018). L'absence de prise en compte des apparentées et du mode de recensement dans le calcul mérite d'être signalé car pouvant conduire à des données biaisées.

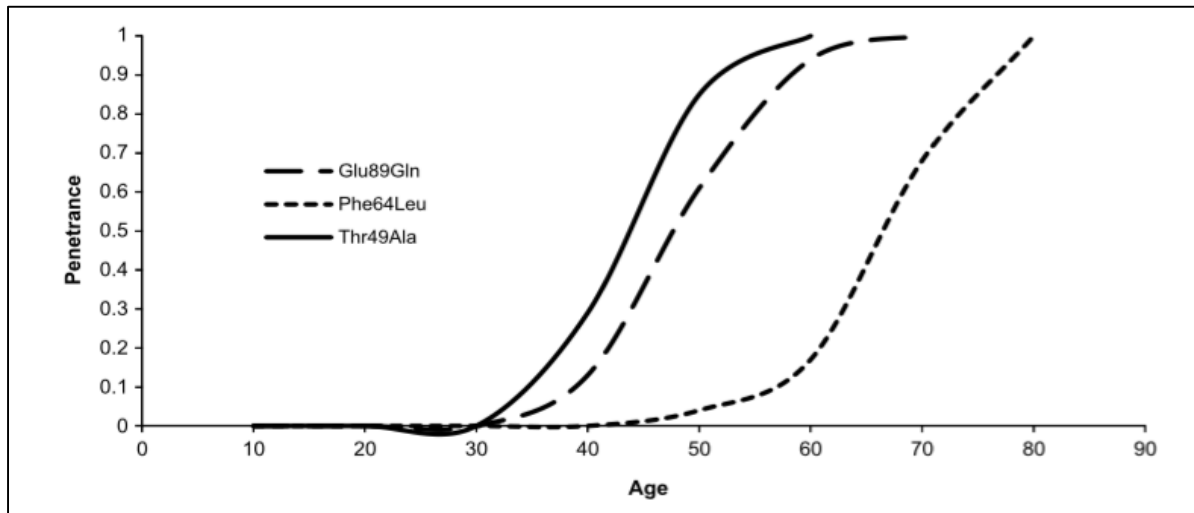


Figure 24: Risques de maladie estimés selon le variant TTR dans la population Sicilienne (Mazzeo et al., 2015).

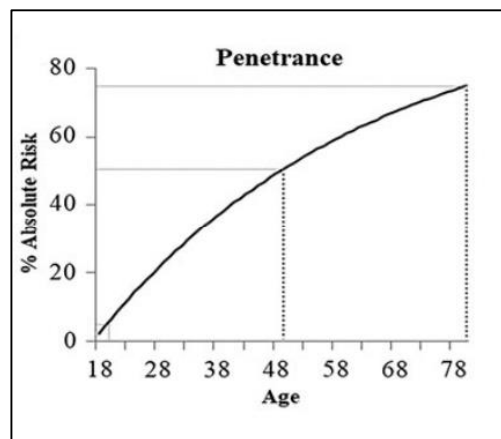


Figure 25: Risques de maladie estimés à partir de 46 patients ATTRV30M chypriotes (Andreou et al., 2018).

2. Facteurs génétiques modificateurs du phénotype

Plusieurs travaux ont cherché à démêler les facteurs génétiques qui pourraient influencer l'expression de la maladie et/ou la variabilité de l'âge de début. La plupart des travaux sont des études d'associations. Quelques études expérimentales ont également été réalisées.

2.1. Haplotypes

Les études haplotypiques faisant appel aux polymorphismes d'un seul nucléotide (PSN) ont été essentiellement réalisées pour identifier l'origine et dater la mutation TTRV30M. Une étude utilisant des PSN et des microsatellites a mis en évidence une origine commune du variant TTRV30M au Portugal et au Japon, et un effet fondateur indépendant en Suède (Ohmori, 2004). L'identification d'un haplotype a permis de dater la mutation TTRV30M à 750 ans dans les familles portugaises et à 650 ans dans les familles brésiliennes. Dans les familles suédoises l'âge a été estimé à 375 ans (Zaros et al., 2008). Les autres mutations du gène TTR ont été peu étudiées.

2.2. Études d'association

Dans les études d'association, la stratégie la plus utilisée est l'approche gène candidat qui consiste à rechercher et analyser les variants des gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la pathologie (Alghamdi and Padmanabhan, 2014). Dans les ATTRv, les études des gènes modificateurs potentiellement impliqués dans la variation de l'âge de début ont été essentiellement réalisées par une équipe portugaise. Dans un échantillon d'environ 300 patients ATTRV30M portugais Santos et al. ont étudié les gènes candidats suivants: APCS (Amyloid P component) ; AR (Androgen receptor) ; BGN (Biglycan) ; C1Q (Complement C1q subcomponent subunit C) ; HSP27 (Heat Shock Protein 27) ; MEK1 (Extracellular signal-regulated kinases 1) ; MEK2 (Extracellular signal-regulated kinases 2) ; NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) ; RBP4 (Retinol binding protein 4) ; YWHAZ (protein Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation). Certains variants de ces gènes sont significativement associés à la variation de l'âge de début dans cet échantillon portugais. Les variants des gènes APCS et C1Q ont également été associé à l'âge de début dans un échantillon chypriote grec de 71 patients (tableau 7) (Dardiotis et al., 2009; Santos et al., 2016, 2017; Dias et al., 2019). Les résultats de ces travaux sont divergents pour certains variants de gènes et ceci pourrait probablement être lié aux différences d'effectifs, aux populations différentes ou encore à la méthodologie utilisée.

Gène	SNP	Associée à un âge de début Précoce / Tardif	Références
APCS	rs2808661	Précoce	(Soares et al., 2005)
	rs6689429	Précoce et Tardif	
RBP4	rs7091052	Tardif	
	rs2838574	Tardif	
C1QA	rs192378	Précoce	(Dardiotis et al., 2009)
C1QC	rs9434	Tardif	
APOE	ε2/ε3	Précoce	
APCS	rs2838573	Tardif	(Santos et al., 2016)
RBP4	rs7094671	Tardif	
	rs11187545	Précoce	
	rs5919393	Tardif	
AR (groupe homme)	rs17217069	Précoce	
	rs2361634	Précoce	
	rs5919392	Précoce	
AR (groupe femme)	rs2361634	Précoce	
	rs5965433	Précoce	
	rs5919393	Tardif	
NGAL	rs3780836	Précoce	(Santos et al., 2017)
BGN	rs2269404	Tardif	
MEK1	rs11630608	Précoce	
	rs16949939	Tardif	
	rs745796	Précoce	
MEK2	rs1823059	Tardif	
HSP27	rs11769502	Précoce	
YWHAZ	rs17365305	Précoce	
C1QA	rs201693493	Tardif	(Dias et al., 2019)
	rs149050968	Tardif	
C1QC	rs2935537	Précoce	
	rs201241346	Précoce	
	rs200952686	Tardif	

Tableau 7: Récapitulatif des gènes associés à la variation de l'âge de début dans les ATTRV30M. APCS: Amyloid P component, serum; APOE: Apolipoprotein E; AR: Androgen Receptor; BGN: Biglycan; C1QA: Complement C1q subcomponent subunit A; C1QC : Complement C1q subcomponent subunit C ; HSP27: Heat Shock Protein 27 ; MEK1: ERK1 kinases; MEK2 :ERK2 kinases; NGAL: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; RBP4: Retinol binding protein4; SNP: single nucleotide polymorphism; 14-3-3 (YWHAZ): protein Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation.

2.3. Locus à séquences répétitives

Étant donné les anticipations observées dans certaines populations, Santos et al. ont étudié l'influence de 10 gènes à triplets nucléotidiques responsables de maladies neurodégénératives (AR: Androgen receptor ; ATN1 : Atrophin 1 ;ATXN1: Ataxin-1 ; ATXN2: Ataxin-2 ; ATXN3: Ataxin-3 ; ATXN7: Ataxin-7 ; DMPK: Myotonic dystrophy protein kinase ; HTT : Huntingtin ; JPH3: Junctophilin 3 ; TBP: TATA-box binding protein) dans une cohorte de 329 patients ATTRV30M Portugais. Pour le gène de l'ATXN2, la présence d'au moins un allèle de plus de 22 CAG était significativement associée à un âge de début plus précoce de 6 ans, suggérant un

effet modulateur de la longueur des répétitions sur l'expression phénotypique (Santos et al., 2019).

2.4. L'ADN mitochondrial (ADNmt)

Deux grandes études se sont intéressées à l'influence de l'ADNmt sur l'âge de début de la maladie. Une première étude portant sur les haplogroupes mitochondriaux dans les populations ATTRV30M Suédoises, Françaises, Portugaises et Japonaises a été réalisée. Chez les patients suédois et français d'âge de début tardif, la distribution des haplogroupes était similaire à celle observée dans la population générale. En revanche, chez les patients d'âge de début précoce, l'haplogroupe K relativement rare était le plus fréquent (Olsson et al., 2009). La seconde étude réalisée sur une large cohorte de 262 individus ATTRV30M portugais, a montré qu'un nombre de copies d'ADNmt plus élevé était associé à un âge de début plus précoce. Il pourrait être un facteur modificateur de l'âge d'apparition de la maladie (Santos et al., 2018).

2.5. Autres études

- **Etudes expérimentales**

En plus des gènes susmentionnés associés à la variation de l'âge de début, des études expérimentales sur d'autres biomarqueurs moléculaires ont été décrites comme ayant une expression ou une activation altérée. La plupart d'entre elles sont anciennes, nous avons donc cité les plus importantes.

L'analyse de biopsies des nerfs et glandes salivaires de patients ATTRV30M et de souris transgéniques porteuses du gène TTRV30M ont montré une augmentation de l'expression de trois gènes impliqués dans le remodelage de la MEC (BGN, NGAL et MMP-9). Les auteurs suggèrent qu'une augmentation de ces protéines en contact avec la TTR dans le DA pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des ATTRv (Sousa et al., 2005 ; Cardoso et al., 2008). Des études expérimentales ont suggérées une toxicité des oligomères de TTR formés au cours du processus de formation des fibrilles amyloïdes (Sousa et al., 2002 ; Ibrahim et al., 2019). Monteiro et al. ont montré que les kinases 1/2 régulées par le signal extracellulaire

(Extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2) présentaient une activation accrue dans les biopsies de glandes salivaires et de nerfs de patient ATTRV30M. L'activation des kinases ERK1/2 (MEK1/2) était également régulée à la hausse dans les nerfs périphériques, avec une phosphorylation d'ERK1/2. Sur la base de ces résultats les auteurs suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une cascade de signalisation précoce conduisant aux effets cytotoxiques des agrégats de TTR (Monteiro et al., 2006).

- **Études in silico**

Des approches *in silico* ont été menées pour comprendre la variabilité phénotypique. Dans une étude réalisée sur des patients ATTRV122I (phénotype cardiaque), des variants cis-régulateurs non codants situés au niveau des sites de liaison des facteurs de transcription et impliqués dans le développement et la fonction cardiaque ont été identifiés. Les auteurs suggèrent que ces variants cis-régulateurs peuvent contribuer à l'amylose cardiaque observée chez ces patients. Notons, que ces variants non codants n'ont pas fait l'objet d'études expérimentales plus approfondies (Polimanti et al., 2013, 2014). En 2019, une étude panphénotypique (Phenome-wide association studies, PheWAS en anglais) a été menée sur 361 194 sujets. Parmi les 382 phénotypes cliniques testés, les variants non codants de TTR ont été associés significativement à 26 phénotypes. Il s'agissait notamment d'atteintes liées à la fois à une ATTRv ou à une ATTR sénile, telles que les cardiopathies ischémiques chroniques, l'insuffisance cardiaque ou encore les maladies intestinales. Ces données apportent des informations sur le large spectre phénotypique associé au profil des variants non codants du gène TTR (De Lillo et al., 2019).

Ci-dessous une représentation schématique des facteurs modificateurs associés à l'âge de début dans les ATTRv (figure 26).

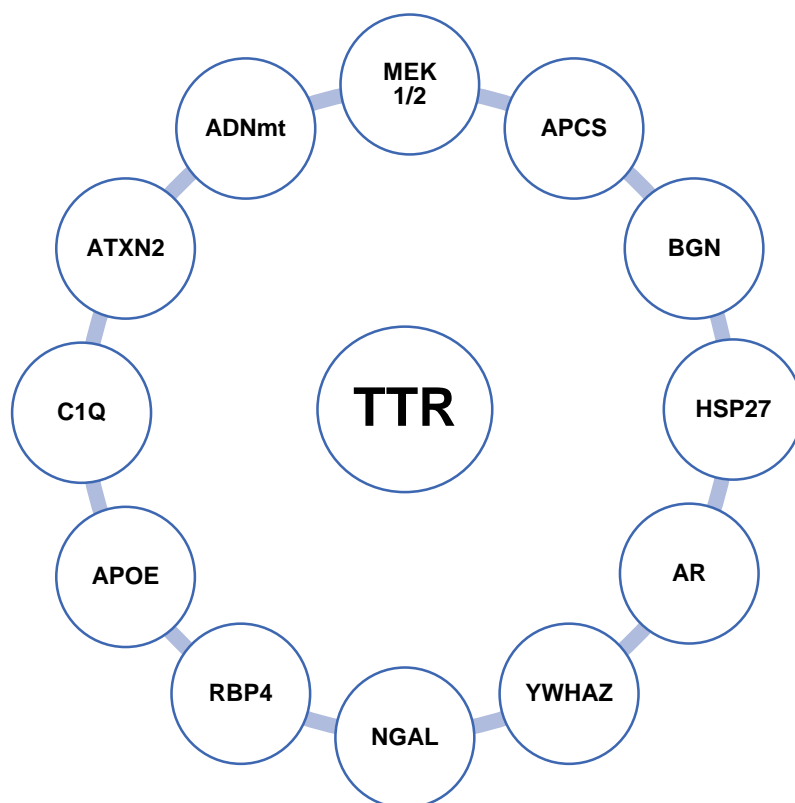


Figure 26: Représentation schématique des facteurs modificateurs associés à l'âge de début.
 ADNmt : ADN mitochondriale ; ATXN2 : Ataxine 2 ; APCS: Amyloid P component, serum; APOE: Apolipoprotein E; AR: Androgen Receptor; BGN : Biglycan; C1Q : complement component 1q ; HSP27 : Heat Shock Protein 27 ; MEK1 : ERK1 kinases; MEK2 :ERK2 kinases; NGAL :Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; RBP4: Retinol binding protein4 ; YWHAZ : protein Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation.

PROJET DE RECHERCHE

Travaux réalisés durant la thèse

Comme résumé dans l'introduction bibliographique, d'importantes variations sont identifiées dans l'âge de début, dans la présentation clinique, dans le risque de maladie et dans le type de mutation au sein des populations ATTRv. Il est nécessaire d'approfondir les connaissances des données d'épidémiologie génétique de l'affection afin de mieux comprendre la pathologie et d'identifier au plus tôt les sujets à risque et ainsi améliorer la prise en charge des familles. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Mon travail de thèse se divise en 2 parties :

- **La partie 1** a principalement porté sur l'estimation du risque de maladie dans les ATTRv à partir d'une nouvelle méthodologie que nous avons développée. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de résumés d'article, valorisés par des articles scientifiques publiés ou en voie de soumission.
- **La partie 2** visait à étudier le rôle de la TTR dans la variation de l'âge de début des patients ATTRV30M.

DONNÉES D'ÉPIDÉMIOLOGIE GÉNÉTIQUE DES FAMILLES ATTRv

Les premières études d'estimation du risque de maladie, réalisées par notre équipe, portant sur des cohortes de familles ATTRv d'origines diverses, utilisaient une méthode d'estimation paramétrique (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Hellman et al., 2008; Saporta et al., 2009b). Nous avons développé une approche statistique non paramétrique capable de prendre en compte l'effet d'une covariable sur le risque de maladie et qui a l'avantage de ne pas faire d'hypothèse sur la loi sous-jacente des données (Alarcon et al., 2018). En premier lieu, nous avons utilisé cette approche pour estimer le risque de maladie des 4 variants TTR les plus fréquents chez les patients ATTRv en France (**Etude 1**). Ensuite, nous avons poursuivi par une première collaboration avec le centre national de référence des amyloses ATTRv d'Umeå en Suède pour approfondir l'étude des aspects génétiques dans cette population. Notamment, l'anticipation, l'estimation du risque de maladie et l'influence de différentes covariables (**Etude 2**). Cette approche a été ensuite élargie à un plus grand nombre de variants TTR dans le cadre d'une étude collaborative internationale (Annexe 1) (**Etude 3**).

I. Méthodologie statistique pour l'estimation du risque de maladie

1. Description des données et problématiques méthodologiques

Dans les maladies génétiques à âge de début variable comme les ATTRv, l'estimation du risque d'être atteint à un certain âge pour les porteurs de mutation est utile pour l'amélioration de la prise en charge des sujets à risque. Ce risque est appelé pénétrance. Il s'agit d'une fonction dépendante de l'âge. Dans la mesure où la mutation prédisposante est rare, les données que nous observons ne sont pas prises aléatoirement en population générale mais correspondent à des familles. C'est à partir de ces données familiales que se fera l'estimation de la fonction de pénétrance qui est définie comme la fonction de répartition de la variable aléatoire T (délai de survenu de l'événement d'intérêt). Cette fonction est donnée par la formule $F(t) = \mathbb{P}(T \leq t)$, t représente donc l'âge de l'individu. Par la suite, nous noterons $F(t)$, $t \in [0, +\infty)$.

Dans le cas des ATTRv, tous les individus malades sont nécessairement porteurs d'une mutation délétère. C'est ce qu'on appelle des maladies monogéniques. En pratique, les données familiales sont recueillies lors du conseil génétique de la manière suivante : à partir d'un individu malade (appelé cas index ou *proband*), un arbre généalogique va être constitué et un test génétique pourra être proposé aux individus non malades de la famille. Pour chaque individu, nous disposerons donc d'informations sur son statut vis à vis de la maladie à un âge donné (qui constitue le phénotype), sur son génotype ainsi que sur d'autres covariables (sexe, type de mutation, origine, etc.).

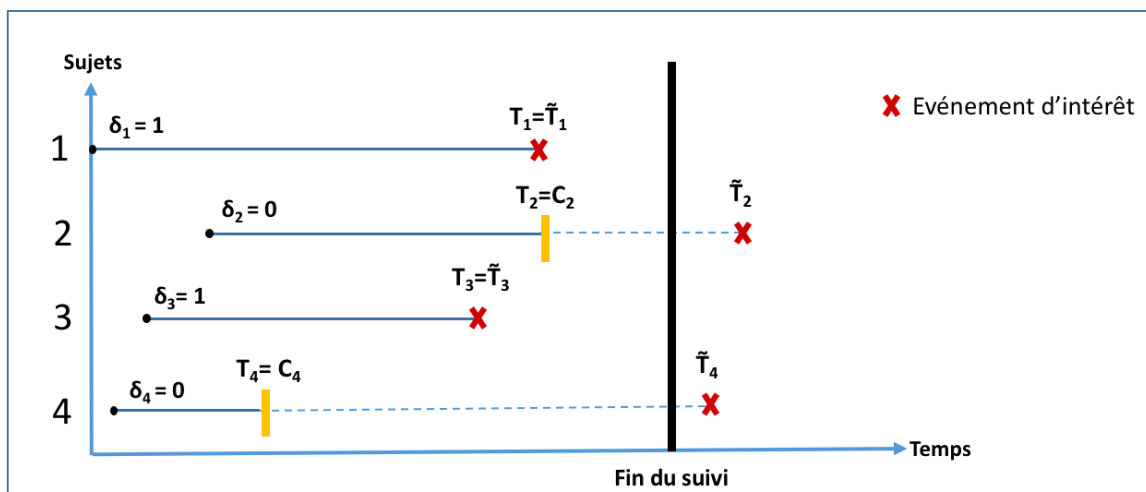
Si l'ensemble des données phénotypiques et génotypiques était disponible pour chaque individu, nous nous trouverions dans un cas simple d'estimation de courbe de survie. En effet, en faisant une hypothèse d'indépendance entre les phénotypes des individus d'une même famille, conditionnellement à leur génotype, nous aurions à estimer une fonction de survie à partir des phénotypes des individus porteurs de la mutation. Ainsi, l'évènement d'intérêt serait le développement de la maladie, le temps d'intérêt serait l'âge auquel l'individu développe la maladie et les individus mutés mais non malades seraient alors considérés comme censurés à l'âge des dernières nouvelles. Cependant, l'information génotypique des individus est en pratique largement manquante puisque tous les individus de la famille ne sont pas génotypés. Dans ce cas, la structure de l'arbre généalogique d'une famille, ainsi que l'information phénotypique permettent d'apporter de l'information sur les génotypes manquants (grâce aux lois de Mendel et en supposant l'équilibre de Hardy-Weinberg).

Par ailleurs, l'ATTRv étant une maladie rare, les individus ne sont pas recensés aléatoirement en population mais à partir de critères visant à augmenter la probabilité de la présence de la mutation délétère dans la famille. Comme nous l'avons déjà évoqué ci-dessus, l'ATTRv est une maladie monogénique. Par conséquent, le simple fait d'avoir un individu atteint suffit à nous assurer que la mutation est présente au sein de la famille, à moins que l'individu index n'ait eu une mutation de novo, évènement extrêmement rare. Dans le cas de l'ATTRv, le critère de sélection sera donc simplement l'existence d'au moins un individu atteint dans la famille. Ainsi, l'ensemble des familles dans lesquelles la mutation est présente

mais ne présentant pas d'individu malade, ne sera jamais recensé. Ce biais de recensement doit donc être pris en compte lors de l'estimation de la fonction de pénétrance au risque d'avoir des estimations biaisées. La problématique est donc la suivante : fournir une estimation de la fonction de pénétrance à partir de familles recensées sur l'existence d'un individu atteint et pour lesquelles l'information génotypique est incomplète.

1.1. Analyses de Survie

Mettons de côté dans un premier temps les problématiques de génotypes manquants et de biais de recensement et considérons un échantillon d'individus porteurs de la mutation délétère. Pour chaque individu nous observons soit son âge de début de la maladie, dans le cas où l'individu est atteint, soit son âge aux dernières nouvelles, dans le cas où l'individu n'est pas atteint. Nous allons considérer dans notre analyse le développement de la maladie comme l'événement d'intérêt et l'âge du début de la maladie comme le temps d'intérêt. L'événement n'est pas observé pour tous les individus puisque certains d'entre eux ne développeront pas la maladie avant la fin de l'étude. C'est ce qu'on appelle des données censurées (figure 27).



T_i : l'âge observé de l'individu i

\tilde{T}_i : l'âge de l'individu i au début de la maladie

C_i : l'âge aux dernières nouvelles pour l'individu sain i

δ : le vecteur aléatoire représentant la censure. δ_i vaut 1 si l'individu n'est pas censuré (donc si l'évènement d'intérêt se produit) et vaut 0 si l'individu est censuré.

Figure 27: Illustration des individus censurés et non censurés.

L'analyse de survie permet l'estimation du risque de survenue de l'évènement d'intérêt à partir de données censurées. Plus précisément, on appelle fonction de survie au temps, notée $S(t)$, la fonction telle que :

$$S(t) = \mathbb{P}(T > t)$$

Ainsi, dans notre contexte la fonction de survie représente la probabilité de ne pas présenter l'évènement d'intérêt avant l'instant t . La relation entre la fonction de pénétrance F et la fonction de survie S est définie par $F(t) = 1 - S(t)$.

Une des particularités de la fonction de survie est la prise en compte des données censurées lors du processus d'estimation. Il existe plusieurs estimateurs de cette fonction : des estimateurs paramétriques et non paramétriques. Les estimateurs paramétriques font une hypothèse de loi sur la distribution des données (Weibull, log normale, exponentielle) tandis que les non paramétriques ne font aucune hypothèse sur la distribution (Kaplan-Meier, Nelson-Aalen). Il existe également un modèle semi-paramétrique qui permet de tenir compte de covariables additionnelles et d'estimer leur effet sous certaines hypothèses. C'est le cas du modèle de Cox (aussi appelé *Proportional Hazard Model*). Notons, qu'il existe d'autres modèles tel que l'AFT (*Accelerated Failure Time*) selon lequel l'effet d'une covariable permet d'accélérer ou de ralentir le cycle de vie d'une maladie d'une certaine constante.

Dans cette seconde partie, nous présenterons l'estimateur de Kaplan-Meier (KM) dans le cadre de nos données, l'estimateur de KM pondéré et l'algorithme EM pour répondre, en partie, à la problématique des génotypes manquants. Enfin nous exposerons un modèle qui permet la prise en compte de covariables.

1.1.1. Modélisation du problème

Notons :

- $0 = t_{(0)} < t_{(1)} < \dots < t_{(m)}$ une discrétisation du temps
- (\tilde{T}_i) l'âge de l'individu i au début de la maladie
- $\tilde{T} = (\tilde{T}_1, \dots, \tilde{T}_n) \in \mathbb{R}^n$ le vecteur aléatoire associé (avec $m \leq n$)
- (C_i) l'âge aux dernières nouvelles pour l'individu sain i
- $C = (C_1, \dots, C_n) \in \mathbb{R}^n$ le vecteur aléatoire associé
- (T_i) l'âge observé pour l'individu i tel que : $T_i = \min(\tilde{T}_i, C_i)$
- $T = (T_1, \dots, T_n)$ le vecteur aléatoire associé
- (δ_i) la censure pour l'individu i : $\delta_i = \mathbb{1}_{(\tilde{T}_i \leq C_i)}$
- $\delta = (\delta_1, \dots, \delta_n) \in \{0, 1\}^n$ le vecteur aléatoire associé.

Si on suppose les lois de Mendel, les génotypes des enfants dépendent des génotypes des parents. Pour les fondateurs, le génotype dépend de la fréquence allélique de l'allèle délétère en population.

Désignons par $G = (G_1, \dots, G_n) \in \{00, 10, 01, 11\}^n$ le vecteur aléatoire génotypique défini tel que

$$G_i = \begin{cases} 00 & \text{si l'individu est non porteur} \\ 10 & \text{si l'individu est porteur hétérozygote de transmission paternelle} \\ 01 & \text{si l'individu est porteur hétérozygote de transmission maternelle} \\ 11 & \text{si l'individu est porteur homozygote de transmission paternelle et maternelle} \end{cases}$$

Rappelons que le vecteur G est partiellement observé. Les probabilités génotypiques non observées seront donc estimées en fonction des informations génotypiques sur l'ensemble de l'arbre généalogique et à partir de la fonction de survie (voir Annexe 2 : Algorithme EM).

On a donc :

$$\mathbb{P}(G, T, \delta) = \underbrace{\mathbb{P}(G)}_{\text{partie génétique}} \times \underbrace{\mathbb{P}(T, \delta|G)}_{\text{partie survie}}$$

où :

- $\mathbb{P}(G, T, \delta)$ désigne la distribution de probabilité conjointe de T et G ;
- $\mathbb{P}(T, \delta|G)$ désigne la distribution conditionnelle de T sachant G ;

La vraisemblance s'écrit :

$$L_n = \mathbb{P}(G, T, \delta) = \mathbb{P}(G) \times \mathbb{P}(T, \delta|G)$$

Partie survie :

Rappelons que seuls les individus porteurs peuvent être atteints. Or, nous avons vu que les phénotypes des individus étaient indépendants conditionnellement au génotype et que le génotype d'un individu ne dépendait que du génotype de ses parents. Ainsi, si l'individu i n'est pas porteur (*i.e.* $G_i = 00$), on a :

- Pour un individu non atteint, donc censuré ($\delta_i = 0$) :

$$\mathbb{P}(T_i = t, \delta_i = 0|G_i = 00) = 1$$

- Pour un individu atteint ($\delta_i = 1$) :

$$\mathbb{P}(T_i = t, \delta_i = 1|G_i = 00) = 0$$

Dans le cas où l'individu i est porteur $G_i \neq 00$, la partie survie est définie comme :

$$\mathbb{P}(T_i = t, \delta_i|G_i \neq 00) = S(t)\lambda(t)^{\delta_i}$$

où $S(t)$ est la fonction de survie et $\lambda(t)$ est la fonction de hasard (fonction de risque instantané) donnée par :

$$\lambda(t) = \lim_{\Delta \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta} \mathbb{P}(T \in [t, t + \Delta]|T > t)$$

Partie Génétique :

La partie génétique peut être décomposée en deux parties, selon si l'individu a des parents ou non. En notant \mathfrak{I} l'ensemble des n individus, on peut distinguer le sous-ensemble $\mathcal{F} \subset \mathfrak{I}$ des fondateurs (i.e. des individus sans ancêtre dans l'arbre généalogique) du sous-ensemble $\mathfrak{I} \setminus \mathcal{F}$ (composé des individus ayant des ancêtres). La partie génétique peut être reformulée comme :

$$\mathbb{P}(G) = \prod_{i \in \mathcal{F}} \mathbb{P}(G_i) \times \prod_{i \in \mathfrak{I} \setminus \mathcal{F}} \mathbb{P}(G_i | G_{pat_i}, G_{mat_i})$$

avec :

- G_{pat_i} correspond au génotype paternel de tout individu issu de $\mathfrak{I} \setminus \mathcal{F}$
- G_{mat_i} correspond au génotype maternel de tout individu issu de $\mathfrak{I} \setminus \mathcal{F}$

1.1.2. L'estimation de Kaplan Meier (KM)

Nous allons utiliser l'estimateur de KM pour estimer $S(t)$. L'estimateur de KM (Kaplan and Meier, 1958), également connu sous le nom de l'estimateur produit-limite, s'appuie sur le théorème des probabilités conditionnelles qui découle du raisonnement suivant:

$$\mathbb{P}(\text{ne pas être atteint à } t_{(i)}) = \mathbb{P}(\text{ne pas être atteint à } t_{(i)} | \text{sachant que l'on n'était pas atteint à } t_{(i-1)}) \times \mathbb{P}(\text{ne pas être atteint à } t_{(i-1)})$$

Ce qui donne :

$$\begin{aligned} S(t_{(i)}) &= \mathbb{P}(\tilde{T} > t_{(i)}) \\ &= \mathbb{P}(\tilde{T} > t_{(i)} | \tilde{T} > t_{(i-1)}) \times \mathbb{P}(\tilde{T} > t_{(i-1)}) \\ &= p_i \times S(t_{(i-1)}) \end{aligned}$$

$$= p_i \times p_{i-1} \times \dots \times S(t_{(0)})$$

Ainsi, on a : $S(t_{(i)}) = \prod_{j=0}^i p_j$

On estime $p_i = 1 - \mathbb{P}(\tilde{T} \leq t_{(i)} \mid \tilde{T} > t_{(i-1)})$ par $\hat{p}_i = \left(1 - \frac{d_i}{R_i}\right)$

où :

- $(t_{(i)})_{i \in [0, m]}$ représentent une discrétisation ordonnée du temps ;
- d_i est le nombre d'événements au temps $t_{(i)}$;
- R_i est le nombre d'individus avant $t_{(i)}$ (individus encore à risque de présenter l'évènement d'intérêt).

Finalement, l'estimation de la fonction de survie est donnée par :

$$\hat{S}_{KM}(t) = \prod_{j=1}^i \hat{p}_j = \prod_{j=1}^i \left(1 - \frac{d_j}{R_j}\right)$$

Donc si on se place chez les individus porteurs de la mutation, on peut simplement estimer la fonction de survie ci-dessous par l'estimateur de KM. Nous obtenons alors une fonction constante par morceaux.

Considérons l'exemple suivant : on simule une famille de 25 individus avec 13 porteurs (dont 6 symptomatiques) dont l'arbre généalogique de la famille est représenté sur la figure 28 Le tableau 8 suivant récapitule les détails de la famille considérée :

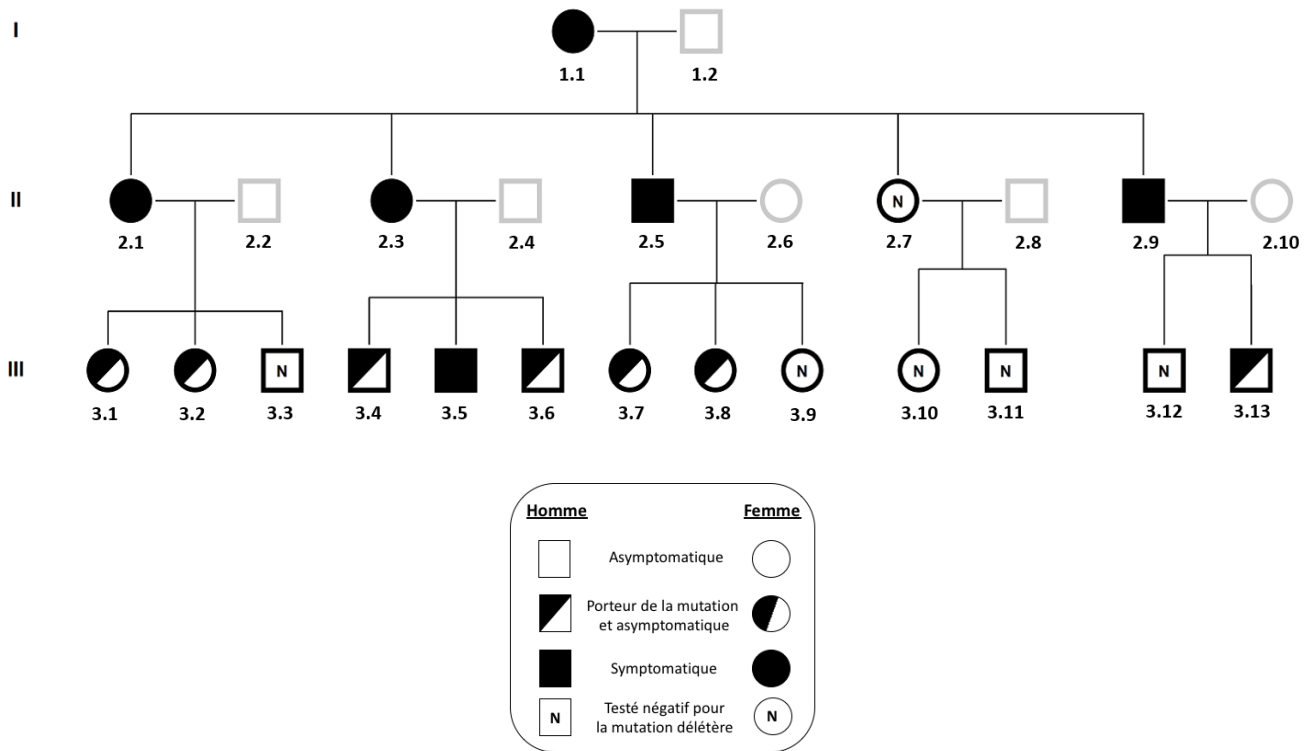


Figure 28: Arbre généalogique de la famille-exemple considérée.

	Hommes	Femmes	Total
Individus	13	12	25
Porteurs	6	7	13
Asymptomatiques	3	4	7
Symptomatiques	3	3	6
Non porteurs	3	3	6

Tableau 8: Distribution de la famille-exemple.

Les valeurs de T_i (en fonction du phénotype de l'individu, δ_i) sont données dans la tableau 9 ci-dessous.

N° de l'individu	δ_i	T_i
1:1	1	50
1:2	0	88
2:1	1	60
2:2	0	66
2:3	1	45
2:4	0	49
2:5	1	55
2:6	0	50
2:7	0	40
2:8	0	44
2:9	1	48
2:10	0	62
3:1	0	33
3:2	0	35
3:3	0	38
3:4	0	32
3:5	1	30
3:6	0	25
3:7	0	36
3:8	0	37
3:9	0	47
3:10	0	46
3:11	0	65
3:12	0	34
3:13	0	20

Tableau 9: Distribution de l'âge observé aux dernières nouvelles lorsque l'individu i n'est pas atteint ($\delta_i = 0$) et l'âge au diagnostic de la maladie lorsque l'individu i est atteint ($\delta_i = 1$).

La courbe de survie estimée par la méthode de KM simple pour cette famille est représentée sur la figure 29 (les traits verticaux sur la courbe correspondent aux individus censurés et les marches correspondent aux individus ayant développé la maladie durant la période de suivi. Ici seuls les individus porteurs de la mutation délétère sont représentés dans la fonction de survie).

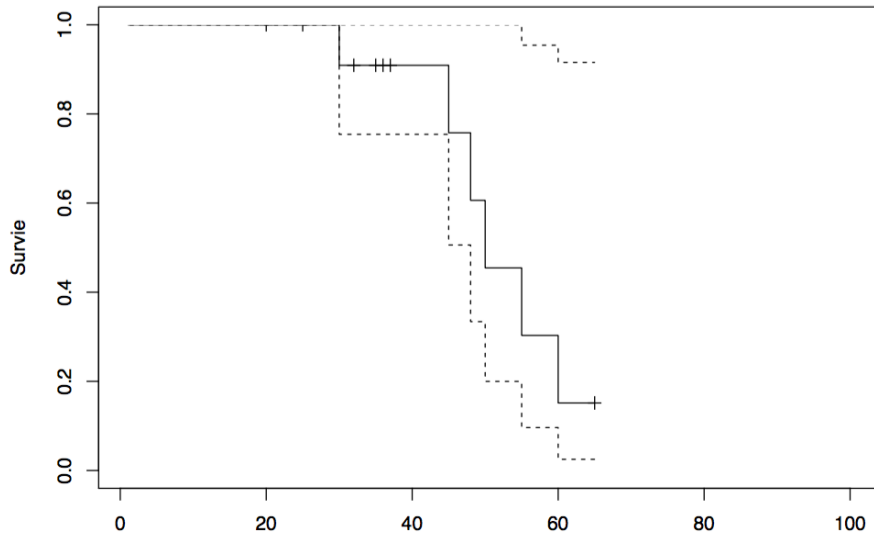


Figure 29: Courbe de survie obtenue avec la méthode de KM. La courbe de survie est représentée par un trait plein et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.

Sur cet exemple, les génotypes sont connus pour 19 individus. L'estimation de la pénétrance s'obtient aisément grâce à l'algorithme de KM simple. Cependant, sur les 25 individus de la famille, 6 n'ont pas été utilisés lors de l'estimation. Pourtant, leur phénotype est observé et leur génotype peut être déduit en partie par les génotypes observés. Notons que, dans le cas où tous les génotypes sont connus, le vecteur $P(G)$ n'apparaît pas dans le calcul de vraisemblance. Que se passe-t-il alors dans le cas où les génotypes sont partiellement observés ?

1.1.3. L'estimateur de Kaplan Meier pondéré

Dans les familles, il est rare que l'ensemble des individus soit génotypés. En effet, si l'index (*proband* en anglais) se fait nécessairement génotypé, ce n'est pas le cas des autres membres de l'arbre généalogique. Les génotypes non observés ont pour conséquence une perte d'information. Le problème qui se pose alors est de fournir des estimations de fonctions de survie à partir de familles recensées pour lesquelles l'information génotypique est incomplète.

En effet, la plupart des individus ne sont pas génotypés mais peuvent être pris en compte grâce aux individus génotypés présents dans la famille.

La méthode de KM pondéré vient exploiter cette information indirectement fournie pour chaque individu non génotypé, en leur affectant des poids. Ces derniers sont supposés connus pour le moment (leur calcul est développé dans la partie suivante) et correspondent à la probabilité d'avoir un génotype donné. Dans la vraisemblance, chaque individu est donc pondéré par sa probabilité d'être porteur de la mutation pathogène, notée w_i . L'estimation de la fonction de survie est désormais donnée par:

$$\hat{S}_{KM_pondéré}(t) = \prod_{j=1}^i w_i \times \hat{p}_j$$

Dans notre problématique, on a d'une part la partie génétique et d'autre part la partie survie qui sont imbriquées. On propose d'utiliser l'algorithme itératif EM pour estimer les quantités d'intérêt.

1.1.4. L'algorithme Expectation-Maximisation

Etapes de l'algorithme EM

L'algorithme EM, dû à Dempster et al., 1977, (cf. Annexe 2 dans laquelle nous exposons un exemple d'application pour la loi exponentielle) pour estimer la fonction de survie alterne deux étapes : une étape Expectation (E) et une étape Maximisation (M). On le déroule comme suit :

Initialisation : on commence par initialiser avec des poids aléatoires. Pour les individus dont le génotype est parfaitement connu, on fixe les poids tels que:

$$w_i = \begin{cases} 0 & \text{si } G_i = 00 \text{ (non porteur du gène délétère)} \\ 1 & \text{si } G_i = 10 \text{ ou } 01 \text{ ou } 11 \text{ (porteur du gène délétère)} \end{cases}$$

Pour les individus dont le génotype est inconnu, nous distribuons des poids aléatoires tirés d'une loi d'une distribution uniforme sur $[0,1]$.

A partir de là, nous pouvons estimer une première fonction de pénétrance grâce à une étape M (voir ci-dessous) puis nous itérons les 2 étapes suivantes de l'algorithme EM jusqu'à convergence.

— Algorithme EM :

- Etape E : calcul de la probabilité d'être porteur (poids) pour tous les individus avec la fonction de pénétrance courante
- Etape M : mise à jour de la fonction de pénétrance avec un KM pondéré par les poids estimés à l'étape E.

Calcul des poids

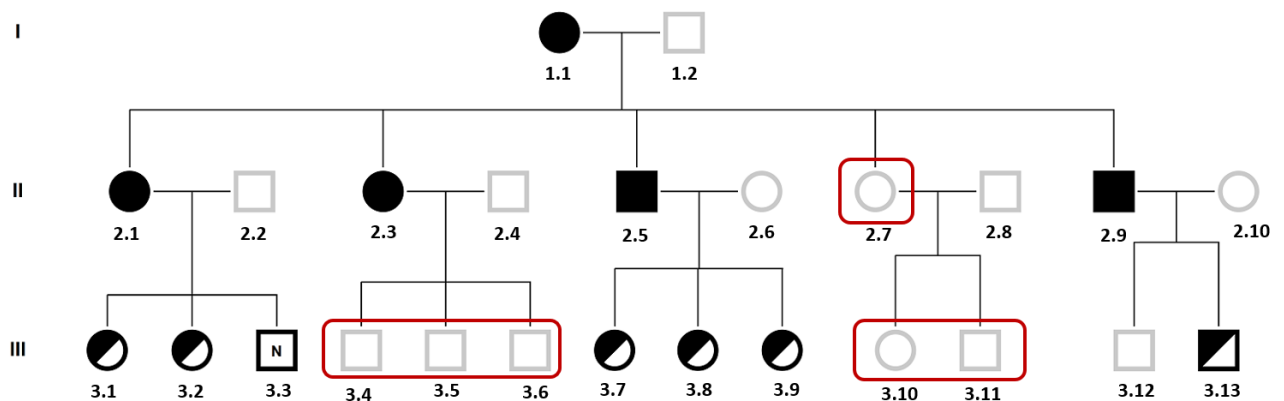
La théorie des modèles graphiques trouve son origine dans le domaine de la génétique pour décrire les liens causaux entre différentes variables (Wright 1921,1934). Par la suite ces représentations graphiques en associations avec des lois de probabilité ont été développées et nommées les réseaux bayésiens (Pearl, 1985; Friedman and Koller, 2003). En 2003, Lauritzen et Sheehan présente les modèles graphiques comme un environnement permettant de formuler et de résoudre des problèmes en génétique et dans les domaines apparentés (Lauritzen and Sheehan, 2003). Dans cet article, un accent particulier est mis sur les relations entre des modèles graphiques et la génétique. Dans notre contexte, on introduit un réseau bayésien pour la modélisation de la partie génétique du modèle et le principe de propagation d'évidence pour effectuer de l'inférence. La propagation d'évidence possède de nombreux noms comme l'algorithme somme-produit, Elston-Stewart (Totir et al., 2009), ou encore message-passing algorithm etc. Une implémentation, sous le nom de *bped*, sur le logiciel R (R, Core Team 2015) nous permettra d'effectuer ces inférences. La pondération, notée w_i pour l'individu i , sera calculée en fonction des informations génotypiques et phénotypiques présentes dans l'arbre généalogique. Ainsi on a:

$$w_i = \mathbb{P}(G_i \neq 00 | ev; \theta)$$

où :

- w_i désigne le poids attribué à l'individu i
- ev désigne l'ensemble des informations génotypiques disponibles dans l'arbre et également fonction de la survie
- θ désigne le vecteur de paramètre qui contient des composantes paramétriques et non paramétriques.

Pour illustrer le KM pondéré, nous allons considérer la même famille que



précédemment, mais cette fois-ci avec des individus non génotypés (figure 30).

Figure 30: Arbres généalogiques de la famille-exemple considérée avec des individus non génotypés.

Nous allons estimer la fonction de survie et ensuite utiliser l'algorithme EM pour prendre en compte les individus non génotypés. En analysant les résultats, nous pouvons observer que les courbes obtenues avec les deux méthodes sont différentes (figure 31). Les individus non génotypés permettent, dans ce deuxième cas, d'apporter de l'information pour une estimation plus précise de la fonction de survie. La distribution marginale a posteriori pour chaque individu de l'arbre généalogique (figure 30) est donnée dans le tableau 10. Les calculs ont été effectués en utilisant *bped*.

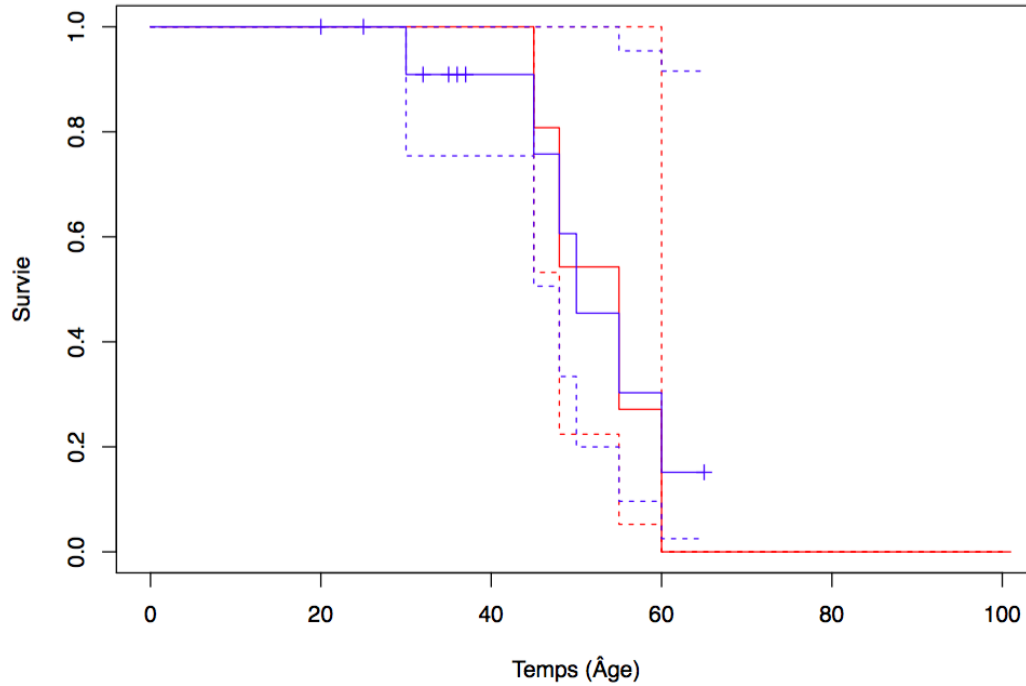


Figure 31: Courbe de survie obtenue avec la méthode de KM simple (en bleu) et la méthode de KM pondérée (en rouge).

i	$G = 00$	$G = 10$	$G = 01$	$G = 11$
1:1	0.000	0.500	0.500	0.000
1:2	0.990	0.005	0.005	0.000
2:1	0.000	0.000	1.000	0.000
2:2	0.970	0.015	0.015	0.000
2:3	0.000	0.000	1.000	0.000
2:4	0.970	0.015	0.015	0.000
2:5	0.000	0.000	1.000	0.000
2:6	0.964	0.018	0.018	0.000
2:7	1.000	0.000	0.000	0.000
2:8	0.996	0.002	0.002	0.000
2:9	0.000	0.000	1.000	0.000
2 : 10	0.990	0.005	0.005	0.000
3:1	0.000	0.000	1.000	0.000
3:2	0.000	0.000	1.000	0.000
3:3	1.000	0.000	0.000	0.000
3:4	0.000	0.010	0.980	0.010
3:5	0.000	0.010	0.980	0.010
3:6	0.000	0.010	0.980	0.010
3:7	0.000	0.994	0.003	0.003
3:8	0.000	0.994	0.003	0.003
3:9	1.000	0.000	0.000	0.000
3 : 10	1.000	0.000	0.000	0.000
3 : 11	1.000	0.000	0.000	0.000
3 : 12	1.000	0.000	0.000	0.000
3 : 13	0.000	1.000	0.000	0.000

Tableau 10: Distribution marginale a postérieure $\mathbb{P}(G_i = x|ev)$ calculée avec la méthode BP (résultat de bped). Les individus génotypés sont représentés en gras.

1.1.5. Covariables : Modèle de Cox

Grâce à cette méthodologie, nous pouvons prendre en compte l'ensemble des individus de la famille. Pour cette analyse nous avons utilisé une fréquence allélique de 1%. Si nous regardons l'individu 1:1, il a les génotypes 10 ou 01 avec une probabilité égale de 0,500. Sa probabilité d'être homozygote est nulle, ce qui est cohérent car un de ces enfants (individu 2.7) a été génotypé négatif pour la mutation délétère. Sans surprise, nous observons que tous les individus non génotypés ($i = 1.2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 2.10, 2.12$) ne peuvent pas avoir le génotype non porteur 00 ($G_i \neq 00$). Nous pouvons observer que l'individu 3.13 (porteur asymptomatique) présente une probabilité de 1 pour le génotype $G = 10$ (transmission paternelle), ce qui coïncide avec le statut phénotypique de son père (individu 2.9).

Par ailleurs, cette méthode peut facilement être étendue à la prise en compte de covariables par un modèle de Cox ou par stratification dans l'estimation du risque.

Le modèle de Cox est un modèle semi-paramétrique à risques proportionnels qui permet d'établir une relation entre les facteurs de risque de la survenue de l'événement et la distribution des durées de survie. Deux hypothèses sont nécessaires à l'utilisation de ce modèle :

1. le rapport des risques instantanés de deux patients est indépendant du temps (risque proportionnel)
2. le logarithme du risque instantané est une fonction linéaire des Z_{ij} : log-linéarité

Dans notre contexte, nous avons utilisé ce modèle pour étudier l'effet de covariables comme le sexe ou le sexe du parent transmetteur sur le risque d'être atteint de la maladie. Le modèle de Cox s'écrit :

$$\lambda(t | Z) = \lambda_0(t) \times \exp(\beta^T Z)$$

où $Z \in \mathbb{R}^p$ est le vecteur des variables explicatives avec p le nombre de variables considérées ; et $\beta \in \mathbb{R}^p$ est le vecteur de paramètre à estimer, qui ne dépend pas du temps (sa transposée est notée β^T). Il représente l'effet des variables explicatives sur le risque instantané.

Le risque instantané est le produit de deux termes :

- le premier qui dépend du temps et qui est commun pour tous les individus, $\lambda_0(t)$ est appelé risque de base (risque au temps t pour un sujet dont toutes les variables sont à 0)
- et le deuxième qui dépend des variables, le hazard ratio : $(\beta^T Z)$ qui correspond au rapport des risques.

Pour interpréter le résultat de l'analyse de survie, nous avons besoin d'estimer le vecteur β , qui correspond au vecteur des coefficients des variables explicatives. Celui-ci est estimé en prenant le logarithme du rapport entre le risque instantané des deux groupes comparés (aussi appelé le log-ratio).

Soit Z_j une variable explicative à laquelle on associe le paramètre β_j (j un entier entre 1 et p). L'association ou non de notre variable Z_j avec la durée de survie est testée par $H_0 : \beta_j = 0$ contre $H_1 : \beta_j \neq 0$. Plusieurs tests sont possibles pour ce faire (Wald, Rapport de vraisemblance, Score).

Lorsque l'hypothèse de proportionnalité n'est pas tenable, une solution consiste à stratifier le modèle. L'analyse par stratification consiste à diviser l'échantillon en sous-groupes. Dans ce type d'analyse, la fonction de survie est estimée dans chaque sous-groupe de l'échantillon. Dans ce contexte il n'y a pas de paramètre à estimer, donc nous allons utiliser un test non paramétrique (Test du log-rank) pour comparer les courbes de survie.

Afin d'illustrer le modèle de Cox, nous allons prendre en compte la covariable "sexe" sur l'exemple de famille représentée dans la figure 30. Les courbes de survie selon le sexe sont représentées sur la figure 32.

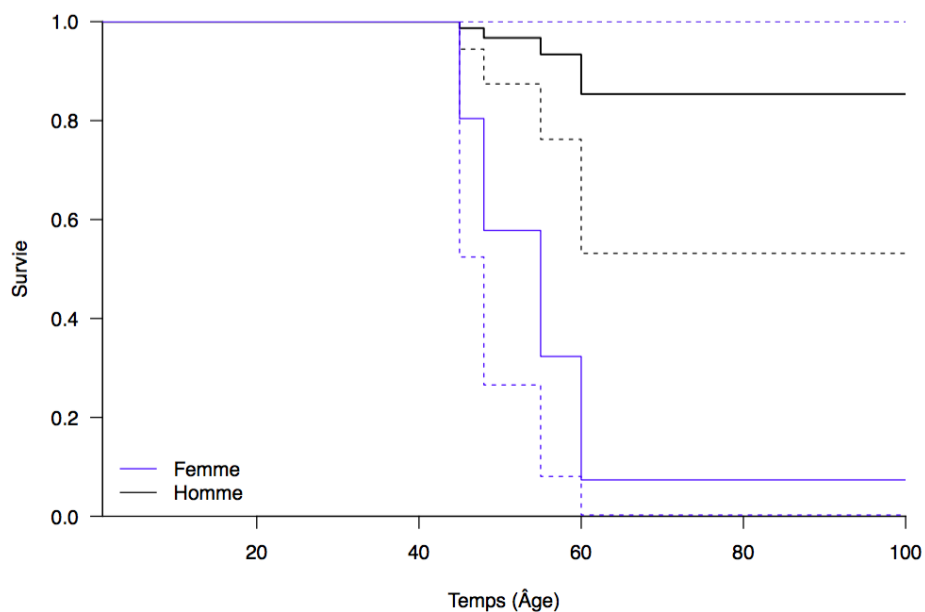


Figure 32: Estimation de la fonction de survie dans un modèle de Cox en tenant compte de la covariable "sexe." Les courbes de survie sont représentées par un trait plein (en noir pour les hommes et en bleu pour les femmes) et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.

Le paramètre β a été estimé par la valeur : $\hat{\beta} = 2.803$ avec une p-valeur égale à 0.0424. Ce qui indique qu'il y a une différence de survie entre hommes et femmes : les femmes ont un risque instantané plus important par rapport aux hommes.

Il est également possible d'évaluer l'effet de covariables partiellement observées comme le sexe du parent transmetteur (noté POO pour *Parent Of Origin*). En effet, cette covariable n'est pas disponible pour l'ensemble des individus. Cependant, elle peut être estimée dans notre modèle à l'aide des poids décrits précédemment. Ainsi on peut noter : w_{pat_i} (respectivement w_{mat_i}) la probabilité de transmission paternelle (respectivement maternelle) pour l'individu i . Enfin on note i le paramètre associé à la covariable d'intérêt POO, et γ le vecteur des paramètres associés aux autres covariables.

A l'étape E :

$$w_{pat_i} = \mathbb{P}(G = 10 \text{ ou } G = 11 | ev; \theta) \text{ et } w_{mat_i} = \mathbb{P}(G = 01 \text{ ou } G = 11 | ev; \theta)$$

où :

- ev représenté l'information disponible dans l'arbre généalogique ;
- θ représente les paramètres du modèle : $\theta = (\beta, \gamma)$

Ainsi pour un individu i , on note S_p (respectivement S_m) la fonction de survie paternelle (respectivement maternelle) λ_p (respectivement λ_m) la fonction de hasard paternel (respectivement maternel).

Pour les individus atteints (i.e $\delta_i = 1$), on a :

$$\mathbb{P}(T_i | G_i; \theta) = \begin{cases} S_p(T_i)\lambda_p(T_i) & \text{si } G_i = 10 \\ S_m(T_i)\lambda_m(T_i) & \text{si } G_i = 01 \text{ ou } G_i = 11 \\ 0 & \text{si } G_i = 00 \end{cases}$$

où $\lambda_p(T_i) = \lambda_m(T_i) \times \exp(\beta^T \times Z_i)$
 et $S_p(T_i) = \exp(-\Lambda_m(T_i) \times e^\beta)$ (avec Λ_m le hasard maternel cumulé)
 et $S_m(T_i) = \exp(-\Lambda_m(T_i)) \Rightarrow \Lambda_m(t) = -\log(S_m(T_i))$

Enfin :

$$S_p(T_i) = \exp(\log(S_m(T_i)) \times e^\beta)$$

Pour les individus non atteints (i.e $\delta_i = 0$), alors :

$$\mathbb{P}(T_i | G_i; \theta) = \begin{cases} S_p(T_i) & \text{si } G_i = 10 \\ S_m(T_i) & \text{si } G_i = 01 \text{ ou } 11 \\ 1 & \text{si } G_i = 00 \end{cases}$$

Lors de l'analyse de l'effet de la covariable POO, nous avons considéré la transmission maternelle comme risque de base donné ($\lambda_m = \lambda_0$). On obtient les probabilités suivantes :

$$\mathbb{P}(T_i = t, \delta_i = 1 | G_i, Z_i) = \begin{cases} \exp(-\Lambda_m(t) \exp(Z_i \gamma)) \times (\lambda_m(t) \exp(Z_i \gamma)) & \text{si } G_i = 01 \text{ ou } G_i = 11 \\ \exp(-\Lambda_m(t) \exp(\beta + Z_i \gamma)) \times (\lambda_m(t) \exp(\beta + Z_i \gamma)) & \text{si } G_i = 10 \\ 0 & \text{si } G_i = 00 \end{cases}$$

et

$$\mathbb{P}(T_i = t, \delta_i = 0 | G_i, Z_i) = \begin{cases} \exp(-\Lambda_m(t) \exp(Z_i \gamma)) & \text{si } G_i = 01 \text{ ou } G_i = 11 \\ \exp(-\Lambda_m(t) \exp(\beta + Z_i \gamma)) & \text{si } G_i = 10 \\ 1 & \text{si } G_i = 00 \end{cases}$$

Ces deux expressions peuvent être simplifiées comme suit :

$$\frac{1}{\lambda_m(t)} \mathbb{P}(T_i = t, \delta_i = 1 | G_i, Z_i) = \begin{cases} \exp(-\Lambda_m(t) \exp(Z_i \gamma)) \exp(Z_i \gamma) & \text{si } G_i = 01 \text{ ou } G_i = 11 \\ \exp(-\Lambda_m(t) \exp(\beta + Z_i \gamma)) \exp(\beta + Z_i \gamma) & \text{si } G_i = 10 \\ 0 & \text{si } G_i = 00 \end{cases}$$

Pour illustrer l'e et de la covariable observée (POO), nous allons considérer la même famille- exemple que précédemment.

Les courbes de survie du sexe du parent transmetteur sont représentées sur la figure 33. La distribution marginale a postérieure pour chaque individu de l'arbre généalogique est donnée dans le tableau 11 (obtenue grâce à *bped*).

Le paramètre β a été, quant à lui, estimé par la valeur : $\hat{\beta} = -3.58078$ avec une p-valeur égale à 0.00179. Ce qui indique que le risque instantané paternel est moins important.

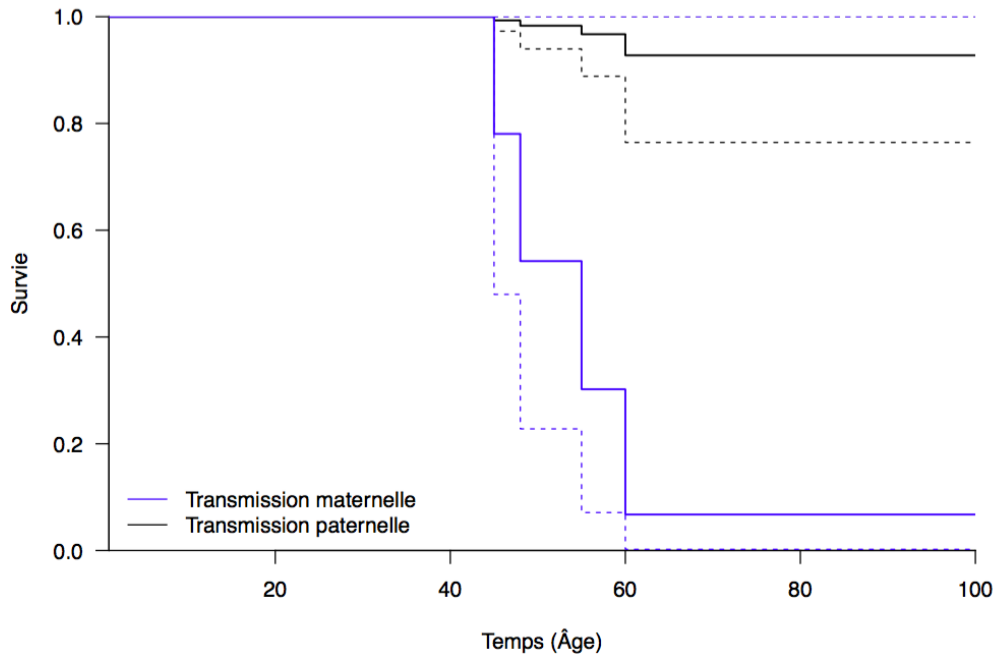


Figure 33: Estimation de la fonction de survie dans un modèle de Cox en tenant compte du POO. Les courbes de survie sont représentées par un trait plein (en noir : transmission paternelle, en bleu : transmission maternelle) et les intervalles de confiance sont représentés par des traits en pointillés.

i	Génotype	$G = 00$	$G = 10$	$G = 01$	$G = 11$
1:1	Positif	0.000	0.465	0.465	0.070
1:2	Non génotypé	0.958	0.039	0.003	0.000
2:1	Positif	0.000	0.011	0.989	0.000
2:2	Non génotypé	0.989	0.010	0.001	0.000
2:3	Positif	0.000	0.001	0.979	0.020
2:4	Non génotypé	0.985	0.010	0.005	0.000
2:5	Positif	0.000	0.000	0.963	0.037
2:6	Non génotypé	0.958	0.027	0.015	0.000
2:7	Non génotypé	0.482	0.010	0.498	0.010
2:8	Non génotypé	0.980	0.010	0.010	0.000
2:9	Positif	0.000	0.001	0.972	0.027
2 : 10	Non génotypé	0.985	0.014	0.001	0.000
3:1	Positif	0.000	0.004	0.993	0.003
3:2	Positif	0.000	0.004	0.993	0.003
3:3	Négatif	1.000	0.000	0.000	0.000
3:4	Non génotypé	0.486	0.004	0.506	0.004
3:5	Non génotypé	0.486	0.004	0.506	0.004
3:6	Non génotypé	0.486	0.004	0.506	0.004
3:7	Positif	0.000	0.972	0.014	0.014
3:8	Positif	0.000	0.972	0.014	0.014
3:9	Positif	0.000	0.974	0.013	0.013
3 : 10	Non génotypé	0.760	0.008	0.230	0.002
3 : 11	Non génotypé	0.729	0.007	0.261	0.003
3 : 12	Non génotypé	0.482	0.510	0.004	0.004
3 : 13	Positif	0.000	0.990	0.005	0.005

Tableau 11: Distribution marginale a posteriori $i \mathbb{P}(G_i = x|ev)$ calculée avec la méthode BP (résultat de bped), dans le cadre de l'utilisation de la covariable POO. Les probabilités (G_i) des individus génotypés sont représentées en gras.

1.2. Prise en compte du recensement

Les critères de recensement dépendent généralement du modèle génétique de la maladie. Dans les maladies mendéliennes, le fait de recenser les familles sur l'existence d'un atteint fournira des familles comportant des individus porteurs d'une mutation délétère et permettra l'estimation de la pénétrance. De plus, comme tous les individus affectés sont nécessairement porteurs de la mutation, les familles ainsi identifiées sont adaptées pour une estimation de la fonction de survie. Un des inconvénients de cette procédure est que la fonction de survie peut être surestimée si le mode de sélection de ces familles n'est pas pris en compte. De plus, ce type de critère indépendant de l'histoire familiale est plus facile à modéliser que les critères dépendant de l'histoire familiale dans le cadre d'une estimation du risque de maladie. Une correction a déjà été proposée afin de fournir des estimations de survie valides (Le Bihan et al., 1995 ; Alarcon et al., 2009). Dans ces applications, le biais de recensement a été corrigé par une méthode classique qui consiste à supprimer les informations phénotypiques de l'individu (cas index) qui a permis de sélectionner la famille tout en conservant son information génotypique. Dans une étude réalisée par Alarcon et al., 2009, deux méthodes permettant de corriger ce biais ont été étudiées sur des familles sélectionnées sur l'existence d'au moins un atteint :

1. La Vraisemblance prospective qui tient compte de la sélection en modélisant explicitement les critères de sélection (Planté-Bordeneuve et al. 2003)
2. La Proband's phenotype Exclusion Likelihood (ou PEL), qui corrige pour la sélection en « retirant » l'information phénotypique apportée par le cas index.

Ces méthodes ont été testées sur des familles simulées sous différents modèles de maladie (mono-génique, sous-entité monogénique) et sous différents schémas de sélection. A travers cette étude, ils ont montré que la méthode optimale dépend à la fois du modèle génétique et des critères de sélection, car les résultats obtenus sont dépendants de la méthode utilisée. Contrairement à la PEL, les méthodes prospectives et rétrospectives nécessitent une modélisation parfois complexe et des paramètres supplémentaires qui sont parfois difficiles à modéliser. Notons,

également qu'il existe la méthode de vraisemblance rétrospective. Cette méthode est basée sur la modélisation de la distribution des génotypes conditionnellement aux phénotypes et corrige pour le biais de sélection sans avoir à modéliser explicitement les critères de sélection. Néanmoins, cette méthode rétrospective est peu efficace selon l'étude de Kraft et Thomas (Kraft and Thomas 2000). Dans notre contexte, nous avons appliqué la méthode PEL, car elle est simple à appliquer sur les familles. Elle est instantanée et ne nécessite pas de calcul de probabilités du recensement.

II. Résultats

1. Descriptions des familles répertoriées dans notre population ATTRv en France.

1.1. Descriptions des familles ATTRv en France

Les données d'épidémiologie génétiques diffèrent de façon importante d'un foyer à l'autre. Des différences génotypiques et phénotypiques sont observées en termes d'âges de début et de présentation clinique de la maladie (Parman et al., 2016). Dans notre centre expert (CHU Henri Mondor), 32 mutations TTR ont été répertoriées dans 285 familles d'origine portugaise, française ou autre (Algérie, Chypre, Côte d'Ivoire, Espagne, Gabon, Guinée, Italie, Tunisie et Vietnam). Parmi elles, 92 sont d'origine portugaise porteuses du variant TTRV30M (N=90) ou TTRV28M (N=2) (tableau 12). Dans les familles ATTRV30M, 326 individus présentent une mutation du gène TTRV30M ; 256 (161 hommes) patients et 70 (41 hommes) porteurs sains. L'âge de début moyen des symptômes est de 35 ±10 [extrêmes : 20-79] ans. 82 % des patients présentaient une histoire familiale. Le tableau clinique est celui d'une polyneuropathie axonale distale d'évolution lente avec dysautonomie. Les 2 familles ATTRV28M incluent 6 (5 hommes) patients et 4 (3 hommes) porteurs asymptomatiques. Leur phénotype est comparable aux patients ATTRV30M d'origine portugaise. Plus de 80% des familles portugaises sont originaires du Nord du Portugal, zone où la prévalence est élevée.

a)

Nom (Variant incluant les 20-aa du signal peptide)	Variant de séquence (ARNm)	Substitution nucléotidique	Localisation	Nombre de famille (N=92)
TTRVal30Met (p.Val50Met)	c.148G>A	GTG>ATG	Exon 2	90
TTRVal28Met (p.Val48Met)	c.142G>A	GTG>ATG	Exon 2	2

b)

Variant-TTR	TTRVal30Met	TTRVal28Met
Nombre de familles	90	2
Atteints (Hommes)	256 (161)	6(5)
Porteurs sains (Hommes)	70 (41)	4(3)
Moyenne Age de début ± Ecartype [Intervalle]	35 ±10 [20-79]	45 ± 15 [25-72]

Tableau 12: a) Mutations TTR identifiées dans les familles d'origine portugaises ATTRv en France ; b) Caractéristiques des familles d'origine portugaises ATTRv.

Les familles françaises et d'autres origines (N=193) présentent une hétérogénéité génotypique, avec 31 variants TTR identifiés. La répartition des familles est détaillée dans le tableau 13. Les variants les plus fréquents sont : TTRV30M (31% des familles), TTRS77Y (15%), TTRV122I (15%), TTRI107V (10%) et TTRS77F (7%) (figure 34). Parmi les 603 individus porteurs d'une mutation, 448 (281 hommes) sont symptomatiques et 155 (72 hommes) sont asymptomatiques. Dans ces familles, seulement 36% présentaient une histoire familiale. L'âge de début moyen est de 55 ±14 [extrêmes : 16-79] ans. La plupart des variants sont associés à des phénotypes neurologiques et cardiaques. Certaines mutations (TTRH88R, TTRV122I) sont associées à une atteinte cardiaque au premier plan, débutant après 60 ans (Cf : 5.1.3. Formes cliniques et corrélations phéno-génotypique).

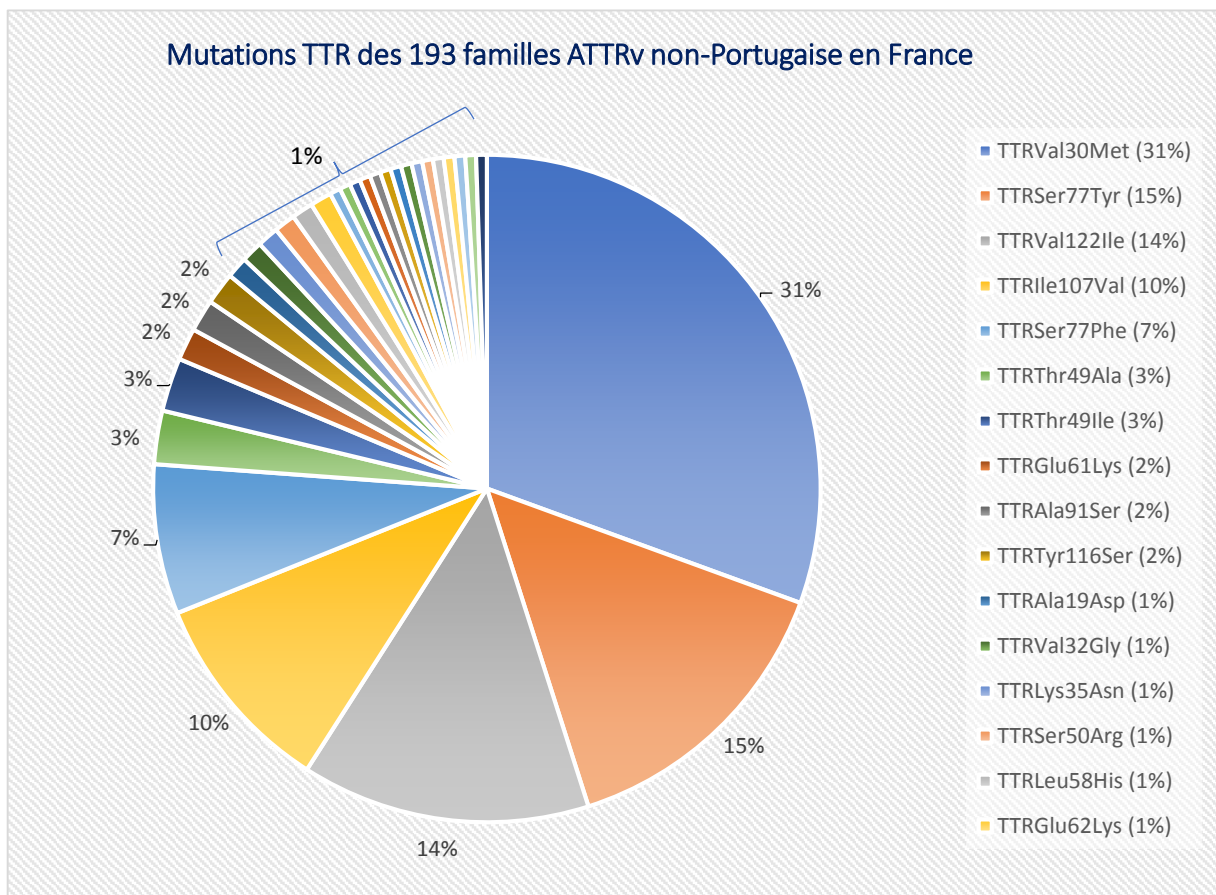


Figure 34: Répartition des mutations des 193 familles ATTRv non portugaises en France.

Nom (Variant incluant les 20-aa du signal peptide)	Variant de séquence (ARNm)	Substitution nucléotidique	Localisation	Nombre de famille (N=193)
Val30Met (p.Val50Met)	c.148G>A	GTG>ATG	Exon 2	59
Ser77Tyr (p.Ser97Tyr)	c.290C>A	TCT>TAT	Exon 3	28
Val122Ile (p.Val142Ile)	c.424G>A	GTC>ATC	Exon 4	27
Ile107Val (p.Ile127Val)	c.379A>G	ATT>GTT	Exon 4	19
Ser77Phe (p.Ser97Phe)	c.290C>T	TCT>TTT	Exon 3	14
Thr49Ala (p.Thr69Ala)	c.205A>G	ACC>GCC	Exon 3	5
Thr49Ile (p.Thr69Ile)	c.206C>T	ACC>ATC	Exon 3	5
Glu61Lys (p.Glu81Lys)	c.241G>A	GAG>AAG	Exon 3	3
Ala91Ser (p.Ala111Ser)	c.331G>T	GCA>TCA	Exon 3	3
Tyr116Ser (p.Tyr136Ser)	c.407A>C	TAT>TCT	Exon 4	3
Ala19Asp (p. Ala39Asp)	c.116C>A	GCT >GAT	Exon 2	2
Val32Gly (p.Val52Gly)	c.155T>G	GTG>GGG	Exon 2	2
Lys35Asn (p.Lys55Asn)	c.165G>C or T	AAG>AAC/T	Exon 2	2
Ser50Arg (p.Ser70Arg)	c.210T>A	AGT>AGA	Exon 3	2
Leu58His (p.Leu78His)	c.233T>A	CTC>CAC	Exon 3	2
Glu62Lys (p.Glu82Lys)	c.243G>A	GAG>AAG	Exon 3	2
Cys10Arg (p.Cys30Arg)	c.88T>C	TGT>CGT	Exon 2	1
Arg21Gln (p.Arg41Gln)	c.122G>A	CGA>CAA	Exon 2	1
Val32Ala (p.Val52Ala)	c.155T>C	GTG>GCG	Exon 2	1
Glu42Asp (p.Glu62Asp)	c.186G>C or T	GAG>GAC/T	Exon 2	1
Phe44Tyr (p.Phe64Tyr)	c.191T>A	TTT>TAT	Exon 2	1
Gly47Ala (p.Gly67Ala)	c.200G>C	GGG>GCG	Exon 2	1
Gly47Arg (p.Gly67Arg)	c.199G>A	GGG>AGG	Exon 2	1
Glu54Lys (p.Glu74Lys)	c.220G>A	GAG>AAG	Exon 3	1
Ile68Leu (p.Ile88Leu)	c.262A>T/C	ATA >C/TTA	Exon 3	1
His88Arg (p.His108Arg)	c.323A>G	CAT>CGT	Exon 3	1
Val71Ala (p.Val91Ala)	c.272T>C	GTG>GCG	Exon 3	1
Glu89Gln (p.Glu109Gln)	c.325G>C	GAG>CAG	Exon 3	1
Glu89Lys (p.Glu109Lys)	c.325G>A	GAG>AAG	Exon 3	1
Val94Ala (p.Val114Ala)	c.341T>C	GTA>GCA	Exon 4	1
Arg103His (p.Arg123His)	c.368G>A	CGC>CAC	Exon 4	1

Tableau 13: Mutations TTR identifiées dans les 193 familles ATTRv en France (Classement par ordre de fréquence).

1.2. Répartition géographique des familles ATTRv en France et sa métropole.

En France, les familles ATTRV30M sont réparties sur l'ensemble du territoire. Il existe des foyers pour certaines mutations comme la région Nord pour la plupart des familles ATTRS77Y. Cinq des 14 familles ATTRS77F vivent dans les régions du sud-est de la France. Dix des 19 familles ATTRI107V sont originaires des Antilles

françaises (Martinique, Guadeloupe, Haïti...). Parmi les 27 familles ATTRV122I, 13 viennent aussi des Antilles et neuf sont originaires d'Afrique (Gabon, Guinée, Côte d'Ivoire...). Parmi elles, cinq familles présentent des individus homozygotes pour la mutation TTRI122V. Toutes les familles ATTRT49I sont originaires d'Afrique du Nord (Algérie). La répartition géographique des familles ATTRv est présentée dans l'annexe 3.

2. Données familiales utilisées pour l'estimation du risque de maladie

Ce travail a été réalisé en collaboration avec 5 centres experts ;

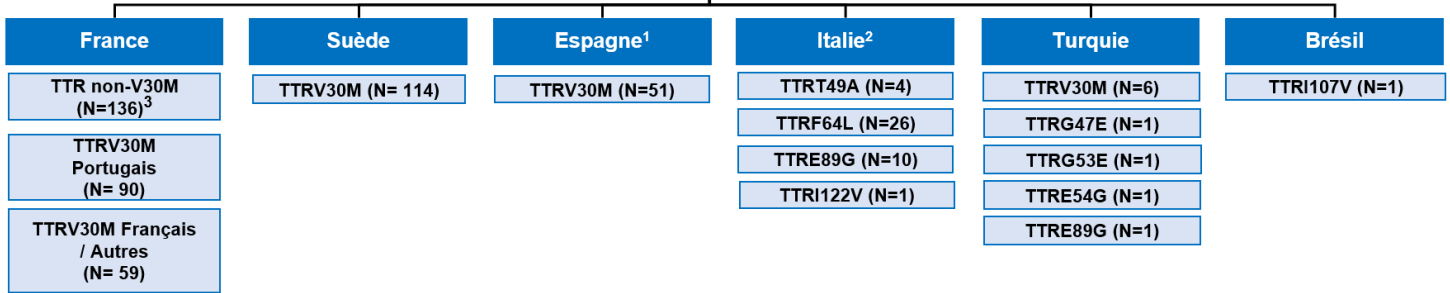
- **Espagne** (Majorque-Hôpital Universitaire de Son Llätzer)
- **Brésil** (Université fédérale de Rio de Janeiro)
- **Italie** (Sicile-Hôpital AOU Policlinico)
- **Suède** (Hôpital Universitaire d'Umeå)
- **Turquie** (Hôpital Universitaire d'Istanbul).

A Majorque, le variant TTRV30M est le seul variant identifié dans les familles. Une des caractéristiques de cette population est la présence de patients avec un âge de début > 50 ans ou < à 50 ans au sein d'une même famille. Chez ces patients, l'âge de début moyen est de 47 ans [extrêmes : 23–79] et la neuropathie périphérique est l'atteinte inaugurale la plus fréquente (Buades-Reinés et al., 2016). Au Brésil, la mutation TTRV30M est retrouvée dans 91% des cas. D'autres mutations ont été rapportées telles que TTRI107V, TTRV122I, TTRA19D et TTRG53E. Le phénotype des patients ATTRV30M est similaire à celui décrit au Portugal, caractérisée par un âge de début < à 50 ans (34.5 ± 8.1) (Saporta et al., 2009b; Waddington-Cruz et al., 2019). En Suède, pour la mutation TTRV30M, l'âge de début moyen est de 60 ± 14 ans [extrêmes : 23-85](Gorram, Olsson et al., 2020). Ces familles sont localisées au nord du pays où la fréquence de l'allèle TTRV30M atteint 2% (Olsson et al., 2014). Une caractéristique de la population suédoise ATTRv est la présence élevée de patients homozygotes TTRV30M dans les familles, estimée à 1,1 % (Olsson M, données non publiées). Le phénotype des patients ATTRV30M suédois est similaire à celui des patients ATTRV30M d'origine française (Cf : 5.1.3 Formes cliniques et corrélations phéno-génotypiques). Plus récemment, 14 mutations TTR (telles que TTRA45S, TTRG57A et TTRH88A) ont été rapportées (Suhr et al., 2017). En Italie,

la mutation TTRV30M est détectée chez 1/4 des patients, originaires du nord (Rapezzi et al., 2013). Dans le sud du pays (Sicile), seulement 3 variants (TTRE89Q, TTRF64L et TTRT49A) sont détectés dans les familles. Les patients ATTRE89Q présentent un âge de début moyen de 49 ± 7.9 [extrêmes : 37–66]. Ils sont caractérisés par une neuropathie peu sévère et une atteinte cardiaque précoce. Dans les familles ATTRF64L, l'âge de début moyen est de 64.1 ± 7.4 [extrêmes : 44–75] avec une neuropathie périphérique sévère. Enfin, les familles ATTR49A se distinguent par des troubles du SNA comme symptômes inauguraux pouvant être isolés pendant plusieurs années (Cf : figure 8) (Mazzeo et al., 2015). En Turquie, les familles identifiées sont porteuses des mutations TTRV30M, TTRE89Q, TTRG53E, TTRE54G et TTRG47E (Durmuş-Tekçe et al., 2016).

Au total, des données généalogiques et cliniques ont été recueillies pour 502 familles ATTRv (figure 35). Les caractéristiques des familles sont représentées dans le tableau 14. Parmi elles 92, ont été exclues ; 82 en raison du manque d'informations disponibles et 10 familles suédoises qui incluaient des individus homozygotes. Les individus âgés de moins de 16 ans n'ont pas été considérés en raison de l'absence de description de la maladie avant cet âge dans la littérature. Pour l'étude, 342 familles hétérozygotes non apparentées et porteuses des variants TTRV30M (France, Espagne, Portugal, Suède), TTRT49A, TTRS77Y, TTRS77P et TTRI107V ont été analysées. Les caractéristiques des familles sont détaillées dans le tableau 14. Le groupe ATTRT49A regroupe 5 familles de France et 4 familles de Sicile. Le groupe ATTRE89Q comprend 8 familles de Sicile et 1 famille de Turquie. Enfin, le groupe ATTRI107IV inclus 1 famille brésilienne et 14 familles françaises. Cette population, par son nombre a permis de préciser des caractéristiques telles que l'âge de début des symptômes, le sexe-ratio et le risque de maladie dans les familles ATTRV30M et ATTRv non-V30M. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans la partie 3.

**Données généalogiques
503 familles ATTRv**



N: Nombre de famille; TTR: Transthyrétine; 1. Région de Majorque; 2. Région de Sicile; 3. Les mutations TTR non-V30M sont listées dans le tableau 10.

Figure 35: Organigramme des familles ATTRv.

Variant TTR	Nombre de famille (Sujets)	Patients (Homme)	Porteurs sains (Homme)	Age de début moyen ± Ecartype [Intervalle]	Age de début (N < 5)
Cys10Arg	1 (9)	1 (0)	0	-	70
Ala19Asp	2 (50)	2 (1)	1 (1)	-	50, 66
Arg21Gln	1 (26)	1(1)	0	-	76
Val28Met	2 (65)	6 (5)	4 (3)	45 ± 15 [25-72]	-
Val30Met – Espagnoles (Majorque)	51 (944)	123 (53)	150 (88)	50 ±15 [22-79]	-
Val30Met - Français	59 (1250)	113 (76)	58 (27)	57 ±12 [20-78]	-
Val30Met - Portugais	90 (1310)	256 (161)	70 (41)	35 ±10 [20-79]	-
Val30Met – Suédois (Hétérozygotes)	104 (1820)	452 (275)	139 (47)	59 ±14 [22-92]	-
Val30Met – Suédois (Homozygotes)	10 (274)	50 (31)	43 (19)	58 ±9 [39-76]	-
Val30Met – Turques	6 (88)	11(5)	5 (2)	47 ±12 [62-35]	-
Val32Ala	1 (12)	3 (2)	1 (1)	-	-
Val32Gly	2 (82)	14 (9)	0	-	31, 35, 39
Lys35Asn	2 (23)	2 (2)	0	-	40
Glu42Asp	1 (45)	1 (1)	1 (1)	-	53
Phe44Tyr	1 (21)	1 (1)	0	-	65
Gly47Ala	1 (10)	6 (3)	3 (1)	-	60
Gly47Arg	1 (20)	1 (0)	0	-	50
Gly47Glu	1 (10)	4 (2)	0	-	27, 28, 42
Thr49Ala	9 (213)	36 (16)	8 (3)	45 ±7 [30-66]	-
Thr49Ile	5 (50)	8(5)	3(1)	-	55, 58, 62, 70
Ser50Arg	2 (74)	13 (8)	0	-	41, 45, 48, 50
Gly53Glu	1 (27)	5 (3)	1(0)	-	32, 33
Glu54Gly	1 (15)	3 (3)	0	-	22, 23, 35, 52
Glu54Lys	1 (10)	1 (0)	0	-	39
Leu58His	2 (20)	2 (2)	0	-	56
Glu61Lys	3 (63)	4 (2)	3(2)	-	66, 71, 72, 75
Glu62Lys	2 (42)	2 (2)	0	-	67, 84
Phe64Leu	26 (230)	41(36)	11(2)	64 ± 9 [42-79]	-
Ile68Leu	1 (35)	2 (1)	0	-	69
Val71Ala	1 (13)	4 (2)	0	36±4 [36-40]	-
Ser77Phe	14 (210)	37(25)	10 (5)	60 ± 7 [51-75]	-
Ser77Tyr	28 (503)	73 (46)	22 (7)	58 ± 7 [35-73]	-
His88Arg	1 (25)	3 (2)	0	-	47, 48
Glu89Gln	12 (192)	47 (26)	18 (7)	49 ±9 [37-78]	-
Glu89Lys	1 (11)	1(0)	0	-	64
Ala91Ser	3 (58)	8 (6)	4(2)	64± 5 [57-72]	-
Val94Ala	1 (8)	1(0)	1(0)	-	65
Arg103His	1 (31)	1(1)	0	-	-
Ile107Val	20 (340)	36 (27)	11 (5)	60 ±4 [53-79]	
Tyr116Ser	3 (75)	4 (1)	2 (1)	-	57, 73, 74, 74
Val122Ile	28 (528)	37 (28)	15 (9)	66 ±12 [55-80]	

Tableau 14: Caractéristiques des familles ATTRv.
N : Nombre ; (-) Donnée non disponible.

3. Publications

3.1. Etude 1 : Estimation du risque de maladie dans notre population d'ATTRv en utilisant une approche non paramétrique (NPSE)

Affiner les estimations du risque de maladie des 4 principaux variants pathogènes de la polyneuropathie amyloïde héréditaire à transthyréline (TTR-FAP) en utilisant une nouvelle approche non paramétrique (NPSE).

Gorram F, Alarcon F, Perdry H, Hébrard B, Damy T, Fanen P, Funalot B, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. Amyloid. 2017 Mar;24(sup1):115-116.

En 2003, notre équipe a publié une première étude d'estimation du risque de maladie dans laquelle ils ont relevé des différences de risque entre les familles Portugaises et Françaises porteuses de la mutation TTRV30M (Planté-Bordeneuve et al., 2003). Le risque de maladie a été estimée en utilisant une méthode paramétrique, la PEL (Proband's Exclusion Likelihood), dans laquelle l'âge de début est modélisé par la loi de Weibull (Alarcon et al., 2009). Cependant, cette méthode fournit des estimations biaisées lorsque la fonction de pénétrance est éloignée de la distribution de Weibull. Pour éviter ce biais, nous avons développé une approche non-paramétrique basée sur une analyse de survie (estimateur de Kaplan-Meier) qui s'adapte à toute forme de donnée et l'avons testée sur une cohorte de 64 familles ATTRV30M d'origine Portugaise (figure 36) (Alarcon et al., 2018). Ensuite, nous avons utilisé cette approche non-paramétrique pour estimer le risque de maladie des mutations TTR les plus fréquentes de notre population. Les données généalogiques publiées dans l'article de 2003 (Planté-Bordeneuve et al., 2003) ont été enrichies avec de nouvelles familles. Le risque de maladie a été estimée pour les 4 variants TTR les plus fréquents de notre population ATTRv : TTRV30M, TTRSer77Tyr, TTRlle107Val et TTRSer77Phe. L'étude a été réalisée sur un total de 71 familles (1654 individus), porteuses des mutations TTRV30M (35 familles), TTRSer77Tyr (15), TTRlle107Val (12) et TTRSer77Phe (9). L'âge moyen de début de la maladie (\pm écart-type) était de 54 ± 14 ans pour la mutation TTR V30M, 55 ± 9 ans pour TTRSer77Tyr, 58 ± 6 ans pour TTRSer77Phe et 62 ± 6 ans pour TTRlle107Val. Le risque de maladie était significativement différent entre les 4 variants de TTR ($p=0.003$) (figure 37). Pour toutes les mutations, le risque de maladie était pratiquement nul jusqu'à l'âge de 50 ans, sauf dans le groupe

TTRV30M, où elle augmentait progressivement de 3% (à 30 ans) à 16% (à 50 ans) et finissait par atteindre 64% à 80 ans. En revanche, dans les mutations TTR non-V30M, le risque augmentait à partir de 50 ans. Chez les porteurs de ATTRSer77Phe et ATTRSer77Tyr, à 50 ans ce risque passait de 7 % et 12% à 65% et 71% à l'âge de 70 ans. Les familles ATTRIle107Val présentaient les valeurs de pénétrance les plus faibles. Cette étude a permis de mettre en évidence une différence de risque entre les variants TTR analysés. Ces données permettront d'ajuster la gestion des porteurs asymptomatiques afin de diagnostiquer plus tôt la maladie et d'instaurer un traitement. La méthode non-paramétrique a permis d'obtenir des estimations du risque plus précises par rapport à la PEL utilisée précédemment.

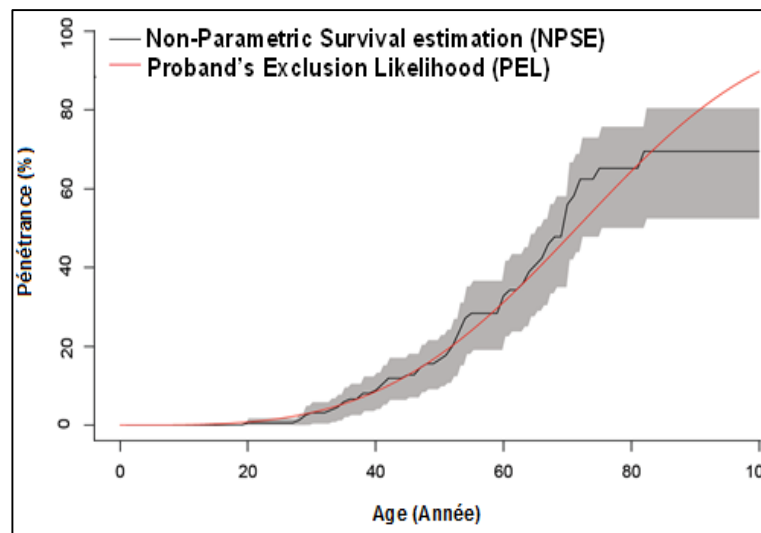


Figure 36: Comparaison de la méthode paramétrique et non paramétrique sur une cohorte de familles françaises ATTRV30M.

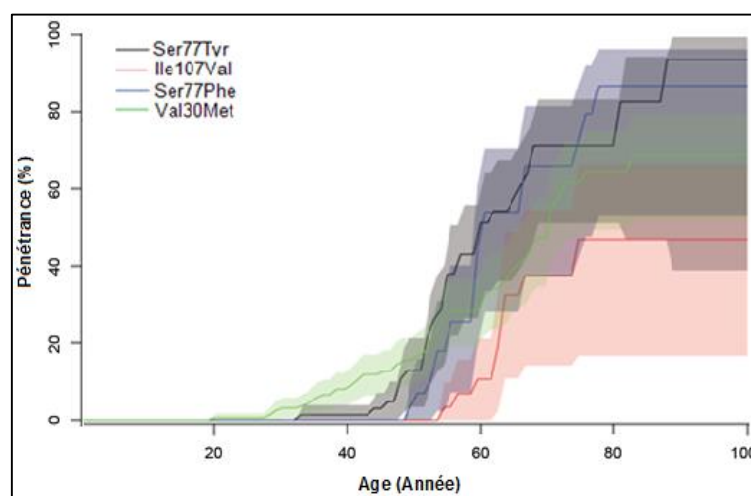


Figure 37: Estimation du risque de maladie selon le variant TTR (NPSE).

→ Article 1 : Gorram F et al. 2017



Amyloid
The Journal of Protein Folding Disorders



ISSN: 1350-6129 (Print) 1744-2818 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/iamy20>

Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE)

Farida Gorram, Flora Alarcon, Hervé Perdry, Bérénice Hébrard, Thibaud Damy, Pascale Fanen, Benoît Funalot, Gregory Nuel & Violaine Planté-Bordeneuve

To cite this article: Farida Gorram, Flora Alarcon, Hervé Perdry, Bérénice Hébrard, Thibaud Damy, Pascale Fanen, Benoît Funalot, Gregory Nuel & Violaine Planté-Bordeneuve (2017) Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE), *Amyloid*, 24:sup1, 115-116, DOI: [10.1080/13506129.2017.1293515](https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1293515)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/13506129.2017.1293515>



Published online: 22 Apr 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 7



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iamy20>

Download by: [Cornell University Library]

Date: 15 May 2017, At: 15:32

Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE)

Farida Gorram^{1,2,3}, Flora Alarcon⁴, Hervé Perdry⁵, Bérénice Hébrard⁶, Thibaud Damy^{2,3,7}, Pascale Fanen^{3,6}, Benoît Funalot^{3,6,8}, Gregory Nuel⁹, and Violaine Planté-Bordeneuve^{1,2,3}

¹Department of Neurology, Henri Mondor University Hospital, AP-HP, Créteil, France, ²Amyloid Network, Amyloid RESEARCH INSTITUTE, Créteil, France, ³Paris-Est Créteil University, Créteil, France, ⁴Laboratory MAP5 UMR CNRS 8145, Paris Descartes University, France, ⁵UMR-S 669 – Inserm, U669, University Paris-Sud, Villejuif, France, ⁶Department of Genetics, Henri Mondor University Hospital, AP-HP, Créteil, France, ⁷Department of Cardiology, Henri Mondor University Hospital, AP-HP, Créteil, France, ⁸Inserm U.955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France, and ⁹Institute of Mathematics, National Center for French Research, Laboratory of Probability, University Pierre et Marie Curie, Sorbonne University, Paris, France

Background

Significant variability of phenotype and age of onset are well known in TTR-FAP associated to a wide spectrum of pathogenic TTR variants, among which Val30Met is the most frequent [1,2]. Recently, new therapeutic options became available that should be administered from the very onset of symptoms. In this context, the knowledge of the risk of being symptomatic for mutation carriers (penetrance) is essential to adjust the follow-up of carriers and for patient management [3,4]. This study aims to refine penetrance estimates in the main pathogenic variants encountered in our TTR-FAP population using a newly developed non parametric approach named NPSE for Non-Parametric Survival Estimate.

Materials and methods

A systematic genealogical enquiry was carried out in each family assessed in our center. Relevant data were collected with special attention to the genotype, phenotype, age at onset (AO) for affected individuals and age at last news for asymptomatic carriers and relatives. Portuguese families were not included in this study.

In previous works, we estimated penetrance as function of age, using a parametric survival method the PEL (Proband's Exclusion Likelihood) [5] in which the AO is modeled by a Weibull distribution (WD). However, such method does not fit properly when penetrance function is far from WD. To avoid this bias, we have developed a non-parametric approach NPSE [6] based on a survival analysis (Kaplan–Meier estimator) that fits any penetrance shape. Also, NPSE can take into account covariates, here the TTR variant.

Results

We obtained genealogical data from 71 unrelated kindreds, including Val30Met (35 families, 90 patients), Ser77Tyr (15 families, 47 patients), Ile107Val (12 families, 21 patients), Ser77Phe (9 families, 30 patients) with information on 1654 subjects (188 affected/115 asymptomatic carriers).

Mean age at onset (\pm Standard Deviation) was 54.6 years (\pm 14.9) for Val30Met, 55.6 years (\pm 9.1) for Ser77Tyr, 58.7 years (\pm 6.4) for Ser77Phe and 62.3 years (\pm 6.8) for Ile107Val.

Penetrance estimates were significantly different between the 4 TTR variants tested ($p = 0.003$) and remained incomplete in elderly. Hence, at 80 years of age, penetrance (95% Confidence Interval) varies from 46.9% (16.6–66.2) in Ile107Val to 71.3% (51.1–83.1) for Ser77Tyr kindred.

The disease risk is virtually null up to the age of 50 years for all variants except in the Val30Met group, where it increases progressively from 3.1% (95% CI, 0.3–5.7) at 30 years to 16.5% (9.8–22.7) at 50 and 64.4% (49.4–74.9) at 80 years old. In contrast, in non-Val30Met variant subsets, the risk increased after 50 years old. In Ser77Phe and Ser77Tyr carriers, it raised from 7% (0.8–15.8) and 12.8% (3.3–21.4) respectively to 65.8% (37.1–81.4) and 71.3% (51.1–83.1) at 70 years of age. Risk estimate was found the lowest in Ile107Val families where it increased progressively from age 50 years to 37.5% (14.2–54.4) at 70 y-o.

Discussion and conclusions

This study showed significant differences of penetrance profiles in TTR-FAP kindred with various pathogenic mutations. The results should be implemented to larger samples of families. Such data will allow adjust the management of asymptomatic carriers with different TTR-variants in order to reach earlier the diagnosis and treatment. NPSE method is more accurate and powerful to assess penetrance than PEL previously used. In future studies, we will test NPSE to

Address for correspondence: Violaine Planté-Bordeneuve of Department of Neurology, Henri Mondor University Hospital, AP-HP, Créteil, France. E-mail: violaine.plante@aphp.fr

explore the effect of other covariates, like gender, parent of origin on disease expression.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

1. Plante-Bordeneuve V, Carayol J, Ferreira A, Adams D, Clerget-Darpoux F, Misrahi M, Said G, et al. Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families. *J Med Genet* 2003;40:e120.
2. Plante-Bordeneuve V, Said G. Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol* 2011;10:1086–97.
3. Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaiti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 2008;15:181–6.
4. Saporta MA, Zaros C, Cruz MW, André C, Misrahi M, Bonaiti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy (type I) in Brazilian families. *Eur J Neurol* 2009;16:337–41.
5. Alarcon F, Bourgain C, Gauthier-Villars M, Plante-Bordeneuve V, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C. PEL: an unbiased method for estimating age-dependent genetic disease risk from pedigree data unselected for family history. *Genet Epidemiol* 2009;33:379–85.
6. Alarcon F, Nuel G, Plante-Bordeneuve V. Non parametric survival estimation for pedigrees. 2016 [cited 2016 Jul 14]. Available from: <https://arxiv.org/abs/1607.04215>.

3.2. Etude 2 : Estimation du risque de maladie et données génétiques des familles ATTRV30M suédoises

Nouvelles données sur le profil génétique et la pénétrance de l'amylose héréditaire à Transthyréline Val30Met (ATTRV30M) en Suède.

Farida Gorram et Malin Olsson, Flora Alarcon, Gregory Nuel, Intissar Anan and Violaine Plante-Bordeneuve

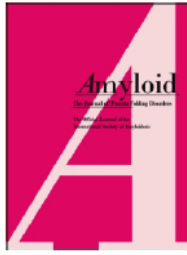
Initialement, la maladie a été décrite dans le nord du Portugal, puis au Japon et en Suède. Dans ces trois pays, les familles sont majoritairement porteuses de la mutation TTRV30M. En Suède, la plupart des familles touchées vivent dans la partie nord du pays. En 2016, la prévalence des patients atteints de la mutation TTRV30M a été estimée à 253 cas pour 9,8 millions d'habitants, avec une moyenne de 35 nouveaux cas par an. L'âge de début est tardif environ 56 ans. Une des caractéristiques de la population Suédoise est la présence élevée de patients homozygotes ATTRV30M, estimée à 1,1%. Dans les précédents travaux de pénétrance publiés par notre équipe en 2008 sur 77 familles Suédoises ATTRV30M en utilisant une méthode paramétrique, le risque de maladie est apparue plus faible que dans les autres populations ATTRV30M. Le rôle des différentes covariables comme le sexe du sujet ou encore le sexe du parent transmetteur sur les risques de la maladie a été étudié en stratifiant les familles. Un effet du sexe du parent transmetteur a été mis en évidence.

Dans ce contexte, nous avons cherché à affiner nos connaissances sur les aspects génétiques, la pénétrance et les facteurs susceptibles d'influencer le risque de maladie en Suède. Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques génétiques et confirmé la présence d'une anticipation. Dans un second temps, nous avons estimé la pénétrance globale et selon différentes covariables en utilisant la NPSE.

L'étude a été réalisée sur un total de 114 familles Suédoises ATTRV30M, dont 10 familles homozygotes. Dans les familles hétérozygote et homozygote, l'âge de début de la maladie était tardif 60 ± 14 ans [23-85] et 58 ± 9 ans [39-76], respectivement. Parmi les 131 paires parents-enfants atteints, nous avons identifié une anticipation moyenne de 11 ± 10 ans. L'anticipation était plus élevée en cas de transmission maternelle (13 ± 8 ans) par rapport à la transmission paternelle (7 ± 11 ans) ($p < 0,003$). En excluant les biais de sélection suivant : 1) les paires

contenant le cas index ; 2) les descendants nés après 1967; 3) en considérant qu'une seule paire par famille pour garantir l'indépendance des paires, l'anticipation est restée significative. Pour l'ensemble des 104 familles, le risque de maladie était inférieure à 10 % jusqu'à l'âge de 40 ans, puis augmentait progressivement à 15 % à 50 ans, jusqu'à atteindre 71% à 90 ans. Le risque diffère significativement lorsque nous prenions en compte le sexe comme covariable. Le risque était plus élevé chez les hommes. En tenant compte du sexe du parent transmetteur, le risque de maladie était significativement plus élevée en cas de transmission maternelle ($p < 0,01$). Aucune différence du risque n'a été observée entre les 4 régions de Suède (Skellefteå, Piteå, Lycksele, Kalix) et le statut génotypique (individus hétérozygotes versus individus homozygotes). Cette étude a permis de fournir de nouvelles données sur l'anticipation et le risque de maladie des familles ATTRV30M de Suède. Notamment, l'influence du sexe du parent transmetteur sur l'expression de la maladie. Sur le plan clinique, ces résultats sont importants pour orienter la gestion des familles et le suivi des porteurs de mutations TTRV30M Suédois.

→ Article 2 : Gorram F, Olsson M et al. 2020



Amyloid
The Journal of Protein Folding Disorders



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iamy20>

New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden

Farida Gorram , Malin Olsson , Flora Alarcon , Gregory Nuel , Intissar Anan & Violaine Planté-Bordeneuve

To cite this article: Farida Gorram , Malin Olsson , Flora Alarcon , Gregory Nuel , Intissar Anan & Violaine Planté-Bordeneuve (2020): New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden, *Amyloid*, DOI: [10.1080/13506129.2020.1841623](https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1841623)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1841623>



Published online: 04 Nov 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)





View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden

Farida Gorram^{a,b,*}, Malin Olsson^{c,d,*}, Flora Alarcon^e, Gregory Nuef^f, Intissar Anan^{c,d}  and
Violaine Planté-Bordeneuve^{a,b} 

^aDepartment of Neurology, Henri Mondor University Hospital, APHP, Créteil, France; ^bUniversity Paris Est- Créteil, INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale(IMRB), Créteil, France; ^cDepartment of Public Health and Clinical Medicine/Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden; ^dWallenberg Centre for Molecular Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden; ^eLaboratory MAP5 UMR CNRS 8145, Paris Descartes University, Paris, France; ^fStochastics and Biology Group, Department of Probability and Statistics (LPSM, CNRS 8001), Sorbonne University, Campus Pierre et Marie Curie, Paris, France

ABSTRACT

Introduction: Hereditary transthyretin (ATTRv) amyloidosis is of autosomal dominant transmission, caused by a spectrum of mutations in the transthyretin (TTR) gene. The ATTRV30M (p.Val50Met) is the most frequent substitution in Europe. Northern Sweden is a known cluster for ATTRV30M amyloidosis patients due to high prevalence of the mutation rate, with homozygous cases. First symptoms occur generally during the 6th decade. Previous studies reported low penetrance in this area and possible anticipation in families. In order to refine our knowledge of the genetic aspects, penetrance and factors that influence the disease's risk, we performed a comprehensive study of ATTRV30M families in Sweden.

Methods: To assess anticipation, well-established age at onset (AO) was compared in all informative parent-offspring pairs and in subgroups, after excluding ascertainment biases. Penetrance was estimated using a non-parametric method that enables to study covariates' effect on the disease's risk.

Results: We analysed 114 ATTRV30M Swedish families, including 12 homozygous individuals. Among 131 parent-offspring pairs, we found an average anticipation of 11.7 [Standard Deviation (SD) =10.03] years, higher in case of maternal transmission (mean±SD = 13.7±8.4 years), compared to paternal transmission (mean±SD = 7.9±11.5 years, $p < .003$). Anticipation remained significant, after exclusion of ascertainment biases. In heterozygous ATTRV30M kindred, penetrance was low, estimated below 10% [95% confidence interval (CI) = 6–10] at 40 years-old, increasing to 71% [95% CI= 65–76] at age 90 years. The risk was found to be higher in male patients ($p < .01$) and in case of maternal transmission ($p < .01$), reflecting a parent of origin effect. We observed no difference of penetrance according to the geographical origin. Finally, the disease risk was similar in heterozygous and homozygous ATTRV30M amyloidosis individuals.

Conclusions: Our study provides new data on the genetics of ATTRV30M families in Sweden, including the occurrence of anticipation and on penetrance. Both are increased in case of maternal inheritance and in male patients. Overall, gender seems to be a factor that substantially modulates the AO of the disease, in this area. Clinically, these findings are of importance to guide the management of sibships and the monitoring of mutation carriers.

Abbreviations: AO: Age-at-onset; ATTRv: hereditary amyloid transthyretin; CI: confidence interval; HMZ-ATTRv: hereditary transthyretin amyloidosis families containing homozygous individuals; HTZ-ATTRv: hereditary transthyretin amyloidosis families exclusively with heterozygous individuals; mtDNA: mitochondrial DNA; POO: parent of origin; RH: relative hazard; SD: standard deviation; TTR: transthyretin; Y-O: year-old

ARTICLE HISTORY

Received 12 May 2020
Revised 8 September 2020
Accepted 20 September 2020



KEYWORDS

Genetics; peripheral neuropathy; transthyretin; amyloid polyneuropathy; ATTRV30M amyloidosis

Introduction

Hereditary transthyretin (ATTRv) amyloidosis is an autosomal dominant severe disease, resulting in progressive tissuer amyloid deposition of transthyretin (TTR) fibrils. Clinical manifestations variably include a sensory-motor and autonomic neuropathy, carpal tunnel syndrome, ocular abnormalities and cardiomyopathy [1]. More than 140

substitutions have been identified in the TTR gene across the world, including the ATTRV30M variant (p.Val50Met), which is the most frequent in Europe. Initially, the disease was described in Northern Portugal, in young adults [2] then in Japan and Sweden. In these areas, sometimes termed 'endemic' because of the high incidence of the disease, virtually all kindred carry the ATTRV30M mutation [3,4].

CONTACT Violaine Planté-Bordeneuve  violaine.plante@aphp.fr  Department of Neurology, University Hospital Henri Mondor, 51 Avenue du maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, 94000, France

*These authors contributed equally to this work.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

In Sweden, most affected families live in the northern part of the country (Västerbotten and Norrbotten counties). In 2016, the prevalence of ATTRV30M amyloidosis patients has been estimated at 253 cases per 9.8 million inhabitants, with an average of 35 new cases per year [5,6]. A recent study provided an accurate estimation of the allelic frequency, around 2%, by genotyping a large sample of individuals from the national register of the Northern Sweden Health and Disease Study at the Medical Biobank Umeå [7].

In contrast to Portugal, the first symptoms occur later in life in Swedish patients, mostly in the sixth decade, with an average of 56 years of age [range: 23–84] [7,8].

One characteristic of the ATTRV30M Swedish population is a higher proportion of homozygous patients estimated at 1.1% (unpublished data). These cases presented with a similar age at onset (AO) and phenotype compared to heterozygous patients except for more prevalent vitreous amyloidosis [9].

In previous works, penetrance, defined as the risk of being symptomatic for mutation carriers, was incomplete with marked variations between countries, including Sweden, Portugal, France and Brazil [10–12]. In Sweden, penetrance appeared lower compared to other ATTRV30M populations [10,11]. The role of different variables on the risks was tackled by stratifying the Swedish population sample. Thus, we identified a parent of origin (POO) effect [11].

In order to refine our knowledge of the genetic aspects, penetrance estimates, and factors that influence the disease risk in Sweden, we performed a comprehensive study of ATTRV30M families in this country.

Materials and methods

Diagnosis criteria, genealogical investigation and origin of families

Family data collection and pedigree construction were carried out, at the Amyloidosis centre of Umeå University Hospital, the national referral centre for ATTRv amyloidosis in Sweden. We collected information through personal communication with index cases and relatives. Disease history for each patient and relevant information for asymptomatic carriers were obtained from the medical records.

In patients, the diagnosis criteria of ATTRv amyloidosis relied on the clinical picture, a positive genetic testing, confirmed amyloid deposits in adipose tissue, obtained from abdominal fat biopsy using a skin punch and positive nerve conduction studies. In case of negative biopsy, the diagnosis was confirmed in case of positive technetium-99m-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid cardiac scintigraphy.

Relevant data for relatives included the date of birth, the date of last news (or death), and the phenotypic and genotypic status when available. In asymptomatic carriers, we defined the date of last news by the date of the last visit or by the date of the last reliable news by hearing through family members. In affected individuals, the AO was determined when clinical manifestations could be reliably, linked to the

disease. In this setting, we did not include the carpal tunnel syndrome because of its high frequency in the general population.

We carried out extensive genealogical investigation for all selected cases through the comprehensive census records, initiated by the Crown around 1650, found in Sweden (Swedish Archive Information homepage, www.svar.ra.se). The majority of the families were traced back to the early part of the nineteenth century. The region of origin for each family was determined by the birthplace of the oldest generation in the pedigrees.

Relevant genealogical information was entered anonymously on PedigreeXP[®] software (Version 2.1.091, 2015).

Non-parametric survival estimation (NPSE)

To estimate penetrance, we used the NPSE method previously described [13]. Briefly, NPSE estimates the (cumulative) disease incidence as a non-parametric piecewise constant baseline combined with a proportional hazard model. The method uses powerful and fast algorithms. Expectation-Maximization algorithm estimates both the model parameters and the posterior carrier probability. All genetic computations (integration over all possible genotypes) utilised the Elston-Stewart algorithm [13]. A major advantage of the NPSE is the ability to study covariates, either by stratification of the sample or by using a Cox model on the whole data. In Stratification analysis, the disease risk is estimated separately in each subgroup, while the Cox model estimates simultaneously the covariate effect on the disease risk [14].

In the present study, covariates were first analysed by stratification. In case of a proportional effect of the curves, we applied a Cox model to enhance the power of the analysis. In the families exclusively with heterozygous individuals (HTZ-ATTRV30M), the covariates tested were the gender, the POO, and the geographical origin. A Cox model was applied for the POO only. With regard to the geographical origin, families were native from four different areas, namely Skellefteå, Piteå, Kalix and Lycksele. Families of dual origin were excluded.

In addition, we estimated the penetrance function by considering the allelic status as a covariate using a Cox model. Taking into account the pedigree structure, we compared the disease risk of the heterozygous individuals from all families to the risk of homozygous individuals in the families containing homozygous patients (HMZ-ATTRV30M).

For all analysis, the ATTRV30M allelic frequency was set at 2% based on the most recent estimation in Sweden [7].

Family data used

All family data providing information on the risk of being affected for a relative were retained. At risk individuals or patients with reliable information on their date of birth, their AO or their date or age of death if adapted were included. The branches of the families without information

on the individual's phenotype or date of birth or AO were excluded. As each family is selected through an affected individual (the proband), an adjustment for ascertainment bias is necessary [15]. Thus, for each proband we considered the genotype but not the phenotype.

Based on the known AO in previous reports [8,11] and a large clinical experience on ATTRV amyloidosis in Sweden, individuals younger than 18 years of age were not included in the present study.

To examine anticipation and a possible gender effect in parent-offspring pairs, we considered the pairs of parent-child with a confirmed diagnosis and/or genotype within the ATTRV families. Anticipation was defined as the difference in AO between parent and offspring. First, we examined all pairs involving heterozygous ATTRV30M affected individuals with a known AO. Then, to avoid possible selection biases, we conducted the following analysis: 1) excluding pairs containing the proband; 2) excluding offspring born after 1967 (as no late AO cases would have been observed in offspring in this group for time constraints); 3) considering only one pair per family to ensure independence of the pairs.

Statistical analyses

The sex ratio was tested by non-parametric Chi-Square test using the R software [16]. Differences in mean AO and anticipation between parent and offspring's gender were tested by a t-test. In addition, we assessed if the mean anticipation was different from zero (t-test) in all pairs, then in subsamples after exclusion of ascertainment biases. Analysis were performed using the Prism 7.04 software (GraphPad).

We used the R software to apply the NPSE method. In the study of covariates, a difference between groups was tested using a log-rank test in analysis by stratification and using a likelihood ratio test in Cox model analysis. A 5% significance level was used for all tests.

Ethics

The project was approved by the Swedish Ethical Review Authority, Regional Committee in Umeå (Dnr 2013-247-31 M). All currently living ATTRV30M carriers in the registry of Amyloidosis centre at Umeå University Hospital

Sweden were informed of the study and had an opt-out option if they were unwilling to participate.

Results

Population characteristics

In total, 118 ATTRV30M families were enrolled in the study. Four pedigrees related to each other were merged resulting in 114 families available for the analysis. The pedigree characteristics are summarised in Table 1. Among them, 104 HTZ-ATTRV30M kindred originated respectively from Skellefteå ($N_S=41$), Piteå ($N_P=23$), Lycksele ($N_L=17$), Kalix ($N_K=15$). Eight kindred were of dual origin. On the other hand, there were 10 HMZ-ATTRV30M kindred, including 12 homozygous affected individuals. Six of these families originated from Piteå and one each from Skellefteå, Lycksele and Kalix. The last was of dual origin.

Age-at-onset (AO), sex ratio

AO \pm Standard Deviation (SD) estimated in the 104 index cases (72 men) of the HTZ-ATTRV30M families, averaged 60 ± 14 years-old (y-o) with a range from 23 to 85 y-o. There were a higher proportion of men among patients (sex ratio 1.5; $p < .01$) and a higher proportion of women among asymptomatic carriers (sex ratio 0.5; $p < .01$).

The mean AO in 10 homozygous patients (5 men), one from each kindred, was 58 ± 9 y-o, from 39 up to 76 years of age (Table 1).

AO in parent-offspring pairs

This analysis was carried out exclusively on heterozygous offspring, in the ATTRV30M families.

Overall, there were 131 affected parent-offspring pairs from 49 families. Offspring showed a mean AO of 45 y-o ($SD \pm 14.8$, range 22–84 y-o) significantly lower than parent's AO of 56.8 ($SD \pm 13.8$, range 30–92 y-o, $p < 10^{-6}$), implying an average anticipation of 11.7 years. A marked anticipation (≥ 10 years) occurred in 74 pairs. Anticipation according to gender groups of offspring-parent pairs is shown in Table 2. A difference was found according to the POO with a mean anticipation of 13.7 ($SD \pm 8.4$) years in case of maternal transmission versus 7.9 ($SD \pm 11.5$) years in case of paternal transmission ($p < .003$). Among pairs with a marked

Table 1. Characteristics of the ATTRV30M Swedish families.

Genetic transmission	HTZ-ATTRV30M ^a	HMZ-ATTRV30M ^b
Characteristics of population		
Number of families	104	10
Number of subjects (Male)	1820 (940)	274 (130)
Genotyped individuals	710	102
Asymptomatic carriers (Male)	139 (47)	43 (19) – All heterozygous
Affected (Male)	452 (275)	50 (31) – including 12 homozygous
Obligate carriers (affected)	181 (1)	34 (4)
Mean AO \pm SD ^c [range]	60 ± 14 [23–85]	58 ± 9 [39–76]

^aHTZ-ATTRV30M: Hereditary transthyretin amyloidosis families exclusively with heterozygous individuals.

^bHMZ-ATTRV30M: Hereditary transthyretin amyloidosis families containing homozygous individuals.

^cAge at onset (AO) \pm Standard Deviation (SD) was estimated in 104 index cases in HTZ-ATTRV30M and in 10 homozygous patients in HMZ-ATTRV30M.

Table 2. Mean anticipation according to gender groups in 131 Heterozygous ATTRV30M offspring-parent pairs.

Offspring-parent pairs	Number of pairs	Range	Mean	SD*
Mother-daughter	43	-5,36	13.49	9.14
Mother-son	42	0,38	14.07	7.83
Father-daughter	17	-18,32	5.06	13.97
Father-son	29	-9,28	9.68	9.80

*SD: Standard Deviation.

Table 3. Assessment of anticipation after exclusion of ascertainment biases and considering one pair per sibship.

Study sample ^a	Number of pairs	Mean (SD)	Range
All pairs	131	11.74 (10.03)	-18,38
Excluding pairs with proband	93	11.17 (10.11)	-18,38
Excluding pairs with offspring born after 1967	116	11.64 (10.12)	-18,36
One pair per sibship	49	11.16 (11.22)	-14,38

^aMean anticipation was different compared to zero in all pairs as in all sub-sample at $p < 10^{-6}$.

SD: Standard Deviation.

anticipation, a maternal inheritance was found in 74% of cases. Interestingly, mother-son pairs showed the largest anticipation whereas father-daughter pairs showed a moderate anticipation (Table 2).

Table 3 describes the assessment of anticipation after exclusion of different ascertainment biases, including the number of pairs and the mean for each analysis. Anticipation was still significant in each subgroup ($p < 10^{-6}$). Lastly, to correct for the non-independence of the pairs we selected by chance, one pair per kindred, blindly to their AO. Herein, we found a mean anticipation of 11.1 (SD \pm 11.2) years in 49 pairs ($p < 10^{-6}$).

Penetrance study

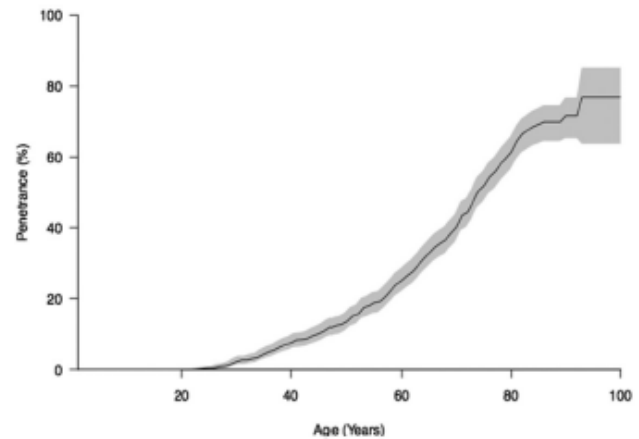
Estimation of penetrance in HTZ-ATTRV30M families

The penetrance curve in the 104 HTZ-ATTRV30M families is shown in Figure 1. Notably, the disease risk remained below 10% until 40 years of age. Then, it increased gradually from 15% (95% confidence Interval (CI) = 12–17) at 50 years, up to 71% (95%CI = 65–76) at 90 years of age (Table 4).

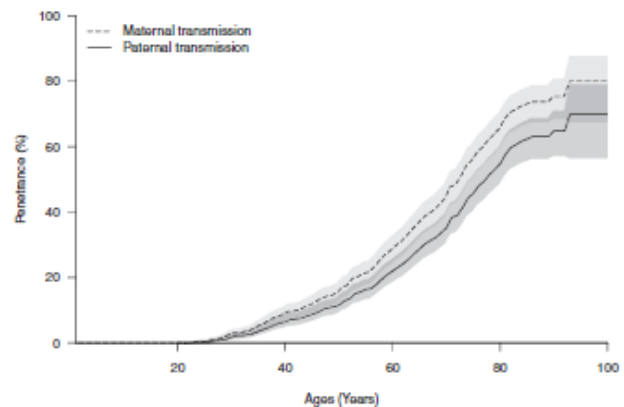
Covariates study in HTZ-ATTRV30M families

Gender. Overall, there is a significant difference of penetrance ($p < .01$) according to gender as summarised in Table 4. Visually, a higher disease risk was observed in male patients. At age 90, the estimated penetrance was 79% (95%CI = 72–85) in men and 70% (95%CI = 50–82) in women.

Parent-Of-Origin (POO). The penetrance profile according to the POO is shown in Figure 2 and the risk estimates summarised in Table 4. Penetrance was significantly higher when the mutation was maternally inherited (Relative Hazard (RH) = 0.8, Cox's $p < .01$). At age 60 and 90 years respectively, the penetrance was 30% (95%CI = 25–33) and 76% (95%CI = 68–81) when the trait was of maternal

**Figure 1.** Penetrance function in 104 Swedish Heterozygous ATTRV30M families. Penetrance estimates was low at all ages: disease risk remained virtually null until 40 years then increased progressively up to 90 years of age. The confidence intervals (95%) are represented by the grey areas.**Table 4.** Penetrance estimates in 104 Heterozygous ATTRV30M Swedish families on the whole and according to gender and parent of origin (POO).

Age (years)	Penetrance in % [95% Confidence Interval]				
	HTZ-ATTRV30M ^a	Gender*		POO**	
		Men	Women	Father	Mother
30	2 [1–3]	3 [1–5]	3 [1–5]	2 [1–3]	3 [1–4]
40	8 [6–10]	10 [6–13]	10 [7–13]	7 [5–9]	9 [7–11]
50	15 [12–17]	18 [14–22]	20 [16–24]	13 [10–16]	17 [13–20]
60	26 [23–29]	36 [30–41]	35 [30–40]	23 [19–27]	30 [25–33]
70	43 [39–47]	65 [59–71]	50 [42–55]	39 [34–44]	48 [42–53]
80	64 [59–68]	79 [72–85]	60 [51–66]	59 [52–65]	69 [62–74]
90	71 [65–76]	79 [72–85]	70 [50–82]	66 [58–72]	76 [68–81]

^aHTZ-ATTRV30M: Hereditary transthyretin amyloidosis families exclusively with heterozygous individuals.*by log-rank test p -value was $< .01$; **by likelihood ratio test p -value was $< .01$.**Figure 2.** Penetrance according to the Parent of origin (POO). We observed a significantly higher risk when the disease was maternally inherited ($p < .01$). The confidence intervals (95%) are represented by the blue (maternal transmission) and the grey (paternal transmission) areas.

transmission versus 23% (95%CI = 10–27) and 66% (95%CI = 58–72) in case of paternal inheritance.

Geographical origin. The risk estimates did not differ significantly between families from the different areas (data not shown).

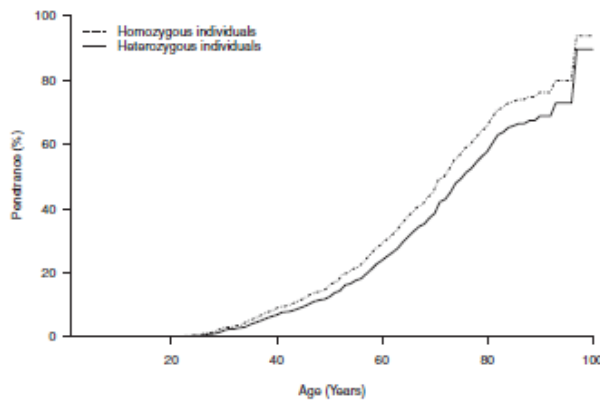


Figure 3. Penetrance estimates in ATTRV30M Homozygous versus Heterozygous families. A similar penetrance function was found between heterozygous and homozygous individuals.

Table 5. Penetrance estimates in Homozygous versus Heterozygous ATTRV30M individuals.

Age (years)	Penetrance in % [95% Confidence Interval]	
	Genotypic status	
	Heterozygous Individuals*	Homozygous individuals
30	3 [2–4]	2 [2–5]
60	34 [30–37]	40 [27–51]
90	89 [25–98]	94 [22–99]

Estimation of penetrance in homozygous versus heterozygous ATTRV30M amyloidosis patients

The penetrance profiles appeared similar in homozygous and heterozygous individuals as shown in Figure 3. The risks estimates are summarised in Table 5.

Discussion

Our study focussed on a comprehensive population of Swedish ATTRV30M families, diagnosed at the University hospital of Umeå, the unique referral centre of ATTRv amyloidosis in Sweden, which evaluates virtually all patients diagnosed across the country. The Swedish ATTRV30M population is one of the best studied due to thorough genealogical investigation (census records) which results in trustworthy family data. Several characteristics of the population are notable. First, the kindred originated from limited areas in the northern part of the country. There, frequency of the ATTRV30M allele, estimated at 2% [7] appears to be one of the highest in Europe [5] along with the presence of homozygous individuals [9,17]. This configuration allowed refining our knowledge on the genetic profile of the ATTRV30M kindred and factors modifying the disease expression in Sweden.

In the heterozygous families, we found a late AO averaging 60 y-o in the index cases and 71% of all patients had onset of symptoms after 50 y-o, in accordance with a low penetrance of the disease overall. However, the wide range of AO, from age 23 to 85 observed between families and the

fact that early (<50 years) and late (>50 years) onset cases occurred simultaneously within 30% of the kindred, emphasised the broad variation of the disease expression, likely due to multifactorial origin. Hence, a prediction of the disease onset might be troublesome for a given individual.

In the parent-offspring pairs analysis performed in all pairs of heterozygous patients and in selected subgroups to remove selection biases or ensure independence of the pairs, we confirmed the occurrence of a marked anticipation in ATTRV30M Swedish families. Anticipation was noticed in one of the first pedigree study in Sweden [18]. It is now well recognised in other ATTRV30M populations, notably the Portuguese and early onset Japanese families [19,20]. The underlying biological phenomenon remains unknown. Recently, Santos et al. investigated a possible influence of large normal repeat alleles of ten genes on AO in the Portuguese ATTRV30M cohort. For ATXN2, the presence of at least one allele longer than 22 CAGs was significantly associated with an earlier AO, suggesting a modulating effect of the length of normal repeats at ATXN2 on phenotypic expression [21]. The influence of ATXN2 as a modulator of cellular processes like mitochondrial stress was inferred. Based on our marked anticipation findings, the Swedish ATTRV30M population would be candidate to corroborate on this data.

In addition, we observed an influence of the parent-offspring gender on the degree of anticipation as the highest anticipation occurred in mother-son transmission averaging 14 years compared to 5 years in father-daughter pairs. Notably, these gender effects have been reported in the Portuguese kindred in which a marked anticipation of 10 years occurred in mother-son pairs while father-daughter pairs showed only a residual anticipation [20].

Thanks to the covariate approach integrated into the NPSE, we were able to better assess penetrance estimates by studying the effect of different variables on the disease expression.

First, we confirmed a low penetrance in HTZ-ATTRV30M Swedish families. It increased smoothly from age 40 (8%) and remained incomplete (70%) at age 90 years. This finding contrasted with the high penetrance found in Portuguese kindred that raised abruptly from age 25 up to 91% at age 80. In French ATTRV30M families, intermediate risk was found [10,22]. So far, the present data are the lowest risks reported among ATTRV30M families in Europe. Interestingly, we have observed significant variation of risks between families carrying different pathogenic TTR mutations [22] using a similar approach, including a penetrance as low as 39% at 80 years in the ATTRI107V families.

Secondly, we detected a gender effect with a higher penetrance in men. This is consistent with the excess of male patients and the higher number of women among asymptomatic carriers observed in the whole sample. A gender difference in the disease expression has remained unsettled in previous studies on Swedish ATTRV30M families [11,18]. However, a similar trend has been noted in other ATTRV30M populations from Portugal, France and Brazil [10,12]. Also in Japan, recent reports revealed an important

male preponderance, particularly in the late-onset ATTRV30M amyloidosis patients from non endemic area [23]. The mechanisms underlying a gender difference with a higher penetrance in ATTRV30M men remain largely unknown. Recently, in a blood cell mRNA expression profiles performed on a large sample of ATTRV30M Portuguese cases, male and female patients had different patterns of gene expression, in particular for molecules associated with immune or inflammatory processes. These differences between gender were not observed in asymptomatic carriers and remain difficult to interpret [24].

Thirdly, we confirmed the POO effect on penetrance with a higher disease risk in case of maternal transmission as observed previously [11]. This result is reinforced by the larger anticipation found in maternally inherited cases since anticipation matches with a higher penetrance in younger generations. A similar POO effect was described in the Portuguese ATTRV30M families [25] in concordance with the work of Lemos et al. showing the role of maternal inheritance on the degree of anticipation in parent-offspring pairs [20]. The mechanism underlying such maternal effect on the disease expression has been somewhat investigated. A previous study found differences in mitochondrial haplogroup distribution in early and late onset Swedish and French cases of ATTRV30M amyloidosis [26]. In addition, a modelling approach suggested that a mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism may explain the observed difference of penetrance in case of maternal transmission in a Portuguese ATTRV amyloidosis sample [27]. More recently, Santos et al. described an association between the mitochondrial DNA (mtDNA) copy number from blood leucocytes and an early AO in Portuguese ATTRV30M. A significant increase in the mtDNA copy number was found in early onset offspring compared to their late onset parents, compatible with a maternally transmitted mitochondrial risk effect modulating AO [28]. In our study, the higher penetrance and anticipation observed in the case of maternal transmission should lead to further investigation into the role of mtDNA in the ATTRV30M Swedish families.

We did not substantiate the difference of penetrance between regions as previously reported [11]. This is probably the consequence of more specific investigations on the origin of families conducted in the present study. In addition, the family origin relied on the birthplace of the oldest generation in each pedigree and not only on the personal communication with the index cases.

Finally, our work provides insights on the disease expression between homozygous and heterozygous ATTRV30M amyloidosis individuals. Homozygous patients were first reported in Sweden [29] where their prevalence appears unusually high. In our comprehensive survey, HMZ-ATTRV30M accounted for 8.7% of all kindred with similar AO between homozygous and heterozygous patients, in keeping with previous findings [9]. Accordingly, we found that penetrance was similar in both groups. Herein, the presence of tetramers made only of mutant ATTRV30M does not impact the severity of the disease expression. In contrast, a severe phenotype was reported in a Japanese

homozygous ATTRV30M patients showing an extremely early-onset with a higher TTR protein instability [30]. In addition, homozygous ATTRV122I patients developed an earlier AO and more aggressive course of the disease [31,32]. These differences might be due to an unidentified genetic protective factor against ATTRV30M amyloidosis in the Swedish homozygous patients.

In conclusion, this study allowed refinement of the genetic characteristics and penetrance in a comprehensive sample of Swedish ATTRV30M families. Herein, we noted the occurrence of a marked anticipation with a modifying effect of the parent-offspring gender, the largest anticipation being observed in mother-son pairs. Our data corroborate a low penetrance in this population, increased in male patients and in case of maternal inheritance. Altogether, the findings indicate that the disease risk is modulated by the sex and POO. In addition, we confirmed a similar penetrance in the HTZ and HMZ-ATTRV30M amyloidosis individuals in this area. Overall, our results point to different factors, modifying the AO, particularly a gender effect. Clinically, it would be of importance to incorporate these findings for the management of family members and in the monitoring of mutation carriers.

Acknowledgements

Special thanks to Professor Ole B. Suhr who contributed with his extensive knowledge in the field.


Disclosure statement


The authors report no conflict of interest.

Funding

The study was supported by grant from Central ALF grants from Västerbottens county, from the patient associations FAMY/AMYL Norr- and Västerbotten and Knut and Alice Wallenberg foundation.

ORCID

Intissar Anan  <http://orcid.org/0000-0003-2874-7643>

Violaine Planté-Bordeneuve  <http://orcid.org/0000-0002-7880-2316>

References

- [1] Planté-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J Neurol*. 2018;265:976–983.
- [2] Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy; familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*. 1952;75(3):408–427.
- [3] Araki S, Mawatari S, Ohta M, et al. Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family. *Arch Neurol*. 1968;18(6):593–602.
- [4] Andersson R. Familial amyloidosis with polyneuropathy. A clinical study based on patients living in northern Sweden. *Acta Med Scand Suppl*. 1976;590:1–64.
- [5] Parman Y, Adams D, Obici L, et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the

- epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr Opin Neurol Suppl.* 2016;29:S3–S13.
- [6] Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Botteman MF, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2018;57(5):829–837.
- [7] Olsson M, Jonasson J, Cederquist K, et al. Frequency of the transthyretin Val30Met mutation in the northern Swedish population. *Amyloid.* 2014;21(1):18–20.
- [8] Holmgren G, Costa PM, Andersson C, et al. Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J Med Genet.* 1994;31(5):351–354.
- [9] Holmgren G, Hellman U, Lundgren HE, et al. Impact of homozygosity for an amyloidogenic transthyretin mutation on phenotype and long term outcome. *J Med Genet.* 2005;42(12):953–956.
- [10] Planté-Bordeneuve V, Carayol J, Ferreira A, et al. Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families. *J Med Genet.* 2003;40(11):e120.
- [11] Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, et al. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid.* 2008;15(3):181–186.
- [12] Saporta MA, Zarus C, Cruz MW, et al. Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy (type I) in Brazilian families. *Eur J Neurol.* 2009;16(3):337–341.
- [13] Alarcon F, Planté-Bordeneuve V, Olsson M, et al. Non-parametric estimation of survival in age-dependent genetic disease and application to the transthyretin-related hereditary amyloidosis. *PLoS One.* 2018;13(9):e0203860.
- [14] Bouaziz O, Nuel G. A change-point model for detecting heterogeneity in ordered survival responses. *Stat Methods Med Res.* 2018;27(12):3595–3611.
- [15] Alarcon F, Bourgain C, Gauthier-Villars M, et al. PEL: an unbiased method for estimating age-dependent genetic disease risk from pedigree data unselected for family history. *Genet Epidemiol.* 2009;33(5):379–385.
- [16] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing; 2015. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- [17] Holmgren G, Bergstrom S, Drugge U, et al. Homozygosity for the transthyretin-Met30-gene in seven individuals with familial amyloidosis with polyneuropathy detected by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences. *Clin Genet.* 1992;41(1):39–41.
- [18] Drugge U, Andersson R, Chizari F, et al. Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: a pedigree analysis. *J Med Genet.* 1993;30(5):388–392.
- [19] Misu K, Hattori N, Ando Y, et al. Anticipation in early- but not late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR met 30) in Japan. *Neurology.* 2000;55(3):451–452.
- [20] Lemos C, Coelho T, Alves-Ferreira M, et al. Overcoming artefact: anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP) ATTRV30M. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85(3):326–330.
- [21] Santos D, Coelho T, Alves-Ferreira M, et al. Large normal alleles of ATXN2 decrease age at onset in transthyretin familial amyloid polyneuropathy Val30Met patients. *Ann Neurol.* 2019;85(2):251–258.
- [22] Gorram F, Alarcon F, Perdry H, et al. Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). *Amyloid.* 2017;24(sup1):115–116.
- [23] Koike H, Misu K, Ikeda S, et al. Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Arch Neurol.* 2002;59(11):1771–1776.
- [24] Kurian SM, Novais M, Whisenant T, et al. Peripheral blood cell gene expression diagnostic for identifying symptomatic transthyretin amyloidosis patients: male and female specific signatures. *Theranostics.* 2016;6(11):1792–1809.
- [25] Bonaïti B, Alarcon F, Bonaïti-Pellé C, et al. Parent-of-origin effect in transthyretin related amyloid polyneuropathy. *Amyloid.* 2009;16(3):149–150.
- [26] Olsson M, Hellman U, Planté-Bordeneuve V, et al. Mitochondrial haplogroup is associated with the phenotype of familial amyloidosis with polyneuropathy in Swedish and French patients. *Clin Genet.* 2009;75(2):163–168.
- [27] Bonaïti B, Olsson M, Hellman U, et al. TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? *Eur J Hum Genet.* 2010;18(8):948–952.
- [28] Santos D, Santos MJ, Alves-Ferreira M, et al. mtDNA copy number associated with age of onset in familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(3):300–304.
- [29] Holmgren G, Haettner E, Nordenson I, et al. Homozygosity for the transthyretin-met30-gene in two Swedish sibs with familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Genet.* 1988;34(5):333–338.
- [30] Tojo K, Seljima Y, Machida K, et al. Amyloidogenic transthyretin Val30Met homozygote showing unusually early-onset familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2008;37(6):796–803.
- [31] Jacob EK, Edwards WD, Zucker M, et al. Homozygous transthyretin mutation in an African American Male. *J Mol Diagn.* 2007;9(1):127–131.
- [32] Reddi HV, Jenkins S, Theis J, et al. Homozygosity for the V122I mutation in transthyretin is associated with earlier onset of cardiac amyloidosis in the African American population in the seventh decade of life. *J Mol Diagn.* 2014;16(1):68–74.

3.3. Etude 3 : Estimation du risque de maladie dans un large spectre de familles ATTRv d'Europe.

Précisez les estimations du risque dans un large spectre de familles ATTRv à travers l'Europe, à l'ère des thérapeutiques innovantes.

V. Planté-Bordeneuve, **F. Gorram**, M. Olsson, A. Mazzeo, E. Cisneros-Barroso, Y. Parman, M. Waddington Cruz, L. Gentile, G. Vita, I. Anan, A. Rodríguez-Rodríguez, J. González-Moreno, I. Losada, F. Alarcon, G. Nuel. Article en cours de rédaction.

Des progrès considérables ont été réalisés dans le traitement de l'amylose ATTRv-PN. En 2018, le patisirán et l'inotersen, deux thérapies de silençage génique capable d'inhiber l'expression de TTR ont été commercialisées. A 30 mois de traitement, les deux molécules stabilisent la neuropathie chez environ 60 à 70% des patients. L'initiation de ces thérapies géniques non invasives et ce, dès l'apparition des premiers signes de la maladie, est un des défis actuels pour éviter la progression des symptômes. Dans ce contexte, la connaissance des facteurs qui modulent l'expression de la maladie, est essentielle pour ajuster le CG et orienter le suivi des porteurs asymptomatiques. L'objectif de ce travail était de préciser les risques de maladie dans une large cohorte de familles ATTRv en Europe, en utilisant une méthode non paramétrique prenant en compte différentes covariables (Alarcon et al., 2018). Ce travail a été réalisé dans notre centre expert ATTRv (CHU Henri Mondor) qui regroupe à la fois des familles portugaises et des familles d'origine française en collaboration avec cinq centres :

- **Espagne** (Majorque-Hôpital Universitaire de Son Llätzer),
- **Brésil** (Université fédérale de Rio de Janeiro),
- **Italie** (Sicile-Hôpital AOU Policlinico),
- **Suède** (Hôpital Universitaire d'Umea)
- **Turquie** (Hôpital Universitaire d'Istanbul).

Parmi 434 familles, 342 familles non apparentées porteuses de sept variants TTR ont été incluses. Le variant TTRV30M était le plus fréquent, présent dans 258 familles d'origine suédoise ($N_1=104$ familles), portugaise ($N_2=67$), espagnole ($N_3=48$) et française ($N_4=39$), suivi des mutations TTRT49A ($N_5=9$), F64L ($N_6=20$), S77Y ($N_7=20$), S77F ($N_8=11$), E89Q ($N_9=9$) et I107V ($N_{10}=15$).

Dans le groupe ATTRV30M, l'âge de début moyen varie de 34 ± 10 [20-78] ans chez les portugais à 59 ± 14 [22-92] ans chez les suédois ($p=10^{-5}$). Dans ce groupe, la majorité des patients sont des hommes ($p < 10^{-12}$) et la majorité des porteurs asymptomatiques sont des femmes ($p < 10^{-4}$). D'autre part, la présence simultanée de patients d'âge de début précoce (< 50 ans) et tardif (> 50 ans) au sein d'une même famille représente 12% des familles portugaises, 15% des familles françaises, 30% des familles suédoises et atteint 40% dans le groupe espagnol. Dans les familles ATTRV30M, si on s'intéresse à la covariable « origine », une différence de risque est observée entre les 4 populations (Portugal, Espagne, France et Suède) ($p < 10^{-5}$). Si on s'intéresse à la covariable « sexe », le risque semble plus élevé chez les hommes ($p=0.02$). Cette différence reste d'interprétation délicate en raison du chevauchement des courbes. Enfin, pour la covariable « origine du sexe du parent transmetteur », le risque était plus important en cas de transmission maternelle ($p=8.10^{-8}$).

Dans les familles ATTR non-V30M, l'âge de début moyen va de 45 ± 7 [30-66] ans dans le groupe ATTRT49A à 63 ± 9 [42-78] ans dans les familles ATTRP64L. Lorsque la covariable étudiée est le « variant TTR », nous observons des profils à risques très différents entre les 7 mutations étudiées ($p=10^{-15}$). La pénétrance est incomplète à 90 ans, variant de 56% à 95%. Le risque de développer la maladie est nul dans toutes les familles avant l'âge de 30 ans, puis des différences notables ont été observées. Dans les familles ATTRT49A, le risque pour un porteur commence à partir de 30 ans (2%), puis augmente rapidement, de 24% (45 ans) à 95% [62-99] à 90 ans. Les porteurs des familles ATTRE89Q et ATTRS77Y ont un risque qui augmente dès l'âge de 35 ans (6% et 1%) et atteint 90% et 71% à l'âge de 90 ans. Dans les sous-groupes ATTRS77F et ATTRF64L, le risque n'apparaît qu'à partir de 45 ans (7%) pour atteindre 94% et 74% à 90 ans. Enfin, les familles ATTRI107V ont les risques les plus faibles, qui augmentent à partir de 55 ans.

Notre étude a permis de mieux préciser le risque pour les porteurs ATTRv grâce à une large cohorte et une méthodologie adaptée. Ces résultats pourront contribuer à guider le CG et la prise en charge des porteurs. On pourrait envisager de personnaliser cette prise en charge par une modélisation basée sur les risques estimés et tenant compte de l'effet des covariables. L'ensemble de ces travaux est important pour améliorer notre compréhension des mécanismes ou facteurs impliqués dans les ATTRv.

→ Article 3 : V Planté-Bordeneuve et al. 2021

Insights on the carrier risks in a wide spectrum of Hereditary Transthyretin Amyloidosis (ATTRv) families across Europe: what impact at the era of innovative therapeutics?

V Planté-Bordeneuve ^{1,2,3}, **F Gorram** ^{1,2,3}, M Olsson ^{4,5}, I Anan ^{4,5}, A Mazzeo ⁶, L Gentile ⁶, E Cisneros-Barroso⁷, J Gonzalez-Moreno⁷, I Losada⁷, M Waddington Cruz ⁸, LF Pinto ⁸, Y Parman ⁹, P Fanen^{2,3,10}, F Alarcon ¹¹, G Nuel ¹²

1. Department of Neurology, Henri Mondor University Hospital, APHP, Créteil, France. 2. Paris Est-Créteil University, Créteil, France. 3. Inserm U.955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Créteil, France. 4. Department of Public Health and Clinical Medicine / Medicine, Umeå University, Umeå Sweden. 5. Wallenberg Centre for Molecular Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden. 6. Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Messina, Messina, Italy. 7. Research Health Institute of the Balearic Islands (IdISBa), Internal Medicine Department, Son Llàtzer University Hospital, Palma de Majorca, Spain. 8. Federal University of Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brazil. 9. Department of Neurology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University, Istanbul, Turkey. 10. Department of Genetics, Henri Mondor University Hospital, APHP, Créteil, France. 11. Laboratory MAP5 UMR CNRS 8145 Paris University, Paris, France. 12. Stochastics and Biology Group, Department of Probability and Statistics (LPSM, UMR CNRS 8001), Sorbonne University, Paris, France.

Corresponding Author:

Violaine Planté-Bordeneuve
Department of Neurology
University Hospital Henri Mondor
51 Avenue du maréchal de Lattre de Tassigny
94000 Créteil - France
violaine.plante@aphp.fr

ABSTRACT

Introduction: ATTRv amyloidosis is an autosomal dominant neuropathy caused by mutations in the TTR gene. Recently, therapeutic advances including gene modifying approaches proved to be effective in halting disease progression. TTRVal30Met, the most common variant in Portugal and Latin America is associated with an age at onset (AO) below 50 y-o. In contrast, in Western Europe, US, Japan, heterogeneity of TTR variants is associated with AO above 50 y-o, a mixed polyneuropathy and cardiomyopathy. Determining the risk of the disease (penetrance) is prominent for the management and lifetime follow-up of asymptomatic gene carriers. Hence, we assessed the carrier's risks in a large panel of ATTRv amyloidosis families, across Europe, considering factors that might be involved in the disease expression. The study was conducted in France in collaboration with five ATTRv amyloidosis expert centers (Brazil, Italy-Sicily, Spain-Majorca, Sweden and Turkey).

Methods: To assess the disease risk, we used a non-parametric method incorporating survival analysis and the effect of covariates on the disease risks. Hypothesis testing was based on likelihood ratio tests in Proportional Hazard Model and a log-rank tests in stratification analysis. Covariates included geographic origin, gender and sex of the transmitting parent and type of TTR variant.

Results: We analysed 342 heterozygous families including ATTRV30M and ATTR non-V30M families. In ATTRV30M families, we found great differences of the disease's risk between families from various origins (French, Portuguese, Spanish and Swedish) (log-rank test; $p < 2.10^{-15}$). The risk was found to be higher in male patients (log-rank test; $p=0.02$) and when the disease is maternally inherited (Relative Hazard (RH) 0.67, Cox's p-value 8.10^{-8}). The risk of being affected also differed between 7 TTR variants analyzed (TTRVal30Met, TTRThr49ala, TTRPhe64Leu, TTRSer77Tyr, TTRSer77Phe, TTR Glu89Gln TTRlle107Val) (6 df, log-rank test $p= 10^{-15}$). Overall, the penetrance was incomplete in all mutations tested. We report the profile of the disease's risk for each variant, distinguishing age intervals where the disease risk is elevated. Below 30 years of age, the disease's risk was invariably null, then notable differences were observed. In ATTRT49A family's the risk was the earliest, from age 30 (2%), then rises rapidly (24% at age of 45) to 95% at age 90. In ATTRE89Q and ATTRS77Y kindred, the risk increased from age 35 (6 % and 1% respectively) up to 90% and 71% at 90 y-o. In ATTRF64L and ATTRS77F families, the risk of being affected was 8% at age 45 up to 74% and 94% at 90 y-o. Finally, the ATTRI107V kindred displayed the lowest penetrance, with a risk increasing after age 50 y-o (17% at 60 y-o) up to 56% at age 90 years.

Conclusions: Our study provides the most accurate estimation of the disease's risks available in a large population of ATTRv carrying 7 different TTR mutations. In ATTRV30M families, we showed a varied risk according to geographical origin, the gender and the sex of the parent of origin. Additionally, we found an important variation of the risk between TTR

mutations and we detect the interval age when the risk starts to increase for each mutation. These results are of great importance in clinical practice. They should be taken in account in the diagnostic and followup plan of carriers, enabling the detection of the symptomatic stage at the earliest timepoint. In addition, they will contribute to refine genetic counseling in the different populations of ATTRv.

KEY WORDS

Transthyretin amyloidosis; Polyneuropathy; Genetics, Penetrance; Gene carrier

GLOSSARY

AO: Age-at-onset

ATTRv: Hereditary transthyretin amyloidosis

CI: Confidence interval

F64L: Phe64Leu

I107V: Ile107Val

POO: Parent of origin

E89Q: Glu89Gln

RH: Relative Hazard

S77F: Ser77Phe

S77Y: Ser77Tyr

SD: Standard deviation

SR: Sex ratio

T49A: Thr49Ala

TTR: Transthyretin

V30M: Val30Met

Y-O: Year-old

HMDP: ^{99m}Tc-DPD: technetium-99m– 3,3-diphosphono-1,2- propanodicarboxylic acid

INTRODUCTION

Hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv) is a devastating autosomal dominant disease, characterized by progressive amyloid deposition of transthyretin (TTR), primarily in the peripheral nerves and in the heart. Over 130 different pathogenic TTR gene mutations are identified worldwide (www.amyloidosismutations.com). The phenotypic spectrum ranges from a progressive sensorimotor and autonomic polyneuropathy (PN) in ATTRV30M (p.Val50Met) amyloidosis patients to a prominent cardiomyopathy (CM) of late onset, in ATTRV122I (p.Val142Ile) cases. Likewise, a majority of TTR variants are associated with a mixed neuropathic and cardiac phenotype (Rapezzi et al., 2013; Thomas et al., 2019).

In Portugal, Brazil and Sweden, where the disease was historically described, most families carry the TTRV30M variant (Andrade C, 1952; Araki, 1984; Holmgren et al., 1994). There, mean age at onset (AO) varies broadly from the third decade in the Portuguese and Brazilian to the seventh decade, in the Swedish kindreds (Ando et al., 2013). In most European countries, first symptoms appear above 50 years-old (y-o), in patients carrying a spectrum of TTR variants (Ando et al., 2013; Mariani et al., 2015; Parman et al., 2016). Presently, the condition is diagnosed worldwide, with an estimated global prevalence of 5000-10000 cases (Parman et al., 2016; Schmidt et al., 2018).

Considerable advances have occurred in the treatment of ATTRv amyloidosis with polyneuropathy (ATTRv-PN) including liver transplantation at first, then oral TTR stabilizer drugs and more recently innovative TTR gene silencing therapies. Such therapeutics aimed to halt the amyloid process. They proved effective to stabilize the neuropathy and improve survival in about 50 to 70% of patients with a broad geno-phenotypic spectrum [8-12.] When administered at an early stage, the treatments allow preservation of the neurological function and limit the disease burden (Waddington Cruz et al., 2016; Barroso et al., 2017; Brannagan et al., 2020; Adams et al., 2021). At present, the major challenge is to initiate non-invasive therapeutics from the emergence of the ATTRv amyloidosis manifestations, to prevent disease progression.

In this context, the knowledge of the disease risk is decisive for the management of asymptomatic gene carriers across life. The disease risk also referred as penetrance is an age dependent variable. Previous studies showed an important disparity of penetrance estimates in the ATTRV30M individuals, according to the geographic origin, with a range from 50% to 90% at age 80 years, in Swedish and Portuguese kindred, respectively (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Hellman et al., 2008; Saporta et al., 2009b). Also, in these sibships, a higher risk was observed in case of maternal inheritance (Hellman et al., 2008; Bonaïti et al., 2009; Gorram, Olsson et al., 2020). More recently, a preliminary work suggested

different profiles of penetrance in ATTR-non-V30M families (Gorram et al., 2017). Hence, unravel factors that modulate the disease risk, possibly in combination would be compelling for genetic counselling and to adjust the monitoring of gene carriers in order to initiate treatment timely. In this work, we aimed to assess carrier risks in a large panel of ATTRv amyloidosis families, across Europe, taking into account factors involved in the disease risk as covariates.

MATERIALS AND METHODS

Genealogical investigations and clinical data

The study was conducted in six academic medical centers, national referral or expert centers for ATTRv amyloidosis in their country. These include Henri Mondor University Hospital, France; Umeå University Hospital, Sweden; AOU G.Martino University Hospital of Messina, Italy; Son Llàtzer University Hospital, Majorca, Spain; Neuromuscular Unit of Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Turkey and Clementino Fraga Filho Hospital Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. Family data collection and pedigree construction were carried out by one medical investigator per site with the same approach. Information was collected through personal communication with the index patient, their relatives and from the medical records. When available, the following data were collected: date of birth, date of last news, date of death if relevant and information on the phenotypic and genotypic status.

The minimum diagnosis criteria to confirm ATTRv amyloidosis in patient included a suggestive clinical picture and identification of pathogenic TTR variant. Depending on each site, additional requirements for the diagnosis were amyloid deposition detected on a tissular biopsy (Fat, Salivary gland, Skin), positive technetium-99mHMPD cardiac scintigraphy or positive nerve conduction studies.

Importantly, age at disease onset (AO), a key feature in risk estimates was determined when clinical manifestations could be reliably linked to the disease. In this setting, we did not include the carpal tunnel syndrome due to its lack of specificity and frequency in the general population.

Ascertainment bias, due to the selection of a family through an affected individual (the proband), was adjusted by considering the phenotype as unknown for each proband (Alarcon et al., 2009).

In asymptomatic carriers or untested individuals, the date of the last visit to the medical center or the date of the last reliable information by hearing from family members were taken as date of last news.

In families, we retained all data providing information on the risk of being affected for a relative, as previously described (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Gorram, Olsson et al., 2020). In the drawing of pedigrees, we highlighted obligate carriers. Such individuals were considered affected, when clinical manifestations were definitely related to ATTRv amyloidosis according interviews of relatives.

Based on the literature and on the joined clinical experience in ATTRv amyloidosis, individuals younger than 18 y-o were excluded from the study.

The raw data of pedigrees were anonymized, coded and entered on Pedigree® software (Version 2.1.091, 2015). All family data were processed and centralized by FG and VPB at the CHU Henri Mondor for the analysis.

Statistical methods

The disease risk in carriers or penetrance function was estimated from familial data using Non-Parametric Survival Estimation (NPSE), as described (Alarcon et al., 2018). NPSE is designed for autosomal dominant transmission. Importantly, this approach enables assessing covariates' effects by stratification or by applying the Cox proportional hazard model (Cox Model). The former analysis allows estimate the disease's risk separately in each subgroup, while the latter estimates simultaneously the risk, in the whole sample.

Families were categorized into ATTRV30M and ATTR-nonV30M. In the ATTRV30M families, the geographical origin and the gender were tested as separate covariate, by using a stratification analysis. Due to the uncertainty of the POO in some pedigrees, we extended the NPSE method in order to estimates the likelihood of the transmitting parent (Alarcon F et al., 2021). In this case, the parent of origin effect was considered as a covariate in a Cox model.

In the ATTR-nonV30M families, the pathogenic TTR mutation was computed as a covariate using stratification.

Difference between groups for quantitative variables were compared using the Student's t test, and for categorical variables with a chi-square test. Differences of the penetrance curves between groups were evaluated using a log-rank test in the stratification analysis and the likelihood ratio test in the Cox model. All analysis were conducted in the R software, version 3.6.1 (R Core Team. R, 2015).

Ethics

This study was approved by the ethics committees from each participating site including France: 00011558; Sweden: 2013-247-31M; Spain (Majorca): IB 3858/19 PI; Italy (Sicily): nr.3/2016; Turkey: 2017/929 and Brazil: 12294.

RESULTS

Population characteristics

In total, 434 ATTRv amyloidosis kindred were investigated. Among them, 92 were excluded because lack of available information in 82 families, and the presence of homozygous individuals detected in 10 families from Sweden (Figure 1).

The characteristics of 342 heterozygous pedigrees available for analysis are presented in Table 1. The TTRV30M was the most common mutation, identified in 258 families, respectively from Sweden ($N_1=104$), Portugal ($N_2=67$), Spain (Majorca) ($N_3=48$) and France ($N_4=39$). Among ATTR-nonV30M families, six TTR variants were identified, including T49A (p.Thr69Ala) ($N_5=9$), F64L (p.Phe84Leu) ($N_6=20$), S77Y (p.Ser97Tyr) ($N_7=20$), S77F (p.Ser97Phe) ($N_8=11$), E89Q (p.Glu109Gln) ($N_9=9$) and I107V (p.Ile127Val) ($N_{10}=15$) (Figure 1, Table 1).

In ATTRV30M patients, the mean AO, ranged from 34 ± 10 [20-78] in the Portuguese families to 59 ± 14 [22-92] years in the Swedish kindred. Overall, there was an excess of male patients ($p < 10^{-12}$) and a higher proportion of women among asymptomatic ATTRV30M carriers ($p < 10^{-4}$). Simultaneous occurrence of early (AO < 50 y-o) and late onset (AO > 50 y-o) patients within families was observed in 12% and 15% of the Portuguese and French kindred, respectively. This proportion reached 30% in the Swedish, up to 40% in the Spanish families.

In the ATTR-nonV30M kindred, the average AO ranged from 45 ± 7 [30-66] in the ATTRT49A patients to 63 ± 9 [42-78] years in the ATTRF64L group (Table 1).

Carrier risks in ATTRV30M families

Covariate 1: the geographic origin

The profiles of the disease risks (penetrance) across ages in Portuguese, Spanish, Swedish and French ATTRV30M families are shown in Figure 2a. Striking differences were observed in the families of different geographic origin (log-rank test; $p < 2 \cdot 10^{-15}$). The risks estimates are summarized in Table 2. In Portuguese kindred, the risk of being affected raised abruptly since age 20 years. Estimates were 26% [95% confidence Interval (CI) = 21-31] at 35, then 67% [95%CI = 60-73] at 50, up to 95% [95%CI = 83-98] at 90 years of age. In contrast, in the French and Swedish kindred, the disease risk increased mildly from age 30 years, up to 75% [95%CI = 62-87] and 64% [95%CI = 59-68], at 90 y-o. In the Spanish kindred, the risk was intermediate, increasing smoothly from 20 y-o then more sharply from age 40 to reach 69% [95%CI = 57-77] at 90 years.

Covariate 2: the gender

In testing the risk to be affected according gender, we observed a trend to higher risks in male patients (log-rank test; $p=0.02$), as summarized in Table 3.

Covariate 3: the POO

Analysis of the disease risk according the POO is illustrated in Figure 2b and estimates are shown in Table 3. Notably, the risks were found significantly higher in case of maternal transmission (Relative Hazard (RH) 0.67, Cox's p -value 8.10^{-8}). This result was observed at all age slots, from 30 until 90 y-o (Table 3). At 60 and 80 years of age respectively, the estimates scored 43% [95%CI = 40-47] and 77% [95%CI = 73-80] in case of maternal transmission versus 31% [95%CI = 28-34] and 62% [95%CI = 58-66] in case of paternal inheritance

Carrier risks according the TTR variant

The penetrance profiles in kindreds carrying the seven pathogenic TTR variant are summarized in Table 2. Herein, the disease risks were strikingly different between the TTR variants (6 df, log-rank test $p= 10^{-15}$). Importantly, at age of 90 years, penetrance was incomplete in all subsets, in a range from 56% to 95%. Also, there were notable differences between the ATTR-nonV30M kindred. Below 30 years of age, the disease's risk was invariably null. Then, in ATTRT49A families, it arose as early as 30 y-o (2%), increasing abruptly from 45 y (24%) up to 95% [95%CI = 62-99] at 90 y-o. In ATTRE89Q and ATTRS77Y kindred, the disease's risk emerged from age 35 years (6% and 1% respectively), rising more rapidly from 45- 50 y-o up to 90% and 71% at age 90. In the ATTRS77F and ATTRF64L subsets, the risk of being affected was more delayed, enhancing from age 45 (8%) to reach 94% and 74% by 90 y-o. The lowest risk values were observed in the ATTRI107V kindred, arising as late as 55 y-o, to score 17% at 60 y-o and 56% at age 90 years.

DISCUSSION

This work was performed in kindred carrying TTRV30M and six different TTR non-V30M mutations, diagnosed in expert academic centers. The overall sample reflects the heterogeneous pheno-genotypic picture of ATTRv amyloidosis observed in Europe. On the one hand, the TTRV30M variant is the most prevalent and virtually the only mutation detected in ATTRv families from Portugal, Sweden and Mallorca in Spain associated with an intriguing variation of the disease AO. On the other hand, a heterogeneity of TTR variants is the hallmark of ATTRv in other European countries, including France, Italy or Germany (Waddington-Cruz et al., 2019). Hence, this is the largest study reporting on the disease risk estimates in a wide panel of TTR mutation carriers in Europe.

Herein, we took advantage of the NPSE, a powerful method to estimate the disease's risk in mutation carriers, considering the whole familial information. Recently, NPSE has been adapted to test covariates, allowing further analysis of factors which might influence the disease's expression (risk) (Alarcon et al., 2018).

In line with previous reports, we found striking variation in AO between ATTRV30M patients of different geographical origin. An earlier onset was found (mean AO: 34 y-o) in Portuguese compared to French and Swedish kindred (mean AO: 59 and 55, respectively) (Plante-Bordeneuve et al., 2003; Gorram, Olsson et al., 2020). In Spanish families from Majorca, mean AO (50 y-o) was intermediate (Buades-Reinés et al., 2016). Intriguingly, the proportion of families with simultaneous occurrence of early and late onset cases was lower in the Portuguese and French kindred (12 and 15%) than in the Spanish (Majorcan) and Swedish families (40 and 30%). Despite that the family size, number of generations investigated and differences in the screening approach of asymptomatic carriers across centers may partially explain this difference, we think these findings highlight the broad variation of the disease's risk for individuals, most likely of multifactorial origin, genetic and epigenetic. In the ATTR-nonV30M families, differences in the mean AO were also detected, varying between ages of 45 ± 7 (ATTRT49A) up to 63 ± 9 years (ATTRF64L). Also, the predominance of male patients in both ATTRV30M and ATTR-non-V30M groups is consistent with previous findings from other populations (Koike, 2002; Plante-Bordeneuve et al., 2003; Saporta et al., 2009b). The main input of our work was to provide the disease's risks in a wide panel of TTRV30M and 6 different TTR-nonV30M gene carriers.

The disease's risk was found to be incomplete up to the age of 90 years in all population samples with a wide range from 56 to 95%. As reported in ATTRV30M families, the disease risk was significantly different between areas ($p < 2.10^{-15}$). Notably in this large sample taken as a whole, we were able to better apprehend on the one hand the influence of the gender, as well as on the other hand, the effect of the POO.

At first, we observed a trend to higher disease risk in male carriers ($p=0.02$). Although interpretation of the data was hindered by an intersection of the curves, we found a consistent excess of men among patients in each group (Table 1). Gender differences in the disease expression were reported in most TTRV30M population samples, in Europe including Portugal, France, Sweden (Plante-Bordeneuve et al., 2003, Gorram, Olsson et al., 2020;) and in non-European areas such as Brazil or Japan (Koike, 2002; Saporta et al., 2009b). Recently, the worldwide observational survey THAOS has reported that male patients were more likely to develop a cardiac phenotype stressing on the importance of phenotypic sex related differences (Rappezzi et al 2021 in press). However, the mechanisms underlying a gender difference with a higher disease risk in ATTRV30M male remain largely unknown.

Secondly, we confirmed a POO effect with a higher disease risk in carriers of maternal descent ($p=8.10^{-8}$) (Bonaiti et al., 2009; Gorram, Olsson et al., 2020). These results are consistent with previous studies reported that the sex of the transmitting parent influences the disease's anticipation, with a more pronounced anticipation among offsprings of affected mothers (Lemos et al., 2014; Gorram, Olsson et al., 2020). It has been suggested that, the POO effect can be partially explain by mitochondrial DNA (Bonaiti et al., 2010). Additionally, in a Portuguese cohort a higher mtDNA copy number was found in early-onset offspring, suggesting a risk effect of mtDNA inherited from affected mothers (Santos et al., 2018).

In ATTRv non-V30M families, previous data on the disease risks are scarce. Herein, we found striking differences of risks between families carrying different 7 TTR variants (6 df, $p= 10^{-15}$), more frequently diagnosed in the ATTRv families in these countries. Based on our analysis on the 7 TTR variant studied, we report the profile of the disease risk in each variant from age intervals where the disease risk raised, up to the estimates at age 90 years.

In all subsets, the disease risk started from age 30 years:

- In ATTRT49A families: earliest disease's risk from age 30 (2%), then rises rapidly (24% at age of 45) to 90%.
- In ATTRE89Q and ATTRS77Y kindred, disease risk from age 35 (6 % and 1% respectively) up to 90% and 71%.

- In ATTRF64L and ATTRS77F families: the disease risk was 8% at age 45 up to 74% and 94%.
- The ATTRI107V kindred displayed the lowest penetrance: risk increasing after age 50 y-o (17% at 60 y-o) up to 56%

Approximately 130 disease-causing TTR gene mutations have been reported; some are thought to be associated with particular phenotypes, although considerable variability exists among patients. Some genotype-phenotype correlations were reported. ATTRE89Q and ATTRF64L families from Sicily were characterized by late AO, severe or moderate peripheral neuropathy and cardiomyopathy as presenting symptoms. ATTRT49A mutated patients, distinguished by onset in the 5th decade, present with autonomic disturbances as inaugural symptoms and moderate polyneuropathy followed by cardiomyopathy (Mazzeo et al., 2015). In France, ATTRS77Y and ATTRS77F patients show a rapid and severe disease progression, developing gait disorders faster than Portuguese ATTRV30M patients (Mariani et al., 2015). ATTRV107I patients were characterized by the latest onset, the most debilitating and severe form (early onset of tetraparesis and short survival) (Carr et al., 2016).

- Underlying factors that may explain variations of the disease's risks remain largely unknown. As discussed previously, these are likely multifactorial, including genetic, epigenetic and environmental factors (Sekijima et al., 2005; Santos et al., 2017, 2019). Recent data highly support the role of non-coding regulatory variation on TTR gene expression, as a potential modulator of the disease expression (Sekijima et al., 2005; Santos et al., 2017, 2019). One recent study investigating the epigenetic profiling of ATTRv patients showed epigenetic differences (methylation change) between symptomatic and asymptomatic carriers provided a novel insights might be related to the molecular mechanisms involved in the complex heterogeneity of ATTRv (De Lillo et al., 2020). Furthermore, variation in other genes that interact with TTR might modulate the pathogenic processes. hence in the future, Genome-wide datasets generated from cohorts including hundred thousand ATTRV30M and non-V30M individuals can be leveraged to disentangle complex genotype–phenotype associations.

- Early and correct identification of ATTRv amyloidosis is vital for the prognosis, treatment choice, familial screening, and genetic counselling. The identification and monitoring of TTR gene carriers are of utmost importance to detect the disease emergence. This enables the initiation of the most suitable pharmacological treatment at the earliest stage. Data on the management of asymptomatic carriers are scarce and somewhat discordant (Obici et al., 2016; Schmidt et al., 2016; Conceição et al., 2019; Dohrn et al., 2020; Ueda et al., 2020). However, these recommendations studies did not mention the importance of considering the disease risks to adapt monitoring of asymptomatic carriers. Given, the pheno-genotypic heterogeneity of the disease, such guidelines should be adjusted to the different TTR variants and for the TTRV30M to the geographic origin and in a lesser extent to the POO and the gender. In this setting, our study presents important insights to be considered in the monitoring of the asymptomatic gene carrier and ages which are the most suitable for initiation of treatments. Thus, a suitable timeline might be proposed based on the disease's risk.
- Concerning the perspectives, an interesting extension of this work would be to introduce the influence of the maternal transmission in the risk estimates of the ATTRV30M families that we have detected to better specify the disease risk. From a methodological point of view, we will add the effect of maternal transmission in the conditional probability calculations of the statistic model.
- To improve our understanding on the variation of the disease and management of the asymptomatic gene carriers, it has become increasingly critical to provide an accurate assessment of the disease risk. Hence, in our penetrance study, it would be important to include the unobserved heterogeneity factors (genetic and/or environmental) into the modelling process by using a frailty model, like it has already been done for breast cancer (Gorfine et al., 2013). However, the estimation of such models is known to be challenging, especially in the context of non-parametric survival estimation (Therneau, 2012). Further investigations will be conducted on this important topic in order to precise the disease's risks.

Limitation of the study

- Nevertheless, the study has some limitations, including environmental differences among populations, various diagnostic criteria, the difference in the screening of the families and the determination of the AO of first symptoms and the data collection by the expert.

Conclusions

- In conclusion, data from different countries allowed to precise the disease risks in a large population of ATTRv carrying 7 different TTR mutations. Herein, we found an important variation of the disease's risk between TTR variants. In ATTRV30M families, we showed a varied risk according to geographical origin, the gender and the POO. Based on our results we propose age intervals where the disease risk is elevated, for each variant. The estimates of risk over finite time periods given here should be of considerable value in genetic counselling and especially for management of asymptomatic carriers. Our approach might be extended to obtain risk estimates on family samples from different areas and subsets carrying additional pathogenic TTR substitutions.

REFERENCES

- Adams, D., Polydefkis, M., González-Duarte, A., Wixner, J., Kristen, A.V., Schmidt, H.H., Berk, J.L., Losada López, I.A., Dispenzieri, A., Quan, D., et al. (2021). Long-term safety and efficacy of patisiran for hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy: 12-month results of an open-label extension study. *The Lancet Neurology* 20, 49–59.
- Alarcon F, Planté-Bordeneuve V, and Nuel G (2021). Study of the Parent-of-origin effect in monogenic diseases with variable age of onset: Application on transthyretin related amyloid polyneuropathy. In the Process and submitted on the Website: <https://arxiv.org/abs/2107.09365>.
- Alarcon, F., Bourgain, C., Gauthier-Villars, M., Planté-Bordeneuve, V., Stoppa-Lyonnet, D., and Bonaiti-Pellié, C. (2009). PEL: an unbiased method for estimating age-dependent genetic disease risk from pedigree data unselected for family history. *Genetic Epidemiology* 33, 379–385.
- Alarcon, F., Planté-Bordeneuve, V., Olsson, M., and Nuel, G. (2018). Non-parametric estimation of survival in age-dependent genetic disease and application to the transthyretin-related hereditary amyloidosis. *PLOS ONE* 13, e0203860.
- Ando, Y., Coelho, T., Berk, J.L., Cruz, M.W., Ericzon, B.-G., Ikeda, S., Lewis, W.D., Obici, L., Planté-Bordeneuve, V., Rapezzi, C., et al. (2013). Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8, 31.
- Andrade C, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy: familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75, 408–427.
- Araki, S. (1984). Type I familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Brain and Development* 6, 128–133.
- Barroso, F.A., Judge, D.P., Ebede, B., Li, H., Stewart, M., Amass, L., and Sultan, M.B. (2017). Long-term safety and efficacy of tafamidis for the treatment of hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: results up to 6 years. *Amyloid* 24, 194–204.
- Bonaiti, B., Alarcon, F., Bonaiti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2009). Parent-of-origin effect in transthyretin related amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 16, 149–150.
- Bonaiti, B., Olsson, M., Hellman, U., Suhr, O., Bonaiti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2010). TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? *European Journal of Human Genetics* 18, 948–952.
- Brannagan, T.H., Wang, A.K., Coelho, T., Waddington Cruz, M., Polydefkis, M.J., Dyck, P.J., Plante-Bordeneuve, V., Berk, J.L., Barroso, F., Merlini, G., et al. (2020). Early data on long-term efficacy and safety of inotersen in patients with hereditary transthyretin amyloidosis: a 2-year update from the open-label extension of the NEURO-TTR trial. *Eur J Neurol* 27, 1374–1381.
- Buades-Reinés, J., Raya-Cruz, M., Gallego-Lezaún, C., Ripoll-Vera, T., Usón-Martín, M., Andreu-Serra, H., and Cisneros-Barroso, E. (2016). Transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Mallorca: a comparison between late- and early-onset disease: Buades-Reinés et al. *Journal of the Peripheral Nervous System* 21, 352–356.
- Carr, A.S., Pelayo-Negro, A.L., Evans, M.R., Laurà, M., Blake, J., Stancanelli, C., Iodice, V., Wechalekar, A.D., Whelan, C.J., Gillmore, J.D., et al. (2016). A study of the neuropathy associated with transthyretin amyloidosis (ATTR) in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 620–627.

Conceição, I., Damy, T., Romero, M., Galán, L., Attarian, S., Luigetti, M., Sadeh, M., Sarafov, S., Tournev, I., and Ueda, M. (2019). Early diagnosis of ATTR amyloidosis through targeted follow-up of identified carriers of *TTR* gene mutations*. *Amyloid* 26, 3–9.

Costa, P.P., Figueira, A.S., and Bravo, F.R. (1978). Amyloid Fibril Protein Related to Prealbumin in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4499–4503.

De Lillo, A., De Angelis, F., Di Girolamo, M., Luigetti, M., Frusconi, S., Manfellotto, D., Fuciarelli, M., and Polimanti, R. (2019). Phenome-wide association study of *TTR* and *RBP4* genes in 361,194 individuals reveals novel insights in the genetics of hereditary and wildtype transthyretin amyloidoses. *Hum Genet* 138, 1331–1340.

De Lillo, A., Pathak, G.A., De Angelis, F., Di Girolamo, M., Luigetti, M., Sabatelli, M., Perfetto, F., Frusconi, S., Manfellotto, D., Fuciarelli, M., et al. (2020). Epigenetic profiling of Italian patients identified methylation sites associated with hereditary transthyretin amyloidosis. *Clinical Epigenetics* 12.

Dohrn, M.F., Auer-Grumbach, M., Baron, R., Birklein, F., Escolano-Lozano, F., Geber, C., Grether, N., Hagenacker, T., Hund, E., Sachau, J., et al. (2020). Chance or challenge, spoilt for choice? New recommendations on diagnostic and therapeutic considerations in hereditary transthyretin amyloidosis with polyneuropathy: the German/Austrian position and review of the literature. *J Neurol*.

Gorfine*, M., Hsu*, L., and Parmigiani, G. (2013). Frailty Models for Familial Risk With Application to Breast Cancer. *Journal of the American Statistical Association* 108, 1205–1215.

Gorram, F and Olsson, M., Alarcon, F., Nuel, G., Anan, I., and Planté-Bordeneuve, V. (2020). New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden. *Amyloid* 1–7.

Gorram, F., Alarcon, F., Perdry, H., Hébrard, B., Damy, T., Fanen, P., Funalot, B., Nuel, G., and Planté-Bordeneuve, V. (2017). Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (*TTR*-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). *Amyloid* 24, 115–116.

Hellman, U., Alarcon, F., Lundgren, H.-E., Suhr, O.B., Bonaiti-PelliÉ, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2008). Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 15, 181–186.

Holmgren, G., Costa, P.M., Andersson, C., Asplund, K., Steen, L., Beckman, L., Nylander, P.O., Teixeira, A., Saraiva, M.J., and Costa, P.P. (1994). Geographical distribution of *TTR* met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *Journal of Medical Genetics* 31, 351–354.

Iorio, A., De Lillo, A., De Angelis, F., Di Girolamo, M., Luigetti, M., Sabatelli, M., Pradotto, L., Mauro, A., Mazzeo, A., Stancanelli, C., et al. (2017). Non-coding variants contribute to the clinical heterogeneity of *TTR* amyloidosis. *European Journal of Human Genetics* 25, 1055–1060.

Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E., and Morgan, F.J. (1974). The Amino Acid Sequence of Human Plasma Prealbumin. *Journal of Biological Chemistry* 249, 6796–6805.

Koike, H. (2002). Type I (Transthyretin Met30) Familial Amyloid Polyneuropathy in Japan: Early- vs Late-Onset Form. *Arch Neurol* 59, 1771.

Lemos, C., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Martins-da-Silva, A., Sequeiros, J., Mendonca, D., and Sousa, A. (2014). Overcoming artefact: anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP) ATTRV30M. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 85, 326–330.

Mariani, L.-L., Lozeron, P., Théaudin, M., Mincheva, Z., Signate, A., Ducot, B., Algalarrondo, V., Denier, C., Adam, C., Nicolas, G., et al. (2015). Genotype-phenotype correlation and course of

transthyretin familial amyloid polyneuropathies in France: Severity of TTR-FAP in France. *Annals of Neurology* 78, 901–916.

Mazzeo, A., Russo, M., Di Bella, G., Minutoli, F., Stancanelli, C., Gentile, L., Baldari, S., Carerj, S., Toscano, A., and Vita, G. (2015). Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP): A Single-Center Experience in Sicily, an Italian Endemic Area. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2, S39–S48.

Obici, L., Kuks, J.B., Buades, J., Adams, D., Suhr, O.B., Coelho, T., and Kyriakides, T. (2016). Recommendations for presymptomatic genetic testing and management of individuals at risk for hereditary transthyretin amyloidosis. *Current Opinion in Neurology* 29, S27–S35.

Parman, Y., Adams, D., Obici, L., Galán, L., Guergueltcheva, V., Suhr, O.B., and Coelho, T. (2016). Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Current Opinion in Neurology* 29, S3–S13.

Plante-Bordeneuve, V., Carayol, J., Ferreira, A., Adams, D., Clerget-Darpoux, F., Misrahi, M., Said, G., and Bonaiti-Pellie, C. (2003). Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families. *Journal of Medical Genetics* 40, e120–e120.

R Core Team. R (2015). A Language and Environment for Statistical Computing.

Rapezzi, C., Quarta, C.C., Obici, L., Perfetto, F., Longhi, S., Salvi, F., Biagini, E., Lorenzini, M., Grigioni, F., Leone, O., et al. (2013). Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. *European Heart Journal* 34, 520–528.

Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Mendonça, D., Alonso, I., Lemos, C., and Sousa, A. (2017). Familial amyloid polyneuropathy in Portugal: New genes modulating age-at-onset. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 4, 98–105.

Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Mendonça, D., Alonso, I., Sousa, A., and Lemos, C. (2019). Large normal alleles of ATXN2 decrease age at onset in transthyretin familial amyloid polyneuropathy Val30Met patients: Large Normal ATXN2 Alleles. *Annals of Neurology* 85, 251–258.

Santos, D., Santos, M.J., Alves-Ferreira, M., Coelho, T., Sequeiros, J., Alonso, I., Oliveira, P., Sousa, A., Lemos, C., and Grazina, M. (2018). mtDNA copy number associated with age of onset in familial amyloid polyneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89, 300–304.

Saporta, M.A.C., Zaros, C., Cruz, M.W., André, C., Misrahi, M., Bonaïti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2009). Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy (type I) in Brazilian families. *European Journal of Neurology* 16, 337–341.

Schmidt, H.H. -J., Barroso, F., González-Duarte, A., Conceição, I., Obici, L., Keohane, D., and Amass, L. (2016). Management of asymptomatic gene carriers of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve* 54, 353–360.

Schmidt, H.H., Waddington-Cruz, M., Botteman, M.F., Carter, J.A., Chopra, A.S., Hopps, M., Stewart, M., Fallet, S., and Amass, L. (2018). Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy: ATTR-FAP Global Prevalence. *Muscle & Nerve* 57, 829–837.

Sekijima, Y., Wiseman, R.L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S.R., Sawkar, A.R., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2005). The Biological and Chemical Basis for Tissue-Selective Amyloid Disease. *Cell* 121, 73–85.

Therneau T (2012). *Mixed Effects Cox Models*.

Thomas, V.E., Smith, J., Benson, M.D., and Dasgupta, N.R. (2019). Amyloidosis: diagnosis and new therapies for a misunderstood and misdiagnosed disease. *Neurodegenerative Disease Management* 9, nmt-2019-0020.

Ueda, M., Sekijima, Y., Koike, H., Yamashita, T., Yoshinaga, T., Ishii, T., and Ando, Y. (2020). Monitoring of asymptomatic family members at risk of hereditary transthyretin amyloidosis for early intervention with disease-modifying therapies. *Journal of the Neurological Sciences* 414, 116813.

Waddington Cruz, M., Amass, L., Keohane, D., Schwartz, J., Li, H., and Gundapaneni, B. (2016). Early intervention with tafamidis provides long-term (5.5-year) delay of neurologic progression in transthyretin hereditary amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 23, 178–183.

Waddington-Cruz, M., Schmidt, H., Botteman, M.F., Carter, J.A., Stewart, M., Hopps, M., Fallet, S., and Amass, L. (2019). Epidemiological and clinical characteristics of symptomatic hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: a global case series. *Orphanet J Rare Dis* 14, 34.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Flowchart of ATTRv amyloidosis families included in the study.

Among all families investigated, we enrolled 342 families from different countries carrying 7 different TTR-variants for analysis.

Figure 2: The disease risks (penetrance) in ATTRV30M families based on the origin and the parent of origin (POO). **(a)** According to the origin, a difference of risks was observed between families (Log-rank test $p < 2.10^{-15}$). **(b)** According to the POO, the disease risk was significantly higher when the mutation was maternally inherited (RH 0.67, Cox's p -value 8.10^{-8}). The blue (maternal transmission) and the grey (paternal transmission) areas represent the confidence intervals (95%).

TABLES AND FIGURES

Table 1: Characteristics of the ATTRv amyloidosis families

TTR-Variant	v.V30M ^{1,2}				v.T49A	v.F64L	v.S77F	v.S77Y	v.E89Q	v.I107V ³
Country	Sweden	Portugal	Spain ³	France	France Italy ⁴	Italy ⁴	France	France	Italy ⁴ Turkey ⁵	France Brazil ⁵
Number of families (subjects)	104(1820)	67 (1249)	48 (428)	39 (955)	9 (213)	20 (193)	11 (187)	20 (472)	9 (192)	15 (315)
Affected (Men)	452 (275)	172 (112)	147 (86)	93 (64)	36 (16)	35 (33)	34 (22)	65 (41)	44 (24)	31 (24)
Asymptomatic carriers (Men)	139 (47)	56 (23)	123 (53)	58 (27)	8 (3)	11 (2)	10 (5)	22 (7)	18 (7)	11 (5)
Mean AO±SD⁶ [Range]	59 ±14 [22-92]	34 ±10 [20-78]	50 ±17 [22-82]	55 ±13 [20-75]	45 ±7 [30-66]	63 ±9 [42-78]	60 ±6 [51-75]	57 ±7 [35-73]	49 ±7 [37-78]	60 ±5 [53-79]

1. v: Variant; 2. There were a higher proportion of men among patients in all ATTRV30M groups: Sex ratio 1.5 ($p < 2.10^{-2}$) in Sweden, 1.8 ($p < 10^{-4}$) in Portugal, 1.4 ($p=0.03$) in Spain and 2.2 ($p < 2.10^{-4}$) in France; 3. Majorca region; 4. Sicily region; 5. One Family each from Turkey or Brazil; 6. AO±SD: Age at Onset ± Standard Deviation.

Table 2: Disease risk estimates (penetrance) according the TTR variants.

TTR-Variants ¹	Penetrance % [95% Confidence Interval]								
	25 y ²	30y	35 y	45 y	50 y	60 y	70 y	90 y	
v.V30M³	Portugal	11 [2-12]	22	26	56	67	80	87	95 [83-98]
	Spain⁴	4 [1-6]	5	7	19	25	34	48	69 [57-77]
	France	-	3 [0-6]	7	14	19	38	65	75 [62-87]
	Sweden	-	2 [1-3]	4	10	15	26	43	64 [59-68]
v.T49A	-	2 [0-5]	8	24	50	67	84	95 [62-99]	
v.E89Q	-	-	6 [0-13]	15	25	58	90	90 [66-98]	
v.S77Y	-	-	1 [0-3]	8	10	50	71	71 [54-82]	
v.S77F	-	-	-	7 [0-16]	11	57	70	94 [50-99]	
v.F64L	-	-	-	9 [3-20]	11	21	56	74 [51-92]	
v.I107V	-	-	-	-	-	17 [2-30]	44	56 [19-76]	

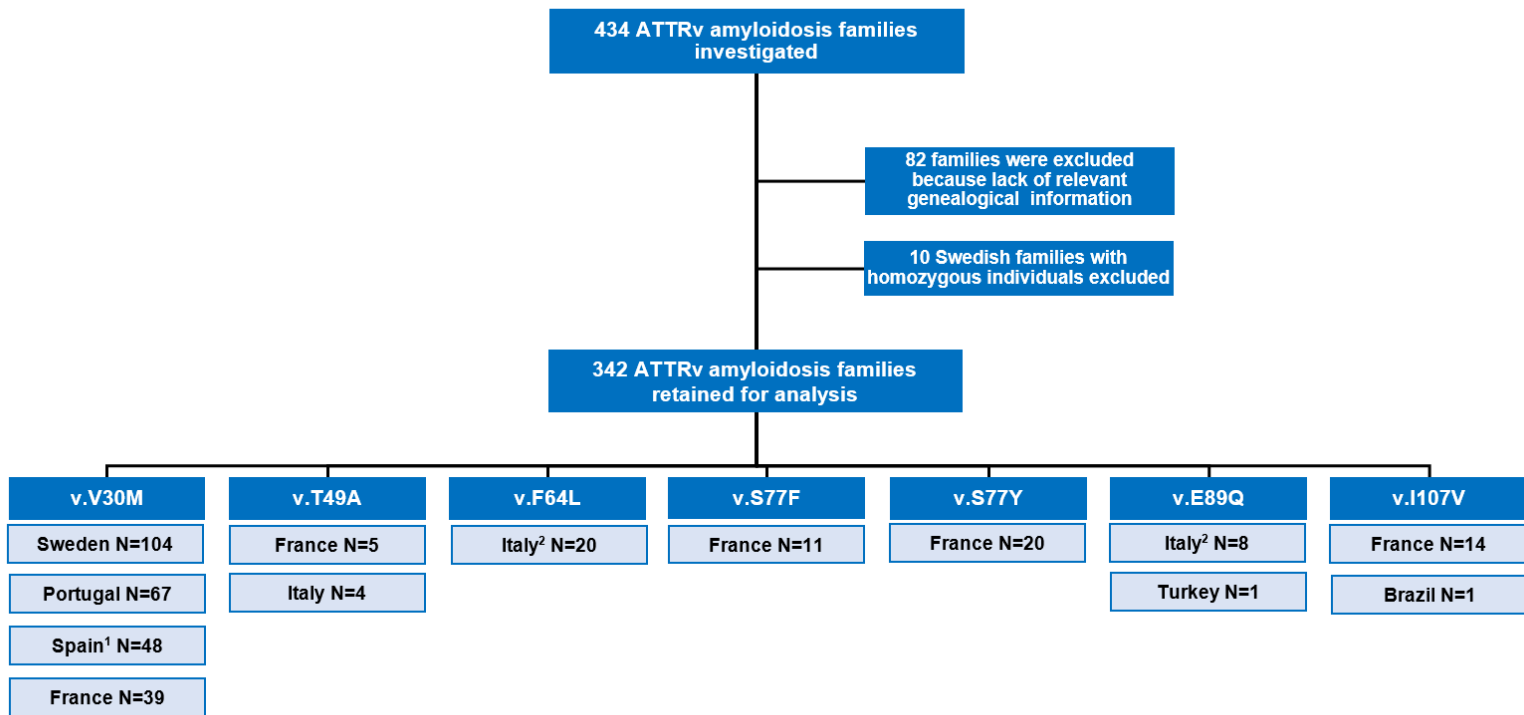
1. by a log-rank test, p-value was 10^{-15} between all TTR variants and $p < 2 \cdot 10^{-15}$ between TTR V30M according to origin; 2. y: Years; 3. v: Variant; - : Stands for 0%. 4. Majorca region.

Table 3: Disease risk estimates in ATTRV30M families according the gender and Parent-of Origin (POO).

Age (years)	Gender ¹		POO ²	
	Men	Women	Father	Mother
30	10 [8-12]	7 [5-9]	5 [4-6]	8 [6-10]
40	21 [17-24]	19 [16-22]	14 [12-16]	20 [18-23]
50	30 [27-34]	31 [27-35]	21 [19-24]	30 [27-33]
60	46 [42-50]	45 [41-50]	31 [28-34]	43 [40-47]
70	71 [66-75]	60 [55-65]	46 [42-49]	60 [56-64]
80	84 [78-89]	69 [63-74]	62 [58-66]	77 [73-80]
90	84 [78-89]	76 [63-84]	70 [64-75]	83 [79-87]

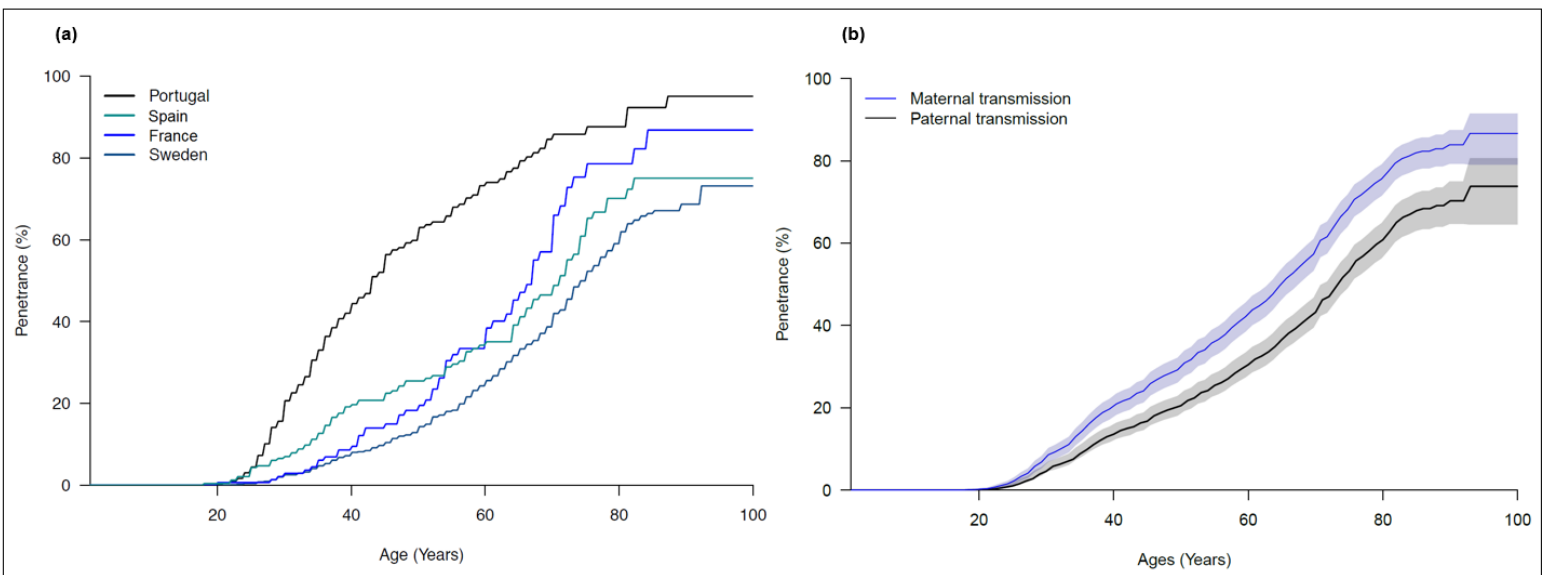
The disease risks values and [95% Confidence Intervals] are expressed in percentages.
 1. by log-rank test p-value was 0.02; 2. by likelihood ratio test p-value was 8.10^{-9} .

Figure 1



ATTRv amyloidosis: Hereditary Transthyretin Amyloidosis; N: Number of families; v: variant; 1: Majorca Island; 2: Sicily.

Figure 2



III. ETUDE DE L'EXPRESSION DU GENE TTR CHEZ LES PATIENTS ATTRV30M

1. Introduction

L'hétérogénéité phénotypique, notamment l'âge de début, a été largement documentée chez les patients porteurs de la mutation TTRV30M et représente une des caractéristiques les plus intrigante de cette population (Parman et al., 2016; Planté-Bordeneuve et al., 2003). Cela nous a amené à explorer le rôle de la TTR dans la variabilité de l'âge de début.

2. But et déroulement du projet

Nous avons étudié l'expression du gène TTR dans le foie, principal organe synthétisant le TTR. Notre hypothèse est que la présence d'un déséquilibre d'expression allélique de TTR pourrait expliquer la variabilité de l'âge de début. Premièrement, nous avons vérifié la présence de la mutation TTRV30M dans notre cohorte et deuxièmement, nous avons utilisé la Digital Droplet PCR™ (ddPCR) pour quantifier l'expression absolue du gène TTR (figure 38). Pour l'expression de la TTR, nous avons d'abord comparé le niveau d'expression de l'allèle muté et sauvage dans 2 groupes de patients ATTRV30M avec apparition précoce (P) et tardive (T) de la maladie. Puis, nous avons comparé l'expression de l'allèle TTR muté avec 3 gènes de références.

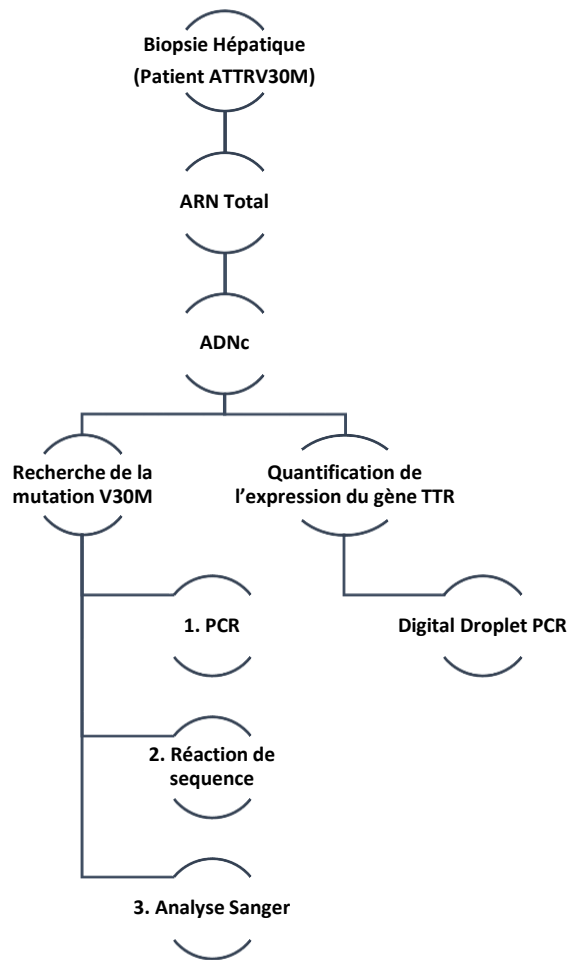


Figure 38: Déroulement de l'étude et des méthodes utilisées.

3. Méthodologie

3.1. Biopsies hépatiques

Les biopsies hépatiques utilisées proviennent d'une TH de patients ATTRV30M. Les biopsies récupérées sont placées dans une solution cryoconservatrice (RNAlater, Qiagen) qui stabilise et protège les ARNs par inactivation des RNAses et sont conservées à -80°C.

3.2. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADNc

Après broyage mécanique du tissu hépatique, l'ARN total est isolé à l'aide d'un kit RNeasy (Qiagen, ID: 74104) selon les recommandations du fabricant. La

concentration d'ARN est mesurée avec un spectrophotomètre (NanoDrop, DS-11FX). Les échantillons d'ARN sont ensuite traités à la DNase en présence de RNase inhibitor pour éliminer l'ADN résiduel. Cet ARN est converti en ADNc par l'action d'une reverse transcriptase. Une reverse transcription (RT-PCR) est réalisée avec le mélange réactionnel suivant : X uL d'ARN pour avoir 1ng, plus ou moins dilué dans de l'eau pour avoir un volume final de 20 uL, 5 µL de tampon (5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 2.5 µM de random hexamer, 1 mM de dNTP et 50 U de transcriptase inverse MuLV (kit Gene amp, RNA PCR, Core Kit, Applied BioSystems). Les échantillons d'ARN sont incubés dans le mélange réactionnel successivement 10 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à 42°C, 5 minutes à 99°C, puis 5 minutes à 5°C.

Evaluation de l'intégrité de l'ARN

L'électrophorèse capillaire du système Agilent 4150 TapeStation (Agilent®) a permis de déterminer précisément la qualité et la quantité d'ARN à partir d'un faible volume (1 µL) et efficace même pour la quantification de très faibles quantités d'échantillon. L'apport majeur est le calcul automatique d'un score qualité appelé RIN (RNA Integrity Number). Sa valeur est comprise de 1 à 10 sachant qu'un RIN de 10 correspond à un ARN de qualité parfaite et qu'un RIN de 1 correspond à un ARN totalement dégradé.

Séquençage du gène

Un séquençage des parties codantes du gène TTR a été effectué à la plateforme de génomique du CHU Henri Mondor sur un séquenceur automatique (ABI3130XL) après amplifications successives des 4 exons (Annexe 4).

3.3. La PCR digitale

La PCR digitale repose sur des méthodes traditionnelles d'amplification par PCR et de détection par fluorescence pour fournir une quantification absolue hautement sensible des acides nucléiques. L'approche de PCR Droplet Digital™, consiste à diluer en série un échantillon afin d'obtenir une dilution limite, où chaque partition (ici 20 000) contient, au plus, une molécule d'ADN (ou ADNc) cible. La distribution statistique de l'ADN dans les compartiments est alors donnée par la loi de Poisson,

qui régit les statistiques d'événements rares. La PCR digitale permet ainsi d'amplifier chaque ADNc cible dans un compartiment indépendant. Après amplification par PCR, seules les gouttelettes contenant la séquence cible sont détectées par fluorescence, elles sont alors définies « positives ». Les gouttelettes n'émettant pas de fluorescence sont définies « négatives ».

- **Génération des gouttelettes**

Le milieu réactionnel est transféré dans une plaque de 96 puits qui est mise dans un automate de génération des gouttelettes : « Automated Droplet Generator – AutoDG BioRad ». Les échantillons sont chargés sur une cartouche micro fluidique composée de 2 micro-canaux perpendiculaires, à l'intersection desquels se rencontrent la phase aqueuse (milieu réactionnel de PCR) et l'huile (figure 39). L'introduction du liquide aqueux dans l'huile de manière contrôlée crée les gouttelettes. Le générateur va produire pour chaque échantillon environ 20 000 gouttelettes d'environ 1 nanolitre. A la fin du processus, l'automate transfère les émulsions des différents échantillons dans une plaque de 96 puits compatible avec le thermocycleur.

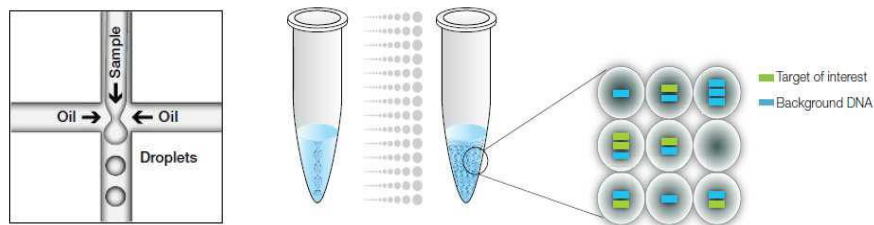


Figure 39 : Générateur de gouttelettes de taille et de volume uniformes. (https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf).

- **Amplification par PCR**

La plaque de 96 puits est scellée par thermofusion avec une feuille d'aluminium en utilisant l'instrument PX1™ Plate Sealer (BIO-RAD). La plaque est ensuite mise dans un thermocycleur (C1000 Touch Thermal Cycler-BIO-RAD) afin de réaliser les cycles de PCR (voir protocole Annexe 4).

- **Nature et lecture du signal**

Les amorces encadrent la séquence cible et déterminent ainsi la taille de la séquence d'intérêt amplifiée (exon du gène TTR). Deux sondes ont été utilisées, l'une spécifique de l'allèle muté et la seconde spécifique de l'allèle sauvage de TTR. Elles sont respectivement marquées par les fluorophores FAM (520 nm) et HEX (556 nm) dont la fluorescence est éteinte (ou désactivée) par la proximité d'un quencher. La plaque est chargée sur un lecteur de gouttelettes (QX200 Droplet Reader). A la manière d'un cymomètre de flux, les gouttelettes sont alignées dans une fin capillaire et analysées individuellement en passant successivement devant un détecteur (figure 40). La fluorescence est mesurée dans deux canaux d'émission, FAM et HEX. La fluorescence de chaque gouttelette est mesurée et les gouttelettes dont la taille n'est pas conforme sont rejetées.

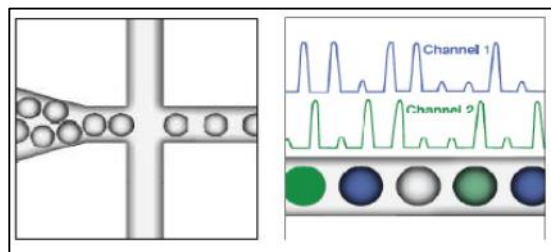


Figure 40: Lecture individuelle des gouttelettes, mesure de la fluorescence dans deux canaux (<https://www.bio-rad.com>).

- **Analyse des données**

Le lecteur de plaque est assisté par le logiciel « QuantaSoft Software ». A partir des données de lecture, le logiciel valide l'échantillon (au moins 10 000 gouttelettes « conformes » sont lues). Un nombre trop élevé de gouttelettes « positives » sature le signal. Le taux de gouttelettes positives dans un échantillon détermine la concentration d'ADN cible en copies/ μ L en utilisant la loi de Poisson.

3.4. Statistiques

Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer l'expression des gènes entre le groupe précoce (n= 3) et tardif (n=3). Les résultats sont considérés comme significatifs si p value < 0,05.

4. Résultats

Population

Cette étude préliminaire a été réalisée sur un total de 6 patients (3 hommes) porteurs de la mutation TTRV30M. Trois patients d'origine Portugaise à âge de début « précoce », (âge de début de la maladie < 35 ans) et 3 patients d'origine Française dont les premiers symptômes « tardif » ont commencé après l'âge de 50 ans (âge de début de la maladie > 50 ans) (tableau 15). Les TH ont eu lieu entre 2005 et 2015. Quatre d'entre eux ont réalisé leur TH au centre Hépatobiliaire Paul Brousse de Villejuif et 2 au CHU Henri Mondor de Créteil. Les patients du groupe « précoce » ont subi une TH généralement 1 à 2 ans après l'apparition de la maladie. Dans le groupe « tardif », elle a été réalisée beaucoup plus tardivement, 3 à 6 ans après le début des symptômes. La médiane d'âge de début de la maladie est de 32 ans dans le groupe précoce et 52 ans dans le groupe tardif.

Patient ATTRV30M	Sexe	Age de début des symptômes	Age à la TH	Groupe
1	Femme	31	33	Précoce
2	Femme	35	35	Précoce
3	Homme	30	32	Précoce
4	Homme	64	70	Tardif
5	Homme	52	55	Tardif
6	Femme	51	56	Tardif

Tableau 15: Caractéristiques des patients de l'étude.

Evaluation de l'intégrité de l'ARN

Les ARNs extraits des foies de patients porteurs de la mutation TTRV30M avaient un RIN moyen de 7 (tableau 16). Notons, qu'un RIN compris entre 7 et 10 correspond à des ARNs de bonne qualité.

Patient ATTRV30M	RIN
1	7.2
2	7.2
3	7.0
4	7.3
5	7.4
6	6.0

Tableau 16: RIN des 6 patients ATTRV30M.

Séquençage du gène TTR

La recherche de la mutation TTRV30M du gène TTR considérée comme pathogène a été identifiée par séquençage Sanger. Les séquences ont été alignées avec le logiciel Seqscape analysis (version 2.5, Life Technologies) et comparées avec la séquence de référence génomique. La mutation TTRV30M, située dans l'exon 2 du gène TTR a été détectée à l'état hétérozygote chez les 6 patients inclus dans l'étude (figure 41).

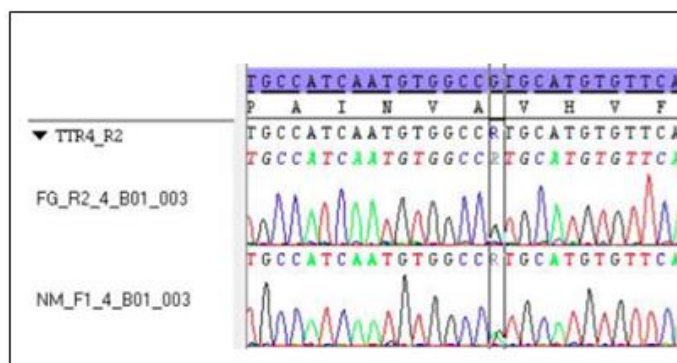


Figure 41: Tracé électrophorétique montrant la substitution de la valine en méthionine en position 30 du gène TTR (V30M).

Analyse de l'expression du gène TTR

Les sondes d'hybridation FAM (Carboxyfluoresceine) et HEX (Hexachloro-6-carboxyfluorescéine) ont été utilisées pour quantifier l'expression du gène TTR par RT-ddPCR. La sonde FAM (couleur bleue) cible l'allèle muté TTR et la sonde HEX (couleur verte) cible l'allèle sauvage. Différentes prises d'essais (Dilution au 100 et 1000^{ième}) ont été réalisées afin de ne pas saturer le détecteur du signal. Le nombre de copies d'ADN par μL de TTR de la dilution au 100^{ième} est représenté dans le tableau 16 et le nombre de gouttelettes positives dans la figure 42. Aucune différence d'expression n'a été observée en comparant le nombre de copies de l'allèle muté à l'allèle sauvage pour chaque patient (tableau 17) et ceci quelle que soit la dilution (100 ou 1000).

Nombre de copie par μL	Patients ATTRV30M	Allèle TTR muté	Allèle TTR non muté	Ratio
Groupe précoce	1	65,6	65,6	1.00
	2	150,2	143,5	1.04
	3	867,9	921,3	0.96
Groupe tardif	4	352,6	355,2	0.99
	5	181,8	165,3	1.09
	6	232,1	232,4	0.99

Tableau 17: Nombre de copies par microlitre de TTR des 6 patients V30M.

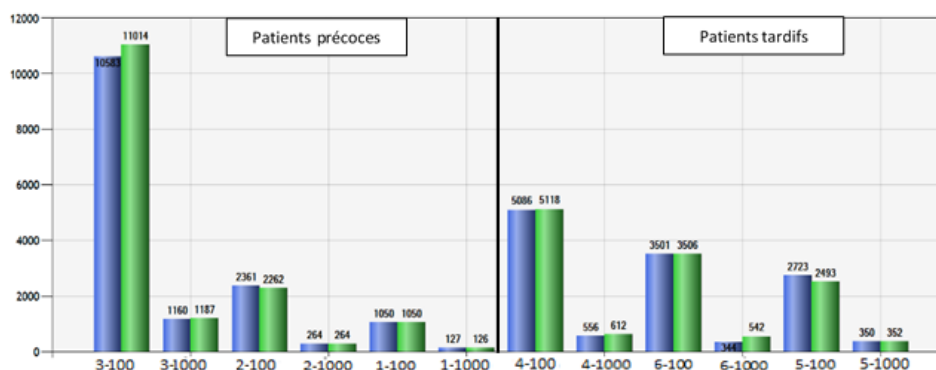


Figure 42: Représentation graphique du nombre de gouttelettes positives de l'allèle muté et sauvage du gène TTR.

Gène TTR et gènes de références

Pour finir, nous avons comparé l'expression de l'allèle TTR à des gènes de référence pour normaliser par rapport à la quantité d'ARN. A partir d'une base de données expérimentale (<https://www.proteinatlas.org>), nous avons sélectionné 3 gènes avec un taux d'expression hépatique important. La mesure d'expression de la TTR sauvage dans le foie humain réalisée par la technique de RNAseq était en moyenne de 5079 TPM (Transcripts per million). De ces données *in silico*, nous avons sélectionné le gène de l'heptaglobine (31711 TPM), la transferrine (3459 TPM), et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (816 TPM). La figure 43 montre le niveau d'expression de la TTR mutée par rapport aux gènes de référence dans le groupe « précoce » et « tardif ». Aucune différence d'expression de l'allèle muté de TTR normalisé par rapport aux gènes de références n'a été observée dans les 2 groupes analysés. La GAPDH est moins exprimée dans le foie que les gènes de l'heptaglobine et la transferrine. De plus, son expression varie considérablement entre les groupes précoce et tardif et même au sein des patients du même groupe. Il est par conséquent plus approprié de considérer uniquement les gènes de l'heptaglobine et transferrine comme gène de référence.

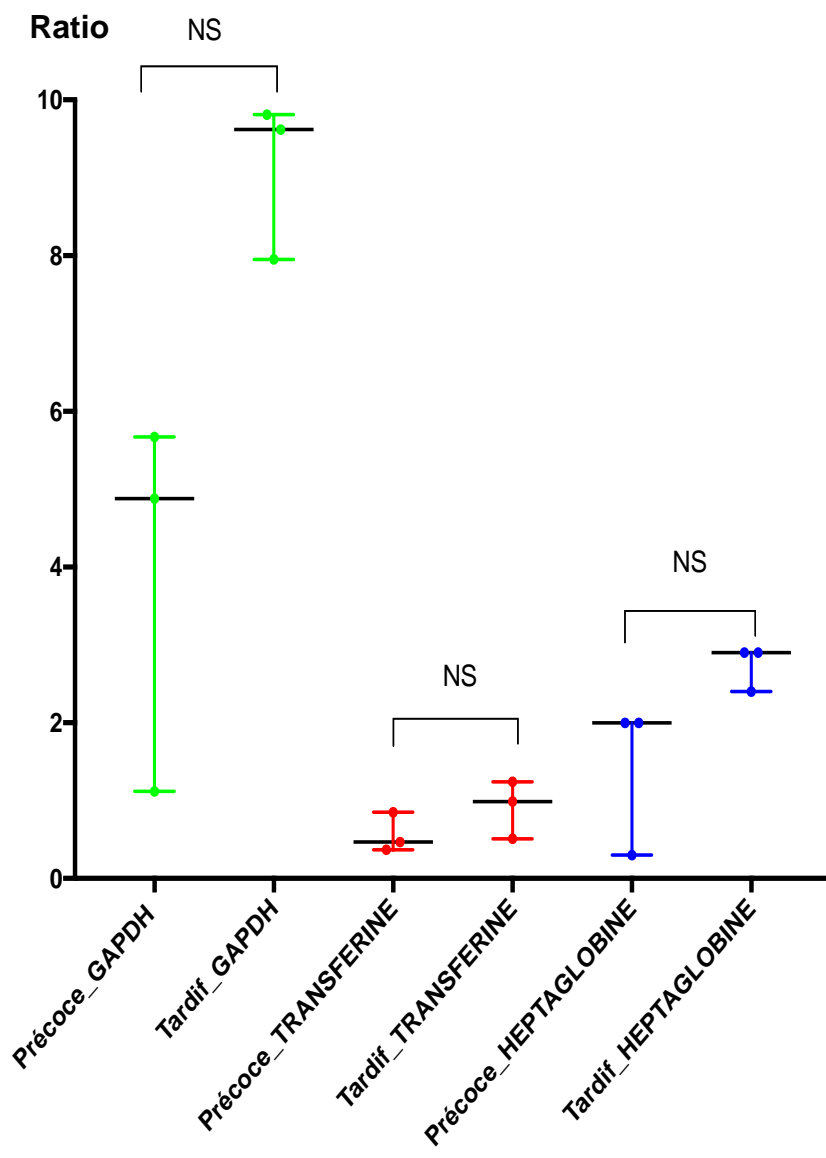


Figure 43: Expression de la TTR en fonction des 3 gènes de références.

5. Discussion

Cette étude a été réalisée dans deux groupes de patients atteints d'amylose à transthyrétine héréditaire et porteur de la mutation TTRV30M et avec une révélation de la maladie différente, « précoce » ou « tardive »,

Nous avons étudié l'expression du gène TTR dans des biopsies hépatiques de patients ATTRV30M par la technologie RT-ddPCR. Cette technique a l'avantage de quantifier de façon simple le nombre de copies d'ADN muté et non muté. La RT-qPCR classique peut également quantifier de façon absolue, cependant il faut construire une gamme standard qui permet d'extrapoler la Ct (valeur seuil de cycle) en fonction de la concentration. Cette mise en place peut être chronophage et coûteuse. Contrairement à la RT-qPCR, avec la RT-ddPCR nous n'avons pas eu besoin de gamme ni de réplicats techniques.

L'émergence de nouveaux traitements moins invasifs conduit à une diminution drastique des TH et par conséquent le recueil des biopsies hépatiques pour la recherche se fait plus rare. C'est entre autres pour cette raison que notre étude n'a porté que sur 6 prélèvements.

Le séquençage du gène TTR a permis de vérifier la présence exclusive de la mutation TTRV30M. La nouveauté de ce travail a été la quantification absolue de l'expression du gène TTR chez des patients ATTRV30M à révélation précoce et tardive de la maladie ainsi que la comparaison de l'expression du gène TTR par rapport à des gènes contrôles. Malgré des groupes de patients homogènes comme l'âge de début et une technique de détection sensible et précise, il n'a pas été mis en évidence de différence entre l'allèle muté et non muté de TTR au sein d'un même patient mais également entre les groupes « précoce » et « tardif ». Aucune différence du taux de TTR muté n'a été observée en considérant les gènes de références. L'ensemble de ces résultats doivent être interprétés avec prudence car le nombre de sujets analysés demeure très faible.

Les facteurs et les mécanismes impliqués pour expliquer la variation phénotypique dans les ATTRV30M restent inconnus. Cette variation phénotypique pourrait provenir d'une différence de facteurs génétiques associés ou non à des facteurs environnementaux. Peu d'études ont été publiées pour démêler les éventuels facteurs modificateurs impliqués. L'approche gène candidat a été la plus explorée. Parmi l'ensemble des gènes étudiés cités précédemment, dans les études

d'association de gènes certains étaient significativement associés à un âge de début précoce et d'autres à un âge de début tardif (Soares et al., 2005; Monteiro et al., 2006; Dardiotis et al., 2009; Santos et al., 2016, 2017). Les interactions gène-gène pourraient également être très importantes pour comprendre la structure et la fonction globales des voies de signalisation et la dynamique des mécanismes génétiques complexes associés à l'âge de début (Phillips, 2008). Ces résultats renforcent l'hypothèse de Soares et al. qui suggère que des interactions entre plusieurs locus pourraient expliquer les différences de phénotype des ATTRV30M (Soares et al., 2005).

D'autres facteurs modificateurs peuvent contribuer à la variation de l'âge de début comme par exemple, des mutations dynamiques dans d'autres gènes, comme observées dans la maladie de Parkinson et la maladie de Machado-Joseph (Chen et al., 2016; Hill-Burns et al., 2016). Les facteurs épigénétiques comme la méthylation de l'ADN dans la région promotrice des gènes peuvent contribuer à la variation de l'âge de début dans l'ATTRv. En 2020, une étude d'association à l'échelle de l'épigénome (Epigenome-Wide Association Study- EWAS) évaluant plus de 700 000 sites de méthylations a été menée. Un changement significatif de méthylation du site cg09097335 situé dans le gène de la bêta-sécrétase 2 (BACE2) ($p=6,26 \times 10^{-8}$) a été observé chez les patients V30M en comparaison aux contrôles. Le gène BACE2 est impliqué dans un réseau d'interactions protéiques et dans les voies moléculaires liés au métabolisme de la protéine bêta-amyloïde. De plus, les porteurs TTRV30M comparé aux contrôles présentaient une hypométhylation au niveau du site cg13139646 situé dans la région exonique de TTR ($p=3,34 \times 10^{-11}$) (De Lillo et al., 2020).

L'implication des microARNs dans les ATTRv a également été rapportée dans la littérature (Derda et al., 2018; Vita et al., 2020). Les microARN sont de petits ARN non codants jouant un rôle majeur dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes (Ardekani and Naeini, 2010). Les microARN ont été caractérisés comme des biomarqueurs de la gravité de la maladie ainsi que des effets du traitement dans la dystrophie musculaire de Duchenne (Sanson et al., 2020).

Cette étude préliminaire a permis de montrer que le taux d'expression du gène TTR hépatique de patients ATTRV30M n'expliquait pas à lui seul la différence d'âge de début. Les mécanismes précis modulant l'apparition, le développement et

l'expression de la maladie restent mal élucidés. Leur compréhension devrait permettre à plus longue échéance d'améliorer et de développer des traitements efficaces. A court terme, il serait intéressant d'étudier les régions régulatrices du gène TTR et les facteurs épigénétiques capables de réguler l'expression des gènes, comme les microARN et la méthylation de l'ADN chez les patients ATTRV30M.

CONCLUSIONS GÉNÉRALE

Ce projet s'est intéressé aux caractéristiques génétiques, épidémiologiques et à l'estimation du risque de maladie dans une large cohorte de 342 familles incluant des familles ATTRV30M et ATTRv non-V30M suivies dans 6 centres experts. L'échantillon global reflète le tableau phéno-génotypique hétérogène de l'amylose ATTRv en Europe. Nous observons, d'une part, le variant TTRV30M qui est le plus fréquent et pratiquement le seul variant détecté dans certains pays d'Europe (Portugal, Suède, Espagne (Majorque)). D'autre part, une hétérogénéité des mutations est observée dans d'autres pays, comme la France, l'Italie, ou l'Allemagne.

Nous rapportons pour la première fois la plus grande étude d'estimations du risque de maladie dans les ATTRv. Pour les analyses du risque, nous avons utilisé la méthode NPSE, une méthode puissante pour estimer le risque de maladie. Cette méthode robuste présente l'avantage d'être non-paramétrique, de tenir compte du recensement des familles et de prendre en compte différentes covariables dans l'estimation du risque. Dans le premier travail, nous avons montré qu'il existait des profils de risques différents selon le variant TTR. Ensuite, les analyses approfondies réalisées sur les familles suédoises ATTRV30M ont permis de démontrer l'existence d'une anticipation d'âge de début dans les paires mère-fils. Nous avons confirmé que le risque de maladie était la plus faible dans ces familles. Le sexe et le sexe du parent transmetteur semblent avoir une influence importante sur l'expression de la maladie. De plus, nous avons montré que le risque était similaire entre les individus hétérozygotes et homozygotes ATTRV30M suédois. Nous avons pu confirmer et identifier des différences de risque selon l'origine, le sexe et le sexe du parent transmetteur dans les familles ATTRV30M (France, Majorque, Portugal, Suède). De plus, nous avons pu caractériser les différents intervalles d'âge où le risque de maladie apparaît pour chaque variant TTR.

Enfin, nous n'avons pu dégager de corrélations entre le taux d'expression hépatique de TTR et l'âge de début chez les patients ATTRV30M.

L'ensemble de ces travaux est important pour améliorer notre compréhension des mécanismes ou facteurs impliqués dans les ATTRv. Sur le plan clinique, ces données sont utiles pour guider la prise en charge des sujets à risques.

PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons obtenu des résultats pouvant avoir un impact sur la prise en charge des porteurs de mutations et de leur famille ATTRv. Ces travaux ont ouvert de nouvelles voies à explorer. Ainsi, il serait intéressant par la suite de :

1. Estimer le risque de maladie sur des échantillons ATTR non-V30M plus importants, afin de préciser le risque de maladie pour chacune des mutations. D'autre part, il serait important d'estimer les risques dans les autres populations d'amylose ATTRv européennes (Allemagne), asiatiques (Japon), autres...
2. Estimer la fonction de pénétrance en tenant compte des trois covariables simultanément analysées dans ce travail (Origine, Sexe, Sexe du parent transmetteur) dans les familles ATTRV30M. Cette analyse devrait permettre de hiérarchiser les différents profils à risque et d'ajuster la prise en charge ;
3. Préciser les estimations de risques avec des covariables biologiques telles que des résultats d'étude GWAS;
4. Démêler le rôle d'autres gènes modificateurs liés à la variabilité de l'âge de début chez les patients ATTRV30M, en identifiant et en caractérisant de nouveaux gènes candidats. Dans ce contexte, la réalisation d'un RNA-Seq pour étudier les changements d'expression génique différentielle entre les patients d'âge de début inférieur et supérieur à 50 ans serait pertinente.
5. Enfin, la construction de modèles animaux développant une symptomatologie superposable à l'ATTRv chez l'homme serait utile pour l'étude de la régulation de l'expression de gène. Un modèle animal pourrait aider à la compréhension des mécanismes responsables de la formation de dépôts d'amylose, étape nécessaire pour de nouvelles orientations thérapeutiques.

REFERENCES

- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O'Riordan, W.D., Yang, C.-C., Ueda, M., Kristen, A.V., Tournev, I., Schmidt, H.H., Coelho, T., Berk, J.L., et al. (2018). Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 379, 11–21.
- Adams, D., Polydefkis, M., González-Duarte, A., Wixner, J., Kristen, A.V., Schmidt, H.H., Berk, J.L., Losada López, I.A., Dispenzieri, A., Quan, D., et al. (2021). Long-term safety and efficacy of patisiran for hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy: 12-month results of an open-label extension study. *Lancet Neurol.* 20, 49–59.
- Adamski-Werner, S.L., Palaninathan, S.K., Sacchettini, J.C., and Kelly, J.W. (2004). Diflunisal Analogues Stabilize the Native State of Transthyretin. Potent Inhibition of Amyloidogenesis. *J. Med. Chem.* 47, 355–374.
- Alarcon, F., Bourgain, C., Gauthier-Villars, M., Planté-Bordeneuve, V., Stoppa-Lyonnet, D., and Bonaiti-Pellié, C. (2009). PEL: an unbiased method for estimating age-dependent genetic disease risk from pedigree data unselected for family history. *Genet. Epidemiol.* 33, 379–385.
- Alarcon, F., Planté-Bordeneuve, V., and Nuel G (2021). Study of the Parent-of-origin effect in monogenic diseases with variable age of onset: Application on transthyretin related amyloid polyneuropathy. In the Process and submitted on the Website: <https://arxiv.org/abs/2107.09365>.
- Alarcon, F., Planté-Bordeneuve, V., Olsson, M., and Nuel, G. (2018). Non-parametric estimation of survival in age-dependent genetic disease and application to the transthyretin-related hereditary amyloidosis. *PLOS ONE* 13, e0203860.
- Alghamdi, J., and Padmanabhan, S. (2014). Fundamentals of Complex Trait Genetics and Association Studies. In *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, (Elsevier), pp. 235–257.
- Altland, K., Winter, P., and Sauerborn, MK. (1999). Electrically neutral microheterogeneity of human plasma transthyretin (prealbumin) detected by isoelectric focusing in urea gradients. 1349–1364.
- Alves, I.L., Altland, K., Almeida, M.R., Winter, P., and Saraiva, M.J.M. (1997). Screening and biochemical characterization of transthyretin variants in the Portuguese population. *Human Mutation* 9, 226–233.
- Alves, I.L., Divino, C.M., Schussler, G.C., Altland, K., Almeida, M.R., Palha, J.A., Coelho, T., Costa, P.P., and Saraiva, M.J. (1993). Thyroxine binding in a TTR Met 119 kindred. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 77, 484–488.
- Alves, I.L., Jacobson, D.R., Torres, M.F., Holmgren, G., Buxbaum, J., and Saraiva, M.J.M. (1996). Transthyretin Ser6 as a neutral polymorphism in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 3, 242–244.
- Andersson R (1976). Familial Amyloidosis with Polyneuropathy. A Clinical Study Based on Patients Living in Northern Sweden. *Acta Med Scand Suppl* 1–64.

- Ando, Y., Coelho, T., Berk, J.L., Cruz, M.W., Ericzon, B.-G., Ikeda, S., Lewis, W.D., Obici, L., Planté-Bordeneuve, V., Rapezzi, C., et al. (2013). Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 31.
- Andrade C, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy: familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75, 408–427.
- Andreou, S., Panayiotou, E., Michailidou, K., Pirpa, P., Hadjisavvas, A., El Salloukh, A., Barnes, D., Antoniou, A., Agathangelou, P., and Papastavrou, K. (2018). Epidemiology of ATTRV30M neuropathy in Cyprus and the modifier effect of complement C1q on the age of disease onset. *Amyloid* 25, 220–226.
- Araki S.(1995). Anticipation of age of onset in familial amyloidotic polyneuropathy and its pathogenesis. *Int Med.* 34: 703-704.
- Araki, S. (1984). Type I familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Brain Dev.* 6, 128–133.
- Araki, S., Mawatari, S., Ohta, M., Nakajima, A., and Kuroiwa, Y (1968). Polyneuritic Amyloidosis in a Japanese Family. *Arch Neurol* 18(6), 593–602.
- Ardekani, A.M., and Naeini, M.M. (2010). The Role of MicroRNAs in Human Diseases. 2, 19.
- Becker, P.E., Antunes, L., Ribeirodorosario, M., and Barros, F. (1964). [Paramyloidosis of Peripheral Nerves in Portugal]. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl* 37, 329–364.
- Bennhold H (1922). Eine spezifische amyloidfärbung mit kongorot. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1537.
- Benson, M.D., and Kincaid, J.C. (2007). The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle & Nerve* 36, 411–423.
- Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Eisenberg, D.S., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., Sekijima, Y., Sipe, J.D., and Westermark, P. (2018). Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 25, 215–219.
- Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Eisenberg, D.S., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., Sekijima, Y., Sipe, J.D., and Westermark, P. (2020). Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 27, 217–222.
- Bergen, H.R. (2004). Identification of Transthyretin Variants by Sequential Proteomic and Genomic Analysis. *Clinical Chemistry* 50, 1544–1552.
- Bergström, J., Gustavsson, Å., Hellman, U., Sletten, K., Murphy, C.L., Weiss, D.T., Solomon, A., Olofsson, B.-O., and Westermark, P. (2005). Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis: cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology. *The Journal of Pathology* 206, 224–232.
- Berk, J.L., Suhr, O.B., Obici, L., Sekijima, Y., Zeldenrust, S.R., Yamashita, T., Heneghan, M.A., Gorevic, P.D., Litchy, W.J., Wiesman, J.F., et al. (2013). Repurposing Diflunisal for Familial Amyloid Polyneuropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 310, 2658.
- Bezerra, F., Saraiva, M.J., and Almeida, M.R. (2020). Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13.

- Blake, Geisow MJ, Oatley SJ, Réat B, and Réat C (1978). Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* 121, 339–356.
- Bonaïti, B., Alarcon, F., Bonaïti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2009). Parent-of-origin effect in transthyretin related amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 16, 149–150.
- Bonaiti, B., Olsson, M., Hellman, U., Suhr, O., Bonaiti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2010). TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 948–952.
- Brett, M., Persey, M.R., Reilly, M.M., Revesz, T., Booth, D.R., Booth, S.E., Hawkins, P.N., Pepys, M.B., and Morgan-Hughes, J.A. (1999). Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain* 122, 183–190.
- Brown, C.R., Gupta, S., Qin, J., Racie, T., He, G., Lentini, S., Malone, R., Yu, M., Matsuda, S., Shulga-Morskaya, S., et al. (2020). Investigating the pharmacodynamic durability of GalNAc–siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res.* 48, 11827–11844.
- Buades-Reinés, J., Raya-Cruz, M., Gallego-Lezaún, C., Ripoll-Vera, T., Usón-Martín, M., Andreu-Serra, H., and Cisneros-Barroso, E. (2016). Transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Mallorca: a comparison between late- and early-onset disease: Buades-Reinés et al. *Journal of the Peripheral Nervous System* 21, 352–356.
- Bulawa, C.E., Connelly, S., DeVit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J.A., Packman, J., Powers, E.T., Wiseman, R.L., Foss, T.R., et al. (2012). Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 9629–9634.
- Bustamante, J.G., and Zaidi, S.R.H. (2021). Amyloidosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Buxbaum, J.N. (2018). Oligonucleotide Drugs for Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine* 4.
- Buxbaum, J.N., Brannagan, T., Buades-Reinés, J., Cisneros, E., Conceicao, I., Kyriakides, T., Merlini, G., Obici, L., Plante-Bordeneuve, V., Rousseau, A., et al. (2019). Transthyretin deposition in the eye in the era of effective therapy for hereditary ATTRV30M amyloidosis. *Amyloid* 26, 10–14.
- Cardoso, I., Brito, M., and Saraiva, M.J. (2008). Extracellular matrix markers for disease progression and follow-up of therapies in familial amyloid polyneuropathy V30M TTR-related. *Disease Markers* 25, 37–47.
- Carr, A.S., Pelayo-Negro, A.L., Evans, M.R., Laurà, M., Blake, J., Stancanelli, C., Iodice, V., Wechalekar, A.D., Whelan, C.J., Gillmore, J.D., et al. (2016). A study of the neuropathy associated with transthyretin amyloidosis (ATTR) in the UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 620–627.
- Carvalho, A., Rocha, A., and Lobato, L. (2015). Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: Issues and challenges: Liver Transplantation in Attr. *Liver Transpl.* 21, 282–292.

- Chen, R., Chen, C.P., and Preston, J.E. (2016). Effects of transthyretin on thyroxine and β -amyloid removal from cerebrospinal fluid in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43, 844–850.
- Coelho, T., Chorio, R., Sousa, A., Alves, I., Torres, MF., and Saraiva, MJM. (1996). Compound heterozygotes of transthyretin met30 and transthyretin met119 are protected from the devastating effects of familial amyloid polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders* 6, S20.
- Coelho, T., Maia, L.F., da Silva, A.M., Cruz, M.W., Planté-Bordeneuve, V., Lozeron, P., Suhr, O.B., Campistol, J.M., Conceição, I.M., and Schmidt, H.H.-J. (2012). Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology* 79, 785–792.
- Coelho, T., Sousa, A., Lourenco, E., and Ramalheira, J. (1994). A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *Journal of Medical Genetics* 31, 293–299.
- Cohen, A.S., and Calkins, E. (1959). Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* 183, 1202–1203.
- Conceição, I., Damy, T., Romero, M., Galán, L., Attarian, S., Luigetti, M., Sadeh, M., Sarafov, S., Tournev, I., and Ueda, M. (2019). Early diagnosis of ATTR amyloidosis through targeted follow-up of identified carriers of TTR gene mutations*. *Amyloid* 26, 3–9.
- Conceição, I., González-Duarte, A., Obici, L., Simoneau, D., Ong, M.-L., and Amass, L. (2016). “Red-flag” symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 5.
- Connors, L.H., Ericsson, T., Skare, J., Jones, L.A., Lewis, W.D., and Skinner, M. (1998). A simple screening test for variant transthyretins associated with familial transthyretin amyloidosis using isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1407, 185–192.
- Connors, L.H., Prokava, T., Lim, A., Théberge, R., Falk, R.H., Doros, G., Berg, A., Costello, C.E., O’Hara, C., Seldin, D.C., et al. (2009). Cardiac amyloidosis in African Americans: Comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis. *American Heart Journal* 158, 607–614.
- Cortese, A., Vita, G., Luigetti, M., Russo, M., Bisogni, G., Sabatelli, M., Manganeli, F., Santoro, L., Cavallaro, T., Fabrizi, G.M., et al. (2016). Monitoring effectiveness and safety of Tafamidis in transthyretin amyloidosis in Italy: a longitudinal multicenter study in a non-endemic area. *J. Neurol.* 263, 916–924.
- Costa, P.P., Figueira, A.S., and Bravo, F.R. (1978). Amyloid Fibril Protein Related to Prealbumin in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4499–4503.
- Costa, R., Ferreira-da-Silva, F., Saraiva, M.J., and Cardoso, I. (2008). Transthyretin Protects against A-Beta Peptide Toxicity by Proteolytic Cleavage of the Peptide: A Mechanism Sensitive to the Kunitz Protease Inhibitor. *PLoS ONE* 3, e2899.
- Costa, R.H., Van Dyke, T.A., Yan, C., Kuo, F., and Darnell, J.E. (1990). Similarities in transthyretin gene expression and differences in transcription factors: liver and yolk sac compared to choroid plexus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 6589–6593.

- Coutinho P, De Silva AM, Lima JL, and Barbosa AR (1980). Forty years of experience with type I amyloid neuropathy: review of 483 cases. *Amyloid and Amyloidosis*. Amsterdam, Excerpta Medica 88–98.
- da Silva-Batista, J.A., Marques Jr, W., Oliveira, M.T. de J.S., Lins, L.V.C., Galvão, A.J.P., Miguel, D.S.C.G., and Machado-Costa, M.C. (2020). Presence of val30Met and val122ile mutations in a patient with hereditary amyloidosis. *Journal of Human Genetics* 65, 711–713.
- Dardiotis, E., Koutsou, P., Zamba-Papanicolaou, E., Vonta, I., Hadjivassiliou, M., Hadjigeorgiou, G., Cariolou, M., Christodoulou, K., and Kyriakides, T. (2009). Complement C1Q polymorphisms modulate onset in familial amyloidotic polyneuropathy TTR Val30Met. *J. Neurol. Sci.* 284, 158–162.
- Date, Y., Nakazato, M., Kangawa, K., Shirieda, K., Fujimoto, T., and Matsukura, S. (1997). Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Journal of the Neurological Sciences* 150, 143–148.
- De Lillo, A., De Angelis, F., Di Girolamo, M., Luigetti, M., Frusconi, S., Manfellotto, D., Fuciarelli, M., and Polimanti, R. (2019). Phenome-wide association study of TTR and RBP4 genes in 361,194 individuals reveals novel insights in the genetics of hereditary and wildtype transthyretin amyloidoses. *Hum. Genet.* 138, 1331–1340.
- De Lillo, A., Pathak, G.A., De Angelis, F., Di Girolamo, M., Luigetti, M., Sabatelli, M., Perfetto, F., Frusconi, S., Manfellotto, D., Fuciarelli, M., et al. (2020). Epigenetic profiling of Italian patients identified methylation sites associated with hereditary transthyretin amyloidosis. *Clin. Epigenetics* 12.
- Dellière, S., Frenkiel, J., Hervann, A., Neveux, N., De Bandt, J.-P., and Cynober, L. (2016). Transthyréline : les recommandations françaises du diagnostic de dénutrition sont-elles en adéquation avec la prévalence de la dénutrition hospitalière ? *Nutrition Clinique et Métabolisme* 30, 131–132.
- Dempster, A.P., Laird, N.M., and work(s):, D.B.R.R. (1977). Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39, 1–38.
- DGOS (2021). Les maladies rares. <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/article/les-maladies-rares>.
- Dias, A., Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Alonso, I., Sousa, A., and Lemos, C. (2019). C1QA and C1QC modify age-at-onset in familial amyloid polyneuropathy patients. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6, 748–754.
- do Rosário Almeda, M., Altland, K., Rauh, S., Gawinowicz, M., Moreira, P., Pinho Costa, P., and João Saraiva, M. (1991). Characterization of a basic transthyretin variant - TTR Arg 102 - in the German population. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1097, 224–226.
- Dohrn, M.F., Auer-Grumbach, M., Baron, R., Birklein, F., Escolano-Lozano, F., Geber, C., Grether, N., Hagenacker, T., Hund, E., Sachau, J., et al. (2020). Chance or challenge, spoilt

for choice? New recommendations on diagnostic and therapeutic considerations in hereditary transthyretin amyloidosis with polyneuropathy: the German/Austrian position and review of the literature. *J Neurol*.

- Douglass, C., Suvarna, K., Reilly, M.M., Hawkins, P.N., and Hadjivassiliou, M. (2007). A novel amyloidogenic transthyretin variant, Gly53Ala, associated with intermittent headaches and ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 193–195.
- Drugge, U., Andersson, R., Chizari, F., Danielsson, M., Holmgren, G., Sandgren, O., and Sousa, A. (1993). Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: a pedigree analysis. *Journal of Medical Genetics* 30, 388–392.
- Durmuş-Tekçe, H., Matur, Z., Mert Atmaca, M., Poda, M., Çakar, A., Hıdır Ulaş, Ü., Oflazer-Serdaroğlu, P., Deymeer, F., and Parman, Y.G. (2016). Genotypic and phenotypic presentation of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Turkey. *Neuromuscul. Disord.* 26, 441–446.
- Dwulet, F.E., and Benson, M.D. (1986). Characterization of a Transthyretin (Prealbumin) Variant Associated with Familial Amyloidotic Polyneuropathy Type 11 (Indiana/Swiss). *J Clin Invest* 78, 880–886.
- Ellie, E., Camou, F., Vital, A., Rummens, C., Grateau, G., Delpech, M., and Valleix, S. (2001). Recurrent subarachnoid hemorrhage associated with a new transthyretin variant (Gly53Glu). *Neurology* 57, 135–137.
- Emsley, J., White, H.E., O'Hara, B.P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Pepys, M.B., and Wood, S.P. (1994). Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* 367, 338–345.
- Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E., and Robertson, E.J. (1993). Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 2375–2379.
- Ericzon, B.-G., Wilczek, H.E., Larsson, M., Wijayatunga, P., Stangou, A., Pena, J.R., Furtado, E., Barroso, E., Daniel, J., Samuel, D., et al. (2015). Liver Transplantation for Hereditary Transthyretin Amyloidosis: After 20 Years Still the Best Therapeutic Alternative? *Transplantation* 99, 1847–1854.
- Ferlini, A., Salvi, F., Uncini, A., El-Chami, J., Winter, P., Altland, K., Repetto, M., Littardi, M., Campoleoni, A., Vezzoni, P., et al. (1996). Homozygosity and heterozygosity for the transthyretin Leu64 mutation: clinical, biochemical and molecular findings. *Clinical Genetics* 49, 10–14.
- Finn, J.D., Smith, A.R., Patel, M.C., Shaw, L., Youniss, M.R., van Heteren, J., Dirstine, T., Ciullo, C., Lescarbeau, R., Seitzer, J., et al. (2018). A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep* 22, 2227–2235.

- Folli, C., Favilla, R., and Berni, R. (2010). The Interaction Between Retinol-Binding Protein and Transthyretin Analyzed by Fluorescence Anisotropy. In *Retinoids*, H. Sun, and G.H. Travis, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 189–207.
- Fraser, F.C. (1997). Trinucleotide repeats not the only cause of anticipation. *The Lancet* 350, 459–460.
- Friedman, N., and Koller, D. (2003). Being Bayesian About Network Structure. A Bayesian Approach to Structure Discovery in Bayesian Networks. *Machine Learning* 95–125.
- Gaetani, S., Bellovino, D., Apreda, M., and Devirgiliis, C. (2002). Hepatic synthesis, maturation and complex formation between retinol-binding protein and transthyretin. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 40, 1211–1220.
- Gertz, M.A., Benson, M.D., Dyck, P.J., Grogan, M., Coelho, T., Cruz, M., Berk, J.L., Plante-Bordeneuve, V., Schmidt, H.H.J., and Merlini, G. (2015). Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 2451–2466.
- Gillmore, J.D., Damy, T., Fontana, M., Hutchinson, M., Lachmann, H.J., Martinez-Naharro, A., Quarta, C.C., Rezk, T., Whelan, C.J., Gonzalez-Lopez, E., et al. (2018). A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *European Heart Journal* 39, 2799–2806.
- Gillmore, J.D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M.L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K.R., Wood, K., et al. (2021). CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* NEJMoa2107454.
- Gillmore, J.D., Maurer, M.S., Falk, R.H., Merlini, G., Damy, T., Dispenzieri, A., Wechalekar, A.D., Berk, J.L., Quarta, C.C., Grogan, M., et al. (2016). Nonbiopsy Diagnosis of Cardiac Transthyretin Amyloidosis. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation* 133, 2404–2412.
- Gomes, J.R., Nogueira, R., Vieira, M., Santos, S., Ferraz-Nogueira, J.P., Relvas, J.B., and Saraiva, M.J. (2016). Transthyretin provides trophic support via megalin by promoting neurite outgrowth and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cell Death & Differentiation* 23, 1749–1764.
- Gomes, J.R., Sárkány, Z., Teixeira, A., Nogueira, R., Cabrito, I., Soares, H., Wittelsberger, A., Stortelers, C., Macedo-Ribeiro, S., Vanlandschoot, P., et al. (2019). Anti-TTR Nanobodies Allow the Identification of TTR Neuritogenic Epitope Associated with TTR-Megalín Neurotrophic Activities. *ACS Chemical Neuroscience* 10, 704–715.
- González-Duarte, A., Soto, K.C., Martínez-Baños, D., Arteaga-Vazquez, J., Barrera, F., Berenguer-Sanchez, M., Cantu-Brito, C., García-Ramos, G., and Estañol Vidal, B. (2012). Familial amyloidosis with polyneuropathy associated with TTR Ser50Arg mutation. *Amyloid* 19, 171–176.
- Gorram, F., Alarcon, F., Perdry, H., Hébrard, B., Damy, T., Fanen, P., Funalot, B., Nuel, G., and Planté-Bordeneuve, V. (2017). Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). *Amyloid* 24, 115–116.

- Gorram, F., and Olsson. M., Alarcon. F., Nuel, G., Anan, I., and Planté-Bordeneuve, V. (2020). New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden. *Amyloid* 1–7.
- Goyal, N.A., and Mozaffar, T. (2015). Tongue atrophy and fasciculations in transthyretin familial amyloid neuropathy: An ALS mimicker. *Neurol Genet* 1, e18.
- Guo, X., Liu, Z., Zheng, Y., Li, Y., Li, L., Liu, H., Chen, Z., and Wu, L. (2020). Review on the Structures and Activities of Transthyretin Amyloidogenesis Inhibitors. *Drug Des. Dev. Ther* 14, 1057–1081
- Hammarstrom, P. (2001). Trans-Suppression of Misfolding in an Amyloid Disease. *Science* 293, 2459–2462.
- Harrison, H.H., Gordon, E.D., Nichols, W.C., and Benson, M.D. (1991). Biochemical and clinical characterization of prealbuminCHICAGO: An apparently benign variant of serum prealbumin (transthyretin) discovered with high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Am. J. Med. Genet.* 39, 442–452.
- Hellman, U., Alarcon, F., Lundgren, H.-E., Suhr, O.B., Bonaiti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2008). Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 15, 181–186.
- Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Fremeau RT, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, and Zimmerman EA (1986). Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology* 36, 900–911.
- Herlenius, G., Wilczek, H.E., Larsson, M., and Ericzon, B.-G. (2004). Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the familial amyloidotic polyneuropathy world transplant registry. *Transplantation* 77, 64–71.
- Hill-Burns, E.M., Ross, O.A., Wissemann, W.T., Soto-Ortolaza, A.I., Zarepari, S., Siuda, J., Lynch, T., Wszolek, Z.K., Silburn, P.A., Mellick, G.D., et al. (2016). Identification of genetic modifiers of age-at-onset for familial Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3849–3862.
- Hiroyuki, S., Naoko, Y., Yasuyuki, T., and Yoshiyuki, S. (1985). Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. *Gene* 37, 191–197.
- Holmgren, G. (2005). Impact of homozygosity for an amyloidogenic transthyretin mutation on phenotype and long term outcome. *Journal of Medical Genetics* 42, 953–956.
- Holmgren, G., Bergström, S., Drugge, U., Lundgren, E., Nording-Sikström, C., Sandgren, O., and Steen, L. (1992). Homozygosity for the transthyretin-Met30-gene in seven individuals with familial amyloidosis with polyneuropathy detected by restriction enzyme analysis of amplified genomic DNA sequences. *Clinical Genetics* 41, 39–41.
- Holmgren, G., Costa, P.M., Andersson, C., Asplund, K., Steen, L., Beckman, L., Nylander, P.O., Teixeira, A., Saraiva, M.J., and Costa, P.P. (1994). Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden: discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. *J. Med. Genet.* 31, 351–354.

- Holmgren, G., Haettner, E., Nordenson, I., Sandgren, O., Steen, L., and Lundgren, E. (1988). Homozygosity for the transthyretin-met30-gene in two Swedish sibs with familial amyloidotic polyneuropathy. *Clinical Genetics* 34, 333–338.
- Holmgren, G., Janekstedt, A., Karlberg, V., and Richardson, P.H.U. (1991). Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin. Genet.* 40, 242–246.
- Hörnsten, R., Pennlert, J., Wiklund, U., Lindqvist, P., Jensen, S.M., and Suhr, O.B. (2010). Heart complications in familial transthyretin amyloidosis: impact of age and gender. *Amyloid* 17, 63–68.
- Hu, S., Loo, J.A., and Wong, D.T. (2006). Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 6, 6326–6353.
- Iannuzzi, C., Irace, G., and Sirangelo, I. (2015). The Effect of Glycosaminoglycans (GAGs) on Amyloid Aggregation and Toxicity. *Molecules* 20, 2510–2528.
- Ibrahim, R.B., Yeh, S.-Y., Lin, K.-P., Ricardo, F., Yu, T.-Y., Chan, C.-C., Tsai, J.-W., and Liu, Y.-T. (2019). Cellular secretion and cytotoxicity of transthyretin mutant proteins underlie late-onset amyloidosis and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77, 1421–1434.
- Igor, I.S., Diukova, G., Pogromov, A., Kovalchuk, M., and Generozov, E. (2015). Familial amyloidotic polyneuropathy associated with the transthyretin CYS 114 gene in a Russian pair of monozygotic twins. *Orphanet J Rare Dis* 10, P16.
- Ihse, E., Rapezzi, C., Merlini, G., Benson, M.D., Ando, Y., Suhr, O.B., Ikeda, S., Lavatelli, F., Obici, L., Quarta, C.C., et al. (2013). Amyloid fibrils containing fragmented ATTR may be the standard fibril composition in ATTR amyloidosis. *Amyloid* 20, 142–150.
- Inês, M., Coelho, T., Conceição, I., Duarte-Ramos, F., de Carvalho, M., and Costa, J. (2018). Epidemiology of Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy in Portugal: A Nationwide Study. *Neuroepidemiology* 51, 177–182.
- Ingbar SH (1958). PRE-ALBUMIN: A THYROXINE-BINDING PROTEIN OF HUMAN PLASMA. *Endocrinology* 63, 256–259.
- Izumoto, S., and Herbert, J. (1993). Widespread constitutive expression of HSP90 messenger RNA in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 35, 20–28.
- Jacobson, D.R., and Buxbaum, J.N. (1994). A double-variant transthyretin allele (SER 6, ILE 33) in the Israeli patient “SKO” with familial amyloidotic polyneuropathy. *Human Mutation* 3, 254–260.
- Jacobson, D.R., McFarlin, D.E., Kane, I., and Buxbaum, J.N. (1992). Transthyretin Pro 55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Human Genetics* 89, 353–356.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.

- Jones, L.A., Skara, J.C., Cohen, A.S., Harding, J.A., Milunsky, A., and Skinner, M. (1992). Familial amyloidotic polyneuropathy: a new transthyretin position 30 mutation (alanine for valine) in a family of German descent. *Clinical Genetics* 41, 70–73.
- Judge, D.P., Heitner, S.B., Falk, R.H., Maurer, M.S., Shah, S.J., Witteles, R.M., Grogan, M., Selby, V.N., Jacoby, D., Hanna, M., et al. (2019). Transthyretin Stabilization by AG10 in Symptomatic Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 74, 285–295.
- Kanda, Y., Goodman, D.S., Canfield, R.E., and Morgan, F.J. (1974). The Amino Acid Sequence of Human Plasma Prealbumin. *J. Biol. Chem.* 249, 6796–6805.
- Kaplan, E.L., and Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457–481.
- Kato-Motozaki, Y., Ono, K., Shima, K., Morinaga, A., Machiya, T., Nozaki, I., Shibata-Hamaguchi, A., Furukawa, Y., Yanase, D., Ishida, C., et al. (2008). Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan: Identification of a novel endemic focus. *Journal of the Neurological Sciences* 270, 133–140.
- Kishikawa M, Nakanishi T, Miyazaki A, Hatanaka M, Shimizu A, Tamoto S, Ohsawa N, Hayashi H, and Kanai M (1998). A new nonamyloid transthyretin variant, G101S, detected by electrospray ionization/mass spectrometry. *Mutations in brief no. 201. Human Mutation* 12, 363.
- Kisilevsky, R., Ancsin, J.B., Szarek, W.A., and Petanceska, S. (2007). Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications. *Amyloid* 14, 21–32.
- Kohno, K., Palha, J.A., Miyakawa, K., Saraiva, M.J.M., Ito, S., Mabuchi, T., Blaner, W.S., Tsukahara, S., Gottesman, M.E., Yamamura, K., et al. (1997). Analysis of Amyloid Deposition in a Transgenic Mouse Model of Homozygous Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Am J Pathol* . 150, 1497-508.
- Koike, H. (2002). Type I (Transthyretin Met30) Familial Amyloid Polyneuropathy in Japan: Early- vs Late-Onset Form. *Arch. Neurol.* 59, 1771.
- Koike, H., Tanaka, F., Hashimoto, R., Tomita, M., Kawagashira, Y., Iijima, M., Fujitake, J., Kawanami, T., Kato, T., Yamamoto, M., et al. (2012). Natural history of transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy: analysis of late-onset cases from non-endemic areas. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 83, 152–158.
- Kolb, B., Whishaw, I.Q., Teskey, G.C., Canu, M.H., Dupont, E., Noulhiane, M., and Linares, N.N. (2019). *Cerveau et comportement, 5^{ème} édition (De Boeck)*.
- Kraft, P., and Thomas, D.C. (2000). Bias and Efficiency in Family-Based Gene-Characterization Studies: Conditional, Prospective, Retrospective, and Joint Likelihoods. *The American Journal of Human Genetics* 66, 1119–1131.
- Kristen, A.V. (2020). Amyloid cardiomyopathy. *Herz* 45, 267–271.
- Kyle, R.A. (2001). Amyloidosis: a convoluted story: Historical Review. *British Journal of Haematology* 114, 529–538.

- Laisen, R.M. (1930). A Pathological Study of Primary Myocardial Amyloidosis. *Am J Pathol* 6, 147-160.5.
- Lauritzen, S.L., and Sheehan, N.A. (2003). Graphical Models for Genetic Analyses. *Statist. Sci.* 18.
- Le Bihan, C., Moutou, C., Brugières, L., Feunteun, J., and Bonaïti-Pellié, C. (1995). ARCAD: A method for estimating age-dependent disease risk associated with mutation carrier status from family data. *Genetic Epidemiology* 12, 13–25.
- Lemos, C., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Martins-da-Silva, A., Sequeiros, J., Mendonca, D., and Sousa, A. (2014). Overcoming artefact: anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP) ATTRV30M. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 326–330.
- Li, X., Lyu, Y., Shen, J., Mu, Y., Qiang, L., Liu, L., Araki, K., Imbimbo, B.P., Yamamura, K., Jin, S., et al. (2018). Amyloid deposition in a mouse model humanized at the transthyretin and retinol-binding protein 4 loci. *Laboratory Investigation* 98, 512–524.
- Liepnieks, J.J., Dickson, D.W., and Benson, M.D. (2011). A new transthyretin mutation associated with leptomenigeal amyloidosis. *Amyloid* 18, 160–162.
- Liepnieks, J.J., Zhang, L.Q., and Benson, M.D. (2010). Progression of transthyretin amyloid neuropathy after liver transplantation. *Neurology* 75, 324–327.
- Lim A, Prokaeva T, Connors L, Falk RH, Skinner M, and Costello CE (2002). Identification of a novel transthyretin Thr59Lys/Arg104His. A case of compound heterozygosity in a Chinese patient diagnosed with familial transthyretin amyloidosis. *Amyloid* 134–140.
- Lindahl, U., and Li, J. (2009). Chapter 3 Interactions Between Heparan Sulfate and Proteins—Design and Functional Implications. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 105–159.
- Liu G, Ni W, and Wang H (2017). Clinical features of familial amyloid polyneuropathy carrying transthyretin mutations in four Chinese kindreds. *J Peripher Nerv Syst* 19-26.
- Liz, M.A., Faro, C.J., Saraiva, M.J., and Sousa, M.M. (2004). Transthyretin, a New Cryptic Protease. *Journal of Biological Chemistry* 279, 21431–21438.
- Liz, M.A., Fleming, C.E., Nunes, A.F., Almeida, M.R., Mar, F.M., Choe, Y., Craik, C.S., Powers, J.C., Bogyo, M., and Sousa, M.M. (2009). Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system. *Biochemical Journal* 419, 467–474.
- Lobato, L., and Rocha, A. (2012). Transthyretin Amyloidosis and the Kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 7, 1337–1346.
- Long, D., Zeng, J., Wu, L.Q., Tang, L.S., Wang, H.L., and Wang, H. (2012). Vitreous amyloidosis in two large mainland Chinese kindreds resulting from transthyretin variant Lys35Thr and Leu55Arg. *Ophthalmic Genetics* 33, 28–33.
- Lubarsch, O. (1929). Zur Kenntnis ungewöhnlicher Amyloidablagerungen. *Virchows Arch. path Anat.* 271, 867–889.
- Mangione, P.P., Verona, G., Corazza, A., Marcoux, J., Canetti, D., Giorgetti, S., Raimondi, S., Stoppini, M., Esposito, M., Relini, A., et al. (2018). Plasminogen activation triggers transthyretin amyloidogenesis in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 293, 14192–14199.

- Mariani, L.-L., Lozeron, P., Théaudin, M., Mincheva, Z., Signate, A., Ducot, B., Algalarrondo, V., Denier, C., Adam, C., Nicolas, G., et al. (2015). Genotype-phenotype correlation and course of transthyretin familial amyloid polyneuropathies in France: Severity of TTR-FAP in France. *Ann. Neurol.* 78, 901–916.
- Matsumoto, S., Ueda, M., Yamashita, T., Amano, T., Misumi, Y., Tasaki, M., Masuda, T., Mizukami, M., Furuya, H., and Ando, Y. (2017). A late-onset case of hereditary transthyretin amyloidosis with a novel compound heterozygous mutation. *Amyloid* 24, 97–98.
- Maurer, M.S., Hanna, M., Grogan, M., Dispenzieri, A., Witteles, R., Drachman, B., Judge, D.P., Lenihan, D.J., Gottlieb, S.S., Shah, S.J., et al. (2016). Genotype and Phenotype of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 161–172.
- Maurer, M.S., Schwartz, J.H., Gundapaneni, B., Elliott, P.M., Merlini, G., Waddington-Cruz, M., Kristen, A.V., Grogan, M., Witteles, R., Damy, T., et al. (2018). Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* 379, 1007–1016.
- Mazzeo, A., Russo, M., Di Bella, G., Minutoli, F., Stancanelli, C., Gentile, L., Baldari, S., Carerj, S., Toscano, A., and Vita, G. (2015). Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP): A Single-Center Experience in Sicily, an Italian Endemic Area. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, S39–S48.
- Miller, M., Pal, A., Albusairi, W., Joo, H., Pappas, B., Haque Tuhin, M.T., Liang, D., Jampala, R., Liu, F., Khan, J., et al. (2018). Enthalpy-Driven Stabilization of Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring Genetic Variant That Protects from Transthyretin Amyloidosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 61, 7862–7876.
- Misu, K., Hattori, N., Nagamatsu, M., Ikeda, S., Ando, Y., Nakazato, M., Takei, Y., Hanyu, N., Usui, Y., Tanaka, F., et al. (1999). Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. *Brain* 122, 1951–1962.
- Monteiro, F.A., Sousa, M.M., Cardoso, I., Amaral, J.B., Guimaraes, A., and Saraiva, M.J. (2006). Activation of ERK1/2 MAP kinases in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *J. Neurochem.* 97, 151–161.
- Moses, A.C., Rosen, H.N., Moller, D.E., Tsuzaki, S., Haddow, J.E., Lawlor, J., Liepnieks, J.J., Nichols, W.C., and Benson, M.D. (1990). A point mutation in transthyretin increases affinity for thyroxine and produces euthyroid hyperthyroxinemia. *J. Clin. Invest.* 86, 2025–2033.
- Munar-Qués, M., Pedrosa, J.L., Coelho, T., Gusmao, L., Seruca, R., Amorim, A., and Sequeiros, J. (1999). Two pairs of proven monozygotic twins discordant for familial amyloid neuropathy (FAP) TTR Met 30. *Journal of Medical Genetics* 36, 629–632.
- Nagata, Y., Tashiro, F., Yi, S., Murakami, T., Maeda, S., Takahashi, K., Shimada, K., Okamura, H., and Yamamura, K. (1995). A 6-kb upstream region of the human transthyretin gene can direct developmental, tissue-specific, and quantitatively normal expression in transgenic mouse. *The Journal of Biochemistry* 117, 169–175.

- Nakagawa, K., Sheikh, S.I., Snuderl, M., Frosch, M.P., and Greenberg, S.M. (2008). A new Thr49Pro transthyretin gene mutation associated with leptomeningeal amyloidosis. *Journal of the Neurological Sciences* 5.
- Navasquez, S.D., and Treble, H.A. (1938). A case of primary generalized amyloid disease with involvement of the nerves. *Brain* 61, 116–128.
- Nguengang Wakap, S., Lambert, D.M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., and Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur. J. Hum. Genet.* 28, 165–173.
- Niemietz, C., Chandhok, G., and Schmidt, H. (2015). Therapeutic Oligonucleotides Targeting Liver Disease: TTR Amyloidosis. *Molecules* 20, 17944–17975.
- Obici, L., and Adams, D. (2020). Acquired and inherited amyloidosis: Knowledge driving patients' care. *Journal of the Peripheral Nervous System* 25, 85–101.
- Obici, L., Berk, J.L., González-Duarte, A., Coelho, T., Gillmore, J., Schmidt, H.H.-J., Schilling, M., Yamashita, T., Labeyrie, C., Brannagan, T.H., et al. (2020). Quality of life outcomes in APOLLO, the phase 3 trial of the RNAi therapeutic patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Amyloid* 27, 153–162.
- Obici, L., Cortese, A., Lozza, A., Lucchetti, J., Gobbi, M., Palladini, G., Perlini, S., Saraiva, M.J., and Merlini, G. (2012). Doxycycline plus tauroursodeoxycholic acid for transthyretin amyloidosis: a phase II study. *Amyloid* 19, 34–36.
- Ohmori, H. (2004). Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J. Med. Genet.* 41, e51–e51.
- Olsson, M., Hellman, U., Planté-Bordeneuve, V., Jonasson, J., Lång, K., and Suhr, O. (2009). Mitochondrial haplogroup is associated with the phenotype of familial amyloidosis with polyneuropathy in Swedish and French patients. *Clinical Genetics* 75, 163–168.
- Olsson, M., Jonasson, J., Cederquist, K., and Suhr, O.B. (2014). Frequency of the transthyretin Val30Met mutation in the northern Swedish population. *Amyloid* 21, 18–20.
- Palha, J.A., Hays, M.T., Morreale de Escobar, G., Episkopou, V., Gottesman, M.E., and Saraiva, M.J. (1997). Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 272, E485–E493.
- Pan, D., Bouligand, J., Guiochon-Mantel, A., and Adams, D. (2015). FAP in India: a first genetically proven case. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10.
- Parman, Y., Adams, D., Obici, L., Galán, L., Guergueltcheva, V., Suhr, O.B., and Coelho, T. (2016). Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr. Opin. Neurol.* 29, S3–S13.
- Pearl, J. (1985). *Bayesian networks: A model of self-activated memory for evidential reasoning.* University of California (Los Angeles). Computer Science Department.
- Penchala, S.C., Connelly, S., Wang, Y., Park, M.S., Zhao, L., Baranczak, A., Rappley, I., Vogel, H., Liedtke, M., Witteles, R.M., et al. (2013). AG10 inhibits amyloidogenesis and cellular toxicity

of the familial amyloid cardiomyopathy-associated V122I transthyretin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 9992–9997.

- Penrose, L.S., The problem of anticipation in pedigrees of dystrophia myotonica. (1948). *Ann Eugen*,14(2): p. 125-32.
- Pepys, M.B. (2017). Immunotherapeutic clearance of systemic amyloid deposits by antibodies to serum amyloid P component. *Amyloid* 24, 5–6.
- Pepys, M.B., Booth, D.R., Hutchinson, W.L., Gallimore, J.R., Collins, I.M., and Hohenester, E. (1997). Amyloid P component. A critical review. *Amyloid* 4, 274–295.
- Perfetto, F., Cappelli, F., and Bergesio, F. (2011). Asymptomatic homozygous gene carrier in a family with Ile68Leu ATTR amyloidosis: a new endemic region in northern Tuscany? *Journal of Cardiovascular Medicine* 12.
- Petersen, R.B., Goren, H., Cohen, M., Richardson, S.L., Tresser, N., Lynn, A., Gali, M., Estes, M., and Gambetti, P. (1997). Transthyretin amyloidosis: a new mutation associated with dementia. *Annals of Neurology* 41, 307–313.
- Petrassi, H.M., Klabunde, T., Sacchettini, J., and Kelly, J.W. (2000). Structure-Based Design of N -Phenyl Phenoxazine Transthyretin Amyloid Fibril Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2178–2192.
- Phillips, P.C. (2008). Epistasis — the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet* 9, 855–867.
- Planté-Bordeneuve, V. (2007). Diagnostic pitfalls in sporadic transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP). 7.
- Planté-Bordeneuve, V. (2014). Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of Neurology* 261, 1227–1233.
- Planté-Bordeneuve, V., and Said, G. (2011). Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol.* 10, 1086–1097.
- Planté-Bordeneuve, V., Carayol, J., Ferreira, A., Adams, D., Clerget-Darpoux, F., Misrahi, M., Said, G., and Bonaiti-Pellié, C. (2003). Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families. *J. Med. Genet.* 40, e120–e120.
- Plante-Bordeneuve, V., Lalu, T., Misrahi, M., Reilly, M.M., Adams, D., Lacroix, C., and Said, G. (1998). Genotypic-phenotypic variations in a series of 65 patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 51, 708–714.
- Polimanti, R., Di Girolamo, M., Manfellotto, D., and Fuciarelli, M. (2013). Functional variation of the transthyretin gene among human populations and its correlation with amyloidosis phenotypes. *Amyloid* 20, 256–262.
- Polimanti, R., Di Girolamo, M., Manfellotto, D., and Fuciarelli, M. (2014). In silico analysis of TTR gene (coding and non-coding regions, and interactive network) and its implications in transthyretin-related amyloidosis. *Amyloid* 21, 154–162.
- Poulsen, K., Bahl, J.M.C., Tanassi, J.T., Simonsen, A.H., and Heegaard, N.H.H. (2012). Characterization and stability of transthyretin isoforms in cerebrospinal fluid examined by

immunoprecipitation and high-resolution mass spectrometry of intact protein. *Methods* 56, 284–292.

- R Core Team. R (2015). A Language and Environment for Statistical Computing.
- Raghu, P., and Sivakumar, B. (2004). Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1703, 1–9.
- Rapezzi, C., Quarta, C.C., Obici, L., Perfetto, F., Longhi, S., Salvi, F., Biagini, E., Lorenzini, M., Grigioni, F., Leone, O., et al. (2013). Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. *European Heart Journal* 34, 520–528.
- Rapezzi, C., Riva, L., Quarta, C.C., Perugini, E., Salvi, F., Longhi, S., Ciliberti, P., Pastorelli, F., Biagini, E., Leone, O., et al. (2008). Gender-related risk of myocardial involvement in systemic amyloidosis. *Amyloid* 15, 40–48.
- Reddi, H.V., Jenkins, S., Theis, J., Thomas, B.C., Connors, L.H., Van Rhee, F., and Highsmith, W.E. (2014). Homozygosity for the V122I Mutation in Transthyretin Is Associated with Earlier Onset of Cardiac Amyloidosis in the African American Population in the Seventh Decade of Life. *The Journal of Molecular Diagnostics* 16, 68–74.
- Richards, D.B., Cookson, L.M., Berges, A.C., Barton, S.V., Lane, T., Ritter, J.M., Fontana, M., Moon, J.C., Pinzani, M., Gillmore, J.D., et al. (2015). Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *New England Journal of Medicine* 373, 1106–1114.
- Robinson, L.Z., and Reixach, N. (2014). Quantification of Quaternary Structure Stability in Aggregation-Prone Proteins under Physiological Conditions: The Transthyretin Case. *Biochemistry* 53, 6496–6510.
- Rokitsansky C (1842). Entzündung der Leber; Entzündung der Pfortader. 324–332.
- Ruberg, F.L., Grogan, M., Hanna, M., Kelly, J.W., and Maurer, M.S. (2019). Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 73, 2872–2891.
- Ruberg, F.L., Maurer, M.S., Judge, D.P., Zeldenzust, S., Skinner, M., Kim, A.Y., Falk, R.H., Cheung, K.N., Patel, A.R., Pano, A., et al. (2012). Prospective evaluation of the morbidity and mortality of wild-type and V122I mutant transthyretin amyloid cardiomyopathy: The Transthyretin Amyloidosis Cardiac Study (TRACS). *American Heart Journal* 164, 222-228.e1.
- Ruzhansky, K., Scoon, J., Weimer, L.H., Maurer, M.S., Berk, J.L., and Brannagan, T.H. (2014). Discordant phenotype in monozygotic female twins with Lys35Thr TTR familial amyloidotic polyneuropathy. *J Clin Neuromuscul Dis* 16, 1–6.
- Sakaki Y, Yoshioka N, Tanahashi Y, Furuya H, and SaKaki H (1989). Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Biol Med* 6, 161–168.
- Sakoda, S., Suzuki, T., Higa, S., Ueji, M., Kishimoto, S., Hayashi, A., Yasuda, N., Takaba, Y., and Nakajima, A. (1983). Genetic studies of familial amyloid polyneuropathy in the Arao district of Japan: I. The genealogical survey. *Clin. Genet.* 24, 334–338.

- Sandgren, O. (1990). Vitreous Amyloidosis Associated With Homozygosity for the Transthyretin Methionine-30 Gene. *Arch Ophthalmol* 108, 1584.
- Sanson, M., Vu Hong, A., Massourides, E., Bourg, N., Suel, L., Amor, F., Corre, G., Bénit, P., Barthélémy, I., Blot, S., et al. (2020). miR-379 links glucocorticoid treatment with mitochondrial response in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* 10, 9139.
- Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Mendonça, D., Alonso, I., Lemos, C., and Sousa, A. (2016). Variants in RBP4 and AR genes modulate age at onset in familial amyloid polyneuropathy (FAP ATTRV30M). *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 756–760.
- Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Mendonça, D., Alonso, I., Lemos, C., and Sousa, A. (2017). Familial amyloid polyneuropathy in Portugal: New genes modulating age-at-onset. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 98–105.
- Santos, D., Coelho, T., Alves-Ferreira, M., Sequeiros, J., Mendonça, D., Alonso, I., Sousa, A., and Lemos, C. (2019). Large normal alleles of ATXN2 decrease age at onset in transthyretin familial amyloid polyneuropathy Val30Met patients: Large Normal ATXN2 Alleles. *Ann. Neurol.* 85, 251–258.
- Santos, D., Santos, M.J., Alves-Ferreira, M., Coelho, T., Sequeiros, J., Alonso, I., Oliveira, P., Sousa, A., Lemos, C., and Grazina, M. (2018). mtDNA copy number associated with age of onset in familial amyloid polyneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 89, 300–304.
- Santos, S.D., Fernandes, R., and Saraiva, M.J. (2010). The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems. *Neurobiology of Aging* 31, 280–289.
- Saporta, M.A. da C., Plante-Bordeneuve, V., Misrahi, M., and Cruz, M.W. (2009a). Discordant expression of familial amyloid polyneuropathy in monozygotic Brazilian twins. *Amyloid* 16, 38–41.
- Saporta, M.A.C., Zaros, C., Cruz, M.W., André, C., Misrahi, M., Bonaïti-Pellié, C., and Planté-Bordeneuve, V. (2009b). Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy (type I) in Brazilian families. *European Journal of Neurology* 16, 337–341.
- Saraiva, M.J., Birken, S., Costa, P.P., and Goodman, D.S. (1984). Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *The Journal of Clinical Investigation* 74, 104–119.
- Saraiva, M.J.M. (2001). Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Letters* 498, 201–203.
- Saraiva, M.J.M., Moreira, P., Gawinowicz, M., Costa, P.P., Rauh, S., Banhzoff, A., and Altland, K. (1991). Molecular Analyses of an Acidic Transthyretin Asn 90 Variant. *Am. J. Hum. Genet.* 1004–1008.
- Saraiva, M.J.M., Torres, M. de F., Serra, J., and Ochoa, J. (1999). A new transthyretin variant-ATTR Arg I04 Cys. *Amyloid* 6, 149–151.
- Schmidt, H.H. -J., Barroso, F., González-Duarte, A., Conceição, I., Obici, L., Keohane, D., and Amass, L. (2016). Management of asymptomatic gene carriers of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve* 54, 353–360.

- Schmidt, H.H., Waddington-Cruz, M., Botteman, M.F., Carter, J.A., Chopra, A.S., Hopps, M., Stewart, M., Fallet, S., and Amass, L. (2018). Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy: ATTR-FAP Global Prevalence. *Muscle Nerve* 57, 829–837.
- Schmidt, M., Wiese, S., Adak, V., Engler, J., Agarwal, S., Fritz, G., Westermark, P., Zacharias, M., and Fändrich, M. (2019). Cryo-EM structure of a transthyretin-derived amyloid fibril from a patient with hereditary ATTR amyloidosis. *Nature Communications* 10.
- Sebastião, M.P., Lamzin, V., Saraiva, M.J., and Damas, A.M. (2001). Transthyretin stability as a key factor in amyloidogenesis: X-ray analysis at atomic resolution. *Journal of Molecular Biology* 306, 733–744.
- Seibert, F.B., and Nelson, J.W. (1942). Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry* 143, 29–38.
- Sekijima, Y., Dendle, M.A., and Kelly, J.W. (2006). Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis. *Amyloid* 13, 236–249.
- Sekijima, Y., Wiseman, R.L., Matteson, J., Hammarström, P., Miller, S.R., Sawkar, A.R., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2005). The Biological and Chemical Basis for Tissue-Selective Amyloid Disease. *Cell* 121, 73–85.
- Sequeiro, J., Sousa, A., and Coelho, T. (1990). Sex Differences and Age-Dependent Penetrance in FAP-Type I. In *Amyloid and Amyloidosis 1990*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 687–690.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.-I., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., and Westermark, P. (2010). Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 17, 101–104.
- Skare J, Jones LA, Myles N, Kane K, Milunsky A, Cohen A, and Skinner M (1994). Two transthyretin mutations (glu42gly, lus90asn) in an Italian family with amyloidosis. *Clin Genet* 45, 281–284.
- Skare, J., Yazici, H., Erken, E., Dede, H., and Cohen, A. (1990). Homozygosity for the met30 transthyretin gene in a Turkish kindred with familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Genet.* 89-90.
- Soares, M.L., Coelho, T., Sousa, A., Batalov, S., Conceição, I., Sales-Luís, M.L., Ritchie, M.D., Williams, S.M., Nievergelt, C.M., Schork, N.J., et al. (2005). Susceptibility and modifier genes in Portuguese transthyretin V30M amyloid polyneuropathy: complexity in a single-gene disease. *Hum. Mol. Genet.* 14, 543–553.
- Sousa A, C.T., Lobato L, Sequeiros J., Anticipation of age of onset in familial amyloidotic polyneuropathy (Portuguese type). (1990). In: Natvig JB, Forre O, Husby G, Husebekk A, Skogen B, Sletten K, Westermark P (eds) *Amyloid and amyloidosis*. Kluwer, Dordrecht: p. 694–697.
- Sousa, A., Andersson, R., Drugge, U., Holmgren, G., and Sandgren, O. (1993). Familial Amyloidotic Polyneuropathy in Sweden: Geographical Distribution, Age of Onset, and Prevalence. *Hum Hered* 43, 288–294.

- Sousa, A., Coelho, T., Barros, J., and Sequeiros, J. (1995). Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Pova do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *American Journal of Medical Genetics* 60, 512–521.
- Sousa, M.M., Amaral, J.B., Guimarães, A., and Saraiva, M.J. (2005). Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *The FASEB Journal* 19, 124–126.
- Sousa, M.M., Fernandes, R., Palha, J.A., Taboada, A., Vieira, P., and Saraiva, M.J. (2002). Evidence for Early Cytotoxic Aggregates in Transgenic Mice for Human Transthyretin Leu55Pro. *The American Journal of Pathology* 161, 1935–1948.
- Suhr, O.B., Wixner, J., Anan, I., Lundgren, H.-E., Wijayatunga, P., Westermark, P., and Ihse, E. (2019). Amyloid fibril composition within hereditary Val30Met (p. Val50Met) transthyretin amyloidosis families. *PLOS ONE* 14, e0211983.
- Suhr, O.B., Wixner, J., Pilebro, B., Lundgren, H.-E., and Anan, I. (2017). The Swedish landscape of hereditary ATTR amyloidosis. *Amyloid* 24, 93–94.
- Tashima, K., Ando, Y., Tanaka, Y., Uchino, M., and Ando, M. (1995). Change in the Age of Onset in Patients with Familial Amyloidotic Polyneuropathy Type I. *Intern. Med.* 34, 748–750.
- Terazaki, H., Ando, Y., Misumi, S., Nakamura, M., Ando, E., Matsunaga, N., Shoji, S., Okuyama, M., Ideta, H., Nakagawa, K., et al. (1999). A Novel Compound Heterozygote (FAP ATTR Arg104His/ATTR Val30Met) with High Serum Transthyretin (TTR) and Retinol Binding Protein (RBP) Levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 365–370.
- Théberge, R., Connors, L., Share, J., Skinner, M., Falk, R.H., and Costello, C.E. (1999). A new amyloidogenic transthyretin variant (Vail 22Ala) found in a compound heterozygous patient. *Amyloid* 6, 54–58.
- Thomas, V.E., Smith, J., Benson, M.D., and Dasgupta, N.R. (2019). Amyloidosis: diagnosis and new therapies for a misunderstood and misdiagnosed disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* 9, nmt-2019-0020.
- Tojo, K., Sekijima, Y., Machida, K., Tsuchiya, A., Yazaki, M., and Ikeda, S.-I. (2008). Amyloidogenic transthyretin Val30Met homozygote showing unusually early-onset familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve* 37, 796–803.
- Totir, L.R., Fernando, R.L., and Abraham, J. (2009). An efficient algorithm to compute marginal posterior genotype probabilities for every member of a pedigree with loops. *Genet Sel Evol* 41, 52.
- Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., Araki, S., and Shimada, K. (1985). Structure of the human prealbumin gene. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12224–12227.
- Tsuzuki, T., Mita, S., Maeda, S., Araki, S., and Shimada, K. (1985). Structure of the human prealbumin gene. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12224–12227.
- Ueda, M., Sekijima, Y., Koike, H., Yamashita, T., Yoshinaga, T., Ishii, T., and Ando, Y. (2020). Monitoring of asymptomatic family members at risk of hereditary transthyretin amyloidosis for

early intervention with disease-modifying therapies. *Journal of the Neurological Sciences* 414, 116813.

- Uemichi T, Uitti RJ, Koeppen AH, Donat JR, and Benson MD (1999). Oculoleptomeningeal Amyloidosis Associated With a New Transthyretin Variant Ser64. *Arch Neurol* 56, 1152–1155.
- Uemichi, T., Liepnieks, J.J., Altland, K., and Benson, M.D. (1994). Identification of a novel non-amyloidogenic transthyretin polymorphism (His 74) in the German population. *Amyloid* 1, 149–153.
- Ueno S, Uemichi T, Yorifuji S, and Tarui S (1990). A novel variant of transthyretin (Tyr114 to Cys) deduced from the nucleotide sequences of gene fragments from familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese sibling cases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 169, 143–147.
- van Bennekum, A.M., Wei, S., Gamble, M.V., Vogel, S., Piantedosi, R., Gottesman, M., Episkopou, V., and Blaner, W.S. (2001). Biochemical Basis for Depressed Serum Retinol Levels in Transthyretin-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* 276, 1107–1113.
- Vidal, R. (1996). Meningocerebrovascular Amyloidosis Associated with a Novel Transthyretin Mis-Sense Mutation at Codon 18 (TTRD18G). 148, 6.
- Virchow, R. (1854). Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Archiv f. pathol. Anat.* 6, 135–138.
- Vita, G.L., Aguenouz, M., Polito, F., Oteri, R., Russo, M., Gentile, L., Barbagallo, C., Ragusa, M., Rodolico, C., Di Giorgio, R.M., et al. (2020). Circulating microRNAs Profile in Patients With Transthyretin Variant Amyloidosis. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 102.
- Waddington-Cruz, M., Schmidt, H., Botteman, M.F., Carter, J.A., Stewart, M., Hopps, M., Fallet, S., and Amass, L. (2019). Epidemiological and clinical characteristics of symptomatic hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: a global case series. *Orphanet J. Rare Dis.* 14, 34.
- Wang, Z., and Burke, P.A. (2010). Hepatocyte nuclear factor-4 α interacts with other hepatocyte nuclear factors in regulating transthyretin gene expression: Role of HNFs in transthyretin gene expression. *FEBS Journal* 277, 4066–4075.
- Wechalekar, A.D., Gillmore, J.D., and Hawkins, P.N. (2016). Systemic amyloidosis. *The Lancet* 387, 2641–2654.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman M, and Blaner W S (1995). Studies on the Metabolism of Retinol and Retinol-binding Protein in Transthyretin-deficient Mice Produced by Homologous Recombination. *Cell Biology and Metabolism* 270, 866-870 [Journal home page for Journal of Biological Chemistry](#).
- Wojtczak, A., Cody, V., Luft, J.R., and Pangborn, W. (1996). Structures of Human Transthyretin Complexed with Thyroxine at 2.0 Å Resolution and 3',5'-Dinitro- N -acetyl- L -thyronine at 2.2 Å Resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 758–765.
- Wright, S. (1921). Correlation and causation. *Journal of agricultural research*, 20(7) :557–585.
- Wright, S. (1934). The method of path coefficients. *The annals of mathematical statistics*, 5(3) :161–215.

- Yakupova, E.I., Bobyleva, L.G., Vikhlyantsev, I.M., and Bobylev, A.G. (2019). Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci. Rep.* 39.
- Yamamoto K, Ikeda S, Hanyu N, Takeda S and Yanagisawa N. (1998). A pedigree analysis with minimised ascertainment bias shows anticipation in Met30-transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. *J Med Genet*, 35(1): p. 23-30.
- Yamamoto, K., Hsu, S.-P., Yoshida, K., Ikeda, S., Nakazato, M., Shiomi, K., Cheng, S.-Y., Furihata, K., Ueno, I., and Yanagisawa, N. (1994). Familial amyloid polyneuropathy in Taiwan: identification of transthyretin variant (Leu55→ Pro). *Muscle & Nerve* 17, 637–641.
- Yan, C., Costa, R.H., Darnell Jr, J.E., Chen, J.D., and Van Dyke, T.A. (1990). Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *The EMBO Journal* 9, 869.
- Yang, N.C.-C., Lee, M.-J., Chao, C.-C., Chuang, Y.-T., Lin, W.-M., Chang, M.-F., Hsieh, P.-C., Kan, H.-W., Lin, Y.-H., Yang, C.-C., et al. (2010). Clinical presentations and skin denervation in amyloid neuropathy due to transthyretin Ala97Ser. *Neurology* 75, 532–538.
- Yordanova, I., Pavlova, Z., Kirov, A., Todorov, T., Alexiev, A., Sarafov, S., Mateva, L., Chamova, T., Gospodinova, M., Mitev, V., et al. (2019). Monoallelic expression of the TTR gene as a contributor to the age at onset and penetrance of TTR-related amyloidosis. *Gene* 705, 16–21.
- Yuan, Z., Guo, L., Liu, X., Xiao, X., Jiao, B., Wang, J., Yan, X., Tang, B., and Shen, L. (2019). Familial amyloid polyneuropathy with chronic paroxysmal dry cough in Mainland China: A Chinese family with a proven heterozygous missense mutation c.349G>T in the transthyretin gene. *Journal of Clinical Neuroscience* 60, 164–166.
- Zaros, C., Genin, E., Hellman, U., Saporta, M.A., Languille, L., Wadington-Cruz, M., Suhr, O., Misrahi, M., and Planté-Bordeneuve, V. (2008). On the Origin of the Transthyretin Val30Met Familial Amyloid Polyneuropathy. *Ann. Hum. Genet.* 72, 478–484.

ANNEXES

Annexe 1

Projet d'étude collaboratif sur la pénétrance des ATTRv.

COLLABORATIVE PENETRANCE STUDY PROJECT ON HEREDITARY TRANSTHYRETIN AMYLOID NEUROPATHY

V. Planté-Bordeneuve^{1,2}, F. Gorram^{1,2}, F. Alarcon³, G Nuel⁴

1. Department of Neurology- Amyloid network- University hospital Henri Mondor, Créteil- France
2. Amyloidosis Clinical Research group – University Paris Est-Créteil – France
3. Laboratory MAP5 - UMR CNRS 8145-Paris Descartes University – France
4. Institute of Mathematics, National Center for French Research, Laboratory of Probability, University Pierre et Marie Curie, Sorbonne University, France.

► Aim

Refine penetrance estimates in populations of transthyretin (TTR) familial amyloid polyneuropathy (FAP) to guide genetic counseling and to better understand the mechanisms underlying the clinical spectrum of the disease

► Background

Familial amyloid polyneuropathy (FAP) is the most severe autosomal dominant inherited neuropathy of adulthood associated with mutations in the transthyretin (TTR) gene.

Significant phenotypic variability and range of age of onset are observed in families from different geographic origin [7]

In this setting, penetrance is an essential parameter to gain more insight into the underlying mechanism of such variability. Also, it allows guide genetic counselling as well as a more accurate management of at risk individuals.

The penetrance is the risk for a mutation carrier of being affected. It increases with age and is therefore calculated as a cumulative risk of being affected at a given age (penetrance function).

In the historical study, Andrade (1952) concluded that the FAP was autosomal dominant with high penetrance [3]. Subsequent genealogical studies suggested that penetrance was incomplete and variable among families.

In previous studies, we obtained unbiased penetrance estimates based on maximum likelihood using parametric survival analysis approach [6,9,10], based on family data obtained through affected individuals.

Main results:

In these works, we obtained penetrance estimates in different samples of TTR-FAP (i.e. Portugal, France, Sweden and Brazil) using the parametric PEL approach (see below) which corrects the ascertainment bias. By the age of 80 years, penetrance was found high although incomplete in all 4 populations i.e. from 52% up to 90% in the Swedish and Portuguese or Brazilians families, respectively [6,9,10].

However penetrance values at intermediate ages display significant differences. For instance, the risk of disease at 50 years is only 18% in French carriers versus 80% in Portuguese and Brazilian carriers respectively [9,10]. In a large population sample from Sweden, we found lower penetrance although higher than previously estimated: i.e. cumulative risk was 11% by age 50 and 69% by age 90 years [6] [These results are in line with the differences of age of onset observed in TTR-FAP patients from these areas.

In addition, other variables were unraveled in the tested populations according their geographic origin. For instance in the French families, the risks were found to be lower in Val30Met carriers than in carriers of other mutations [6]. In Sweden, significant regional differences of penetrance were observed. Also, penetrance was significantly different according the sex of the transmitting parent

with a higher risk when the disease was inherited from the mother [6]. This trend was subsequently found in other samples, e.g. Portuguese and French families [4]. In contrast, we could not demonstrate clear cut differences of risk according to gender in the populations.

In recent study, we showed significant differences of penetrance profiles of 4 pathogenic mutations of TTR (ATTR-Val30Met, ATTR-Ser77Tyr, ATTR-Ile107Val, ATTR-Ser77Phe) the most encountered in our population of hATTR [5].

► Purpose

To obtain penetrance estimates in a wider population of TTR-FAP across Europe and other continents (South America, USA, Australia...). To compare parametric penetrance estimates to non-parametric estimates obtained with a newly developed approach.

► Methods

In previous work, we estimated penetrance in families ATTR (French, Portuguese, Swedish and Brazilian) using a parametric approach (Proband's phenotype Exclusion Likelihood) [1].

PEL is a method based on maximum likelihood using a survival analysis using a mixture between a Weibull distribution and a "non-susceptible" component to allow for incomplete penetrance. In this setting, penetrance estimates are accurate if the true value of the penetrance is close to the Weibull model. If this condition is not fulfilled, the estimates might be inaccurate.

Therefore, we sought to revisit the PEL for penetrance estimation and recently developed a new non-parametric approach derived from the PEL named non parametric survival estimate (NPSE), recently published [2]. Such approach requires no prior assumptions on the shape of the penetrance function and produces a Kaplan-Meier estimator. Thus, it allows fit any penetrance shape without bias. Also, it allows take into account covariates such as sex, parent of origin through a Cox model to examine their effect on the risk of disease.

To illustrate the potentialities of this new approach, we performed preliminary analysis on our previous data sets of 158 ATTR families including 33 Portuguese, 77 Swedish and 48 French kindreds. Comparison between data obtained with the previous PEL method and the new non-parametric approach displays good fits of penetrance functions in all 3 samples. In addition, it confirmed the ability of the method to adjust on covariates like sex, parent of origin, TTR variant [2, 5]

Finally, to provide valid estimates of penetrance, it is desirable to collect extensive and reliable information on the family structure and on as many family members as possible, in each pedigree. To this end, a new software, Pedigree-XP, has been developed with a private partner (PC-Pal). Pedigree-XP is adapted specifically to our project. It is a simple convenient tool to enter appropriate information on family members.

In order to keep confidentiality, all data will be anonymized with a code attributed for every site. Then, each individual will be identified by a number in the shared data. All private data will be masked accordingly.

In the setting of penetrance study, the following items are desirable for all individuals: date of birth and date of the last news (or death). Enter the TTR genotype if known. Regarding the phenotype, if an individual is an asymptomatic carrier, enter the date of the last news (date of the last visit or date of the last reliable news by hearing through family members). In affected individual, enter the date of onset (i.e. first symptom certainly related to the disease). The information to be collected for each family is listed in the User's guide.

For the purpose of penetrance analysis, the appropriate data will be easily exported as an Excel file as explained in the Ped-XP install file enclosed.

► Expected results and perspective

The aim of the present study is to refine penetrance estimates of TTR- FAP in the different populations using a non-parametric approach, with the ability to adjust on covariates.

This work will provide useful information for genetic counseling in TTR- FAP. Indeed, knowledge of the risk of being affected at various ages will help substantially to improve the follow up of

asymptomatic carriers and the management of patients at the very onset of symptoms. At present, the usefulness of presymptomatic diagnosis is particularly relevant with the upcoming new therapeutic agents.

In addition, we hope that this study will contribute to a better understanding of the mechanisms underlying the disease expression.

REFERENCES

1. Alarcon F, Bourgain C, Gauthier-Villard M, Planté-Bordeneuve V, Stoppa-Lyonnet D, Bonaïti-Pellié C. PEL: An unbiased method for estimating age-dependence genetic disease risk from pedigree data unselected for family history. *Genetic Epidemiology* 2009 Jul; 33(5): 379-385.
2. , Planté-Bordeneuve V, Olsson M, Nuel G. Non-parametric estimation of survival in age-dependent genetic disease and application to the transthyretin-related hereditary amyloidosis. *PLoS One*. 2018 Sep 25;13(9).
3. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy: Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 1952;75: 408-427.
4. Bonaïti B, Alarcon F, Bonaïti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V: Parent of origin effect in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 2009; 16, 149-150.
5. Gorram F, Alarcon F , Perdry H, Hébrard B , Damy T, Fanen P, Funalot B, Nuel G, Planté-Bordeneuve. Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). *Amyloid*, 2017; 24(S1): 115–116.
6. Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaïti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 2008 Sep; 15(3):181-186.
7. Plante-Bordeneuve V, Said G Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol*. 2011 Dec;10(12):1086-97.
8. Planté-Bordeneuve V, Carayol J, Ferreira A, et al. Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families. *Journal of Medical Genetics* 2003; 40:120.
9. Saporta MA, Zaros C, Cruz MW, Andre C, Misrahi M, Bonaïti-Pellie C, Plante-Bordeneuve V. Penetrance estimation of TTR familial amyloid polyneuropathy (type I) in Brazilian families. *Eur J Neurol* 2009; 16:337-341.

Oral presentations (2018)

1. Olsson M, Gorram F, Alarcon F, Nuel G, Suhr OB, Planté-Bordeneuve V. Refine penetrance estimates in Swedish ATTR-Val30Met kindreds. International Symposium of Amyloidosis. Kumamoto, Japan, 2018 Mar.
2. Gorram F, Gentile L, Parman Y, Alarcon F, Nuel G, Funalot B, Cakar A, Vita G, Mazzeo A, Planté-Bordeneuve V. Penetrance variation in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP) with 7 ATTR variants observed in Europe. International Symposium of Amyloidosis. Kumamoto, Japan, 2018 Mar.
3. Gorram F, Olsson M, Alarcon F, Hebrard B, Funalot B, Nuel G, Suhr OB, Planté-Bordeneuve V. Variation of Penetrance estimates in a wide spectrum of TTR-FAP families: implication for management of carriers. American Academy of Neurology. Los Angeles, USA, 2018 Apr

Annexe 2

L'algorithme Expectation-Maximisation.

Exemple d'application de l'algorithme EM :

On suppose un mélange de deux lois exponentielles de paramètres λ_1 et λ_2 .

Notons,

Δ : une variable latente qui suit une loi de Bernoulli de paramètre p .

T : le temps observé avant l'évènement d'intérêt défini par :

$$T = T_1 \mathbb{1}_{\{\Delta=0\}} + T_2 \mathbb{1}_{\{\Delta=1\}}$$

où $T_1 \sim \text{Exp}(\lambda_1)$ et $T_2 \sim \text{Exp}(\lambda_2)$ et $\Delta \sim \mathfrak{B}(p)$

La figure 1 représente l'histogramme des données simulées à partir du mélange de lois considérées (10000 observations ont été générées).

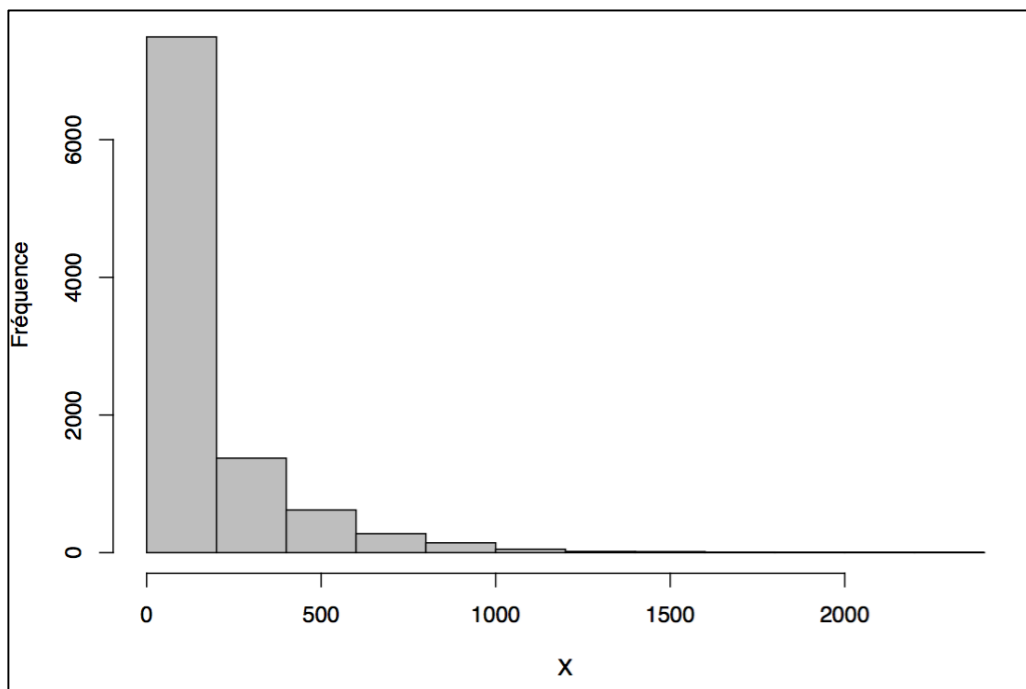


Figure 1: Histogramme des données simulées à partir du mélange de lois exponentielles considérées.

On note $f_\theta(t)$ la densité de T , où le paramètre θ , que l'on cherche à estimer, est le vecteur $\theta = (p, \lambda_1, \lambda_2)$.

Nous avons recours à l'algorithme EM pour estimer le paramètre θ . On appelle

$q_\theta(t_i, \delta_i)$ la vraisemblance des données complètes (T, Δ) qui s'écrit :

$\forall t_i \in \mathbb{R}^+$ et $\delta_i \in \{0,1\}$

$$\begin{aligned} q_\theta(t_i, \delta_i) &= p_\Delta(\delta_i) f_{T|\Delta}(t_i, \delta_i) \\ &= p^{\mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}} (1-p)^{\mathbb{1}_{\{\delta_i=1\}}} \left(\lambda_1 e^{-\lambda_1 t_i} \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}} + \lambda_2 e^{-\lambda_2 t_i} (1 - \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}) \right) \end{aligned}$$

Il s'en suit la vraisemblance pour notre n échantillon s'écrit :

$$\begin{aligned} q_\theta(T, \Delta) &= \prod_{i=1}^n p_\Delta(\delta_i) f_{T|\Delta}(t_i, \delta_i) \\ &= p^{\sum_{i=1}^n \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}} (1-p)^{\sum_{i=1}^n \mathbb{1}_{\{\delta_i=1\}}} \times \prod_{i=1}^n \left[\lambda_1 e^{-\lambda_1 t_i} \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}} + \lambda_2 e^{-\lambda_2 t_i} (1 - \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}) \right] \end{aligned}$$

On en déduit donc la fonction Q de l'algorithme EM

$$\begin{aligned} Q(\theta|\theta_{old}) &= \mathbb{E}_{\theta_{old}}[\log q_\theta(T, \Delta)|T = t_i] \\ &= \mathbb{E}_{\theta_{old}} \left[\sum_{i=1}^n \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}} \log p + (n - \sum_{i=1}^n \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}) \log(1-p) + \sum_{i=1}^n \log (\lambda_1 e^{-\lambda_1 t_i} \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}} + \lambda_2 e^{-\lambda_2 t_i} (1 - \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}})) |T = t_i \right] \\ &= \log p \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta_{old}} [\mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}|T = t_i] + \log(1-p)(n - \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta_{old}} (\mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}|T = t_i)) \\ &\quad + \sum_{i=1}^n \mathbb{E}_{\theta_{old}} [(\log(\lambda_1) - \lambda_1 t_i) \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}|T = t_i] + \mathbb{E}_{\theta_{old}} [(\log(\lambda_2) - \lambda_2 t_i) \mathbb{1}_{\{\delta_i=1\}}|T = t_i] \end{aligned}$$

Or,

$$\begin{aligned} &\mathbb{E}_{\theta_{old}} [(\log(\lambda_1) - \lambda_1 t_i) \mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}|T = t_i] \\ &= (\log(\lambda_1) - \lambda_1 t_i) \mathbb{E}_{\theta_{old}} (\mathbb{1}_{\{\delta_i=0\}}|T = t_i) \\ &= (\log(\lambda_1) - \lambda_1 t_i) \frac{\mathbb{P}(\delta_i = 0|T = t_i)}{\Pi_{\theta_{old}}(t_i)} \end{aligned}$$

Donc on obtient :

$$\begin{aligned}
 Q(\theta|\theta_{old}) &= \log p \sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i) + \log(1-p)(n - \sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i)) + \sum_{i=1}^n [(\log(\lambda_1) - \lambda_1 t_i) \Pi_{\theta_{old}}(t_i) + (\log(\lambda_2) - \lambda_2 t_i) (1 - \Pi_{\theta_{old}}(t_i))] \\
 &= \log p \sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i) + \log(1-p) \left(n - \sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i) \right) \\
 &\quad + \sum_{i=1}^n [(\log(\lambda_1) \Pi_{\theta_{old}}(t_i) + \log(\lambda_2) (1 - \Pi_{\theta_{old}}(t_i)) - \lambda_1 t_i \Pi_{\theta_{old}}(t_i) - (1 - \Pi_{\theta_{old}}(t_i)) \lambda_2 t_i]
 \end{aligned}$$

Ainsi, pour connaître entièrement la fonction de $Q(\theta|\theta_{old})$ il suffit de déterminer les probabilités conditionnelles de $\Pi_{\theta_{old}}(t_i)$ pour $i = 1, \dots, n$.

$$\begin{aligned}
 \text{Or } \Pi_{\theta_{old}}(t_i) &= \mathbb{P}(\delta_i = 0 | T = t_i) \\
 &= \frac{\mathbb{P}(T = t_i | \delta_i = 0) \mathbb{P}(\delta_i = 0)}{f_T(t_i)} \\
 &= \frac{\mathbb{P}(T_1 = t_i) \mathbb{P}(\delta_i = 0)}{f_T(t_i)} \\
 &= \frac{p \exp(\lambda_1)}{p \exp(\lambda_1) + (1-p) \exp(\lambda_2)}
 \end{aligned}$$

On obtient les dérivées partielles suivantes :

$$\frac{\partial}{\partial p} Q(\theta|\theta') = \frac{\sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i)}{p} - \frac{n}{1-p} + \frac{\sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i)}{1-p}$$

$$\frac{\partial}{\partial \lambda_1} Q(\theta|\theta_{old}) = \frac{\sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i)}{\lambda_1} - \sum_{i=1}^n t_i \Pi_{\theta_{old}}(t_i)$$

On obtient donc les estimateurs \hat{p} et $\widehat{\lambda}_1$ suivants :

$$\hat{p} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i) \quad \widehat{\lambda}_1 = \frac{\sum_{i=1}^n \Pi_{\theta_{old}}(t_i)}{\sum_{i=1}^n t_i \Pi_{\theta_{old}}(t_i)}$$

La procédure est la même pour obtenir l'estimateur de λ_2 .

Nous allons appliquer cela à un échantillon de 3500 individus avec un taux de censure de 40%. Nous simulons un mélange de deux lois exponentielles connues et nous essayons d'estimer les paramètres à l'aide de l'algorithme EM. Les valeurs considérées sont :

$$p_1^* = 0.6 ; p_2^* = 0.4 ; \frac{1}{\lambda_1^*} = 250 ; \frac{1}{\lambda_2^*} = 25$$

Les distributions des deux lois sont données dans le graphe suivant :

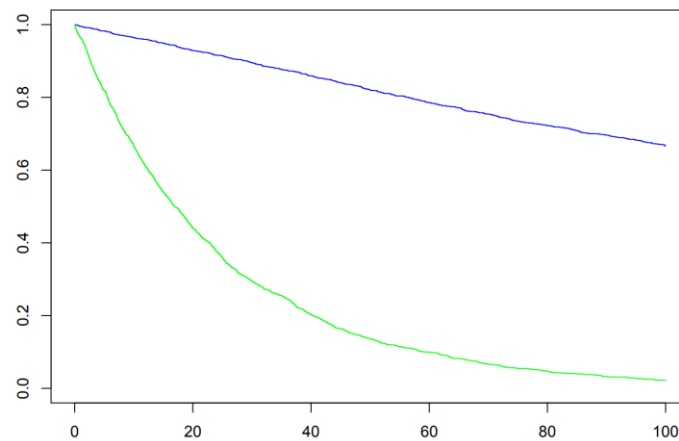


Figure 2 – Distribution des deux lois exponentielles considérées

Après, application de l'algorithme EM sur notre échantillon avec les valeurs considérées suivantes ($p_1^* = 0.6 ; p_2^* = 0.4 ; \frac{1}{\lambda_1^*} = 250 ; \frac{1}{\lambda_2^*} = 25$), on obtient les estimations ci-dessous après 500 itérations :

$$\widehat{p}_1 = 0.6 ; \widehat{p}_2 = 0.4 ; \frac{1}{\widehat{\lambda}_1} = 232.5 ; \frac{1}{\widehat{\lambda}_2} = 24.4$$

Les courbes de convergence sont présentées dans la figure 3.

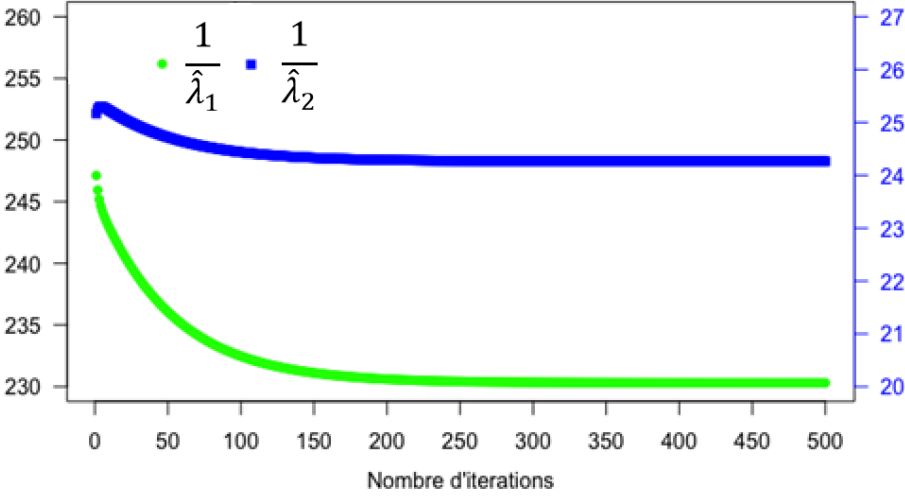
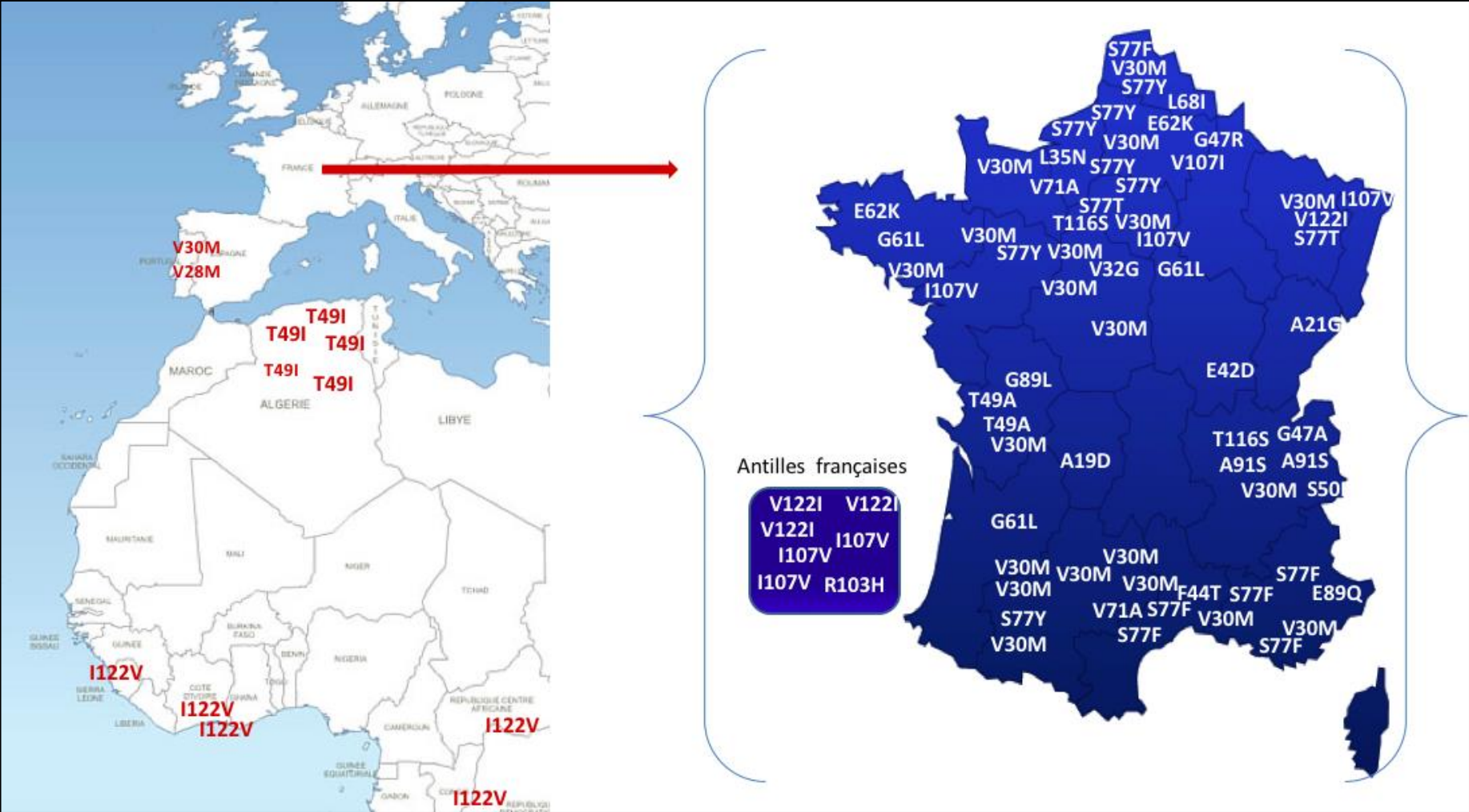


Figure 3 – Courbes de convergence des estimateurs $\frac{1}{\hat{\lambda}_1}$ et $\frac{1}{\hat{\lambda}_2}$.

Annexe 3

Répartition géographique des familles ATTRv de notre centre (CHU Henri-Mondor).



Annexe 4

Programme et condition de PCR utilisés pour l'amplification du gène de la TTR.

Nous avons réalisé une PCR en utilisant les 2 jeux d'amorces suivants :

- TTR-F1 (+1) ATGGCTTCTCATCGTCTGCT et
- TTR- R1 (+419) GCCGTGGTGGGAATAGGAGTA
- TTR-F2 (+27) CTGCCTTGCTGGACTGGTAT et
- TTR- R2 (+356) TCGTTGGCTGTGAATACCAC

Protocole pour 1 échantillon :

Préparation du MIX PCR

- 1) 13,5 µL d'eau stérile
- 2) 2 µL de Tampon 10X et de dNTP
- 3) 0,4 µL d'amorce
- 4) 0,6 µL de MgCl₂(50mM) et 0,1 µL de la DNA Taq

Préparation de la solution PCR

- 1) Ajouter au MIX PCR 1 µL d'ADN
- 2) Pour le témoin négatif ajouter au MIX PCR 1 µL d'eau

Programme PCR

	Température (°C)	Heure	Nombre de cycles	
	94°C	5 min		Activation enzymatique
35 cycles	94°C	20 sec	35 Cycles	Dénaturation
	58°C	20 sec		Renaturation/Extension
	72°C	30 sec		Désactivation enzymatique
	72°C	10 min		Extension finale pour homogénéiser les longueurs de fragments
	10°C	∞		Maintien

Valorisations scientifiques

Publications

Publications principales issues de la thèse

- **Gorram F**, Alarcon F, Perdry H, Hébrard B, Damy T, Fanen P, Funalot B, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). *Amyloid*. 2017 Mar;24(sup1):115-116.
- **Gorram F** and Olsson M, Alarcon F, Nuel G, Anan I, Planté-Bordeneuve V. New data on the genetic profile and penetrance of hereditary Val30Met transthyretin amyloidosis in Sweden. *Amyloid*. 2020 Nov 4:1-7.
- Planté-Bordeneuve V, **Gorram F**, Olsson M, Anan I, Mazzeo A, Gentile L, Cisneros-Barroso E, Gonzalez-Moreno J, Losada I, Waddington Cruz M, Pinto LF, Parman Y, Fanen P, Alarcon F, Nuel G. Insights on the carrier risks in a wide spectrum of Hereditary Transthyretin Amyloidosis (ATTRv) families across Europe: what impact at the era of innovative therapeutics? (en preparation)

Autres publications sur la thématique de thèse

- Lefaucheur JP, Zouari HG, **Gorram F**, Nordine T, Damy T, Planté-Bordeneuve V. The value of electrochemical skin conductance measurement using Sudoscan® in the assessment of patients with familial amyloid polyneuropathy. *Clin Neurophysiol*. 2018 Aug;129(8):1565-1569.
- Planté-Bordeneuve V, **Gorram F**, Salhi H, Nordine T, Ayache SS, Le Corvoisier P, Azoulay D, Feray C, Damy T, Lefaucheur JP. Long-term treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy with tafamidis: a clinical and neurophysiological study. *J Neurol*. 2017 Feb;264(2):268-276.

Communications orales

Gorram F, Alarcon F, Hébrard B, Funalot B, Damy T, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. Estimate penetrance in hereditary disorders using a non-parametric approach : new insights in val30met transthyretin (TTR). 6th International Charcot Marie-Tooth and Related Neuropathy Consortium Meeting, Sept 2016, Venice, Italy.

Olsson M, **Gorram F**, Alarcon F, Nuel G, Suhr OB, Planté-Bordeneuve V. Refine penetrance estimates in Swedish ATTR-Val30Met kindreds. ISA 2018; March 2018, Kumamoto, Japan.

Gorram F, Gentile L, Parman Y, Alarcon F, Nuel G, Funalot B, Cakar A, Vita G, Mazzeo A, Planté-Bordeneuve V. Penetrance variation in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP) with 7 ATTR variants observed in Europe. ISA 2018; March 2018, Kumamoto, Japan.

Gorram F, Olsson M, Alarcon F, Hebrard B, Funalot B, Nuel G, Suhr OB, **Planté-Bordeneuve V**. Variation of Penetrance estimates in a wide spectrum of TTR-FAP families: implication for management of carriers. AAN 2018, Los Angeles, Neurology Apr 2018, 90 (15 Supplement) S5.007.

Gorram F, Olsson M, Mazzeo A, Cisneros-Barroso E, Parman Y, Waddington Cruz M, Gentile L, Vita G, Anan I, Rodríguez-Rodríguez I, González-Moreno J, Losada I, Fanen P, Alarcon F, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. Variation of Penetrance in hereditary Transthyretin Amyloidosis (hATTR) between European countries: impact on the management of gene carriers. Eur J Neurol. 2020 May;27 Suppl 1:1-1228.

Communications affichées

Gorram F, Alarcon F, Perdry H, Hébrard B, Damy T, Fanen P, Funalot B, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. Refine penetrance estimates in the main pathogenic variants of transthyretin hereditary (familial) amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) using a new non-parametric approach (NPSE). ISA 2016, Jul 2016, Uppsala, Sweden.

Planté-Bordeneuve V, **Gorram F**, Salhi H, Nordine T, Ayache S, Le Corvoisier P, Azoulay D, Feray C, Damy T, Lefaucheur JP. Long-term effect of Tafamidis in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy: A study in Val30Met and non-Val30Met patients. ISA 2016, Jul 2016, Uppsala, Sweden.

Planté-Bordeneuve V, **Gorram F**, Feray C, Guendouz S, Couetil JP, Damy T, Lefaucheur JP, Azoulay D. Long term outcome after liver transplantation in Transthyretin Familial Amyloidosis Polyneuropathy (TTR-FAP). ISA 2018; March 2018, Kumamoto, Japan.

Planté-Bordeneuve V, **Gorram F**, Hébrard B, Damy T, Ayache S, Nordine T, Lefaucheur JP. Understand the disease emergence in hATTR: a longitudinal study of asymptomatic carriers to inaugural disease manifestations. AAN Philadelphia; April 09, 2019; 92 (15 Supplement).

Cisneros-Barroso E, **Gorram F**, Rodríguez-Rodríguez A, González-Moreno J, Losada I, Alarcon F, Nuel G, Planté-Bordeneuve V. A first penetrance estimate in val30met hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv) from mallorca. ISA 2020, Virtual Symposium; Sep 2020.