

**UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAÂDI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
TANGER**

UFR : BIOLOGIE APPLIQUEE, VALORISATION DES RESSOURCES NATURELLES

THESE

Présentée

Pour l'obtention du

Doctorat en Sciences Techniques

Par:

Fatiha BENYAHYA

Discipline: **Science de la vie**
Spécialité : **Génétique Humaine**

**ETUDE DE L'HYPERCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE A
TRANSMISSION AUTOSOMIQUE DOMINANTE (ADH) DANS LA
POPULATION DU NORD DU MAROC:
DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE ET GENETIQUE**

Soutenue le 29/12/ 2011 devant le jury :

AARAB Ahmed	Faculté des Sciences et Techniques de Tanger	Président
BENNIS Mohamed	Faculté des Sciences Semlalia- Marrakech	Rapporteur
ERRAMI Mohammed	Faculté des Sciences – Tétouan	Rapporteur
SEFIANI Abdelaziz	Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat	Rapporteur
BARAKAT Amina	Faculté des Sciences et Techniques de Tanger	Examineur
GHAILANI NOUROUTI Naima	Faculté des Sciences et Techniques de Tanger	Examineur
BENNANI MECHITA Mohcine	Faculté des Sciences et Techniques de Tanger	Directeur de thèse

A la grâce de Dieu,

J'ai pu terminer ce travail et apporter mon humble contribution à l'étude phénotypique et moléculaire des ADH. C'était pour moi comme la traversée de l'océan avec tempêtes et eaux calme. Mais comme toute épreuve, on sort grandi d'une telle expérience et c'est un réel bonheur que d'atteindre un autre arrivage. Car, là, tout reste à découvrir et la fin d'une épopée et le

début d'une autre ...

Et avec plaisir que je dédie ce travail

à mes parents qui, sans leur aide moral et matériel, je n'aurais pu réaliser ce travail

à mes frères et soeurs pour leur soutien et encouragement

à mes neveux

en particulier mon neveu Rachid Sahal

et à mon mari qui m'a soutenu dans les moments difficiles

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à exprimer ma reconnaissance envers la personne qui m'a proposé le sujet de thèse et qui m'a encadré tout au long de ces années de thèse: Professeur Mohcine BENNANI MECHITA. Il m'a accordé sa confiance dans le stage de DESA, m'a orienté vers des thèmes de recherche très promoteurs, puis m'a encadré avec compétence, dynamique et disponibilité. Je salue aussi sa souplesse, son ouverture d'esprit et sa bonne humeur qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Jamais je n'aurai pu réaliser cette recherche doctorale sans le support indéfectible du Docteur Filipe Javier Chaves. Lors de mon premier séjour dans son laboratoire, on m'avait demandé de ne pas m'inquiéter et je tiens à confirmer mon soulagement parmi eux. Efficacité, compétence, disponibilité, rigueur et ouverture d'esprit sont là quelques unes de ses qualités que j'ai trouvées en Docteur Sebastian Blesa, je vous remercie sincèrement pour votre appui scientifique et moral. Votre intuition scientifique m'a éclairé mon chemin de travail et de recherche et votre encouragement m'a donné l'espoir pour bon demain pour la recherche médicale et scientifique dans notre pays. Je vous considère mon professeur auquel je tiens à présenter toutes mes reconnaissances, merci pour tout. Je ne peux oublier les discussions passionnées, les dialogues soutenus et les directives données par Docteur Anna-Barbara Garcia-Garcia.

J'aimerais remercier le professeur Ahmed AARAB d'avoir accepté de présider ce jury. Etant l'un des spécialistes de la génétique médicale, la présence du professeur Abdelaziz SEFIANI en tant que rapporteur dans le jury m'honore, je le remercie d'avoir accepté de venir de Rabat pour juger ce travail. Je souhaite également adresser toute ma gratitude et mes remerciements sincères au professeur Mohammed ERRAMI qui a accepté d'être rapporteur de mon travail. Je remercie le professeur Mohammed BENNIS d'avoir assuré la lourde tâche de rapporteur et d'avoir accepté de venir de loin pour juger mon travail. Ma grande reconnaissance va également au professeur Naima GHAILANI NOUROUTI qui me fait l'honneur d'être dans mon jury. Je ne sais exprimer mes sentiments envers le Professeur Amina BARAKAT pour sa qualité humaine et je tiens à la remercier sincèrement de me faire l'honneur d'être dans mon jury.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à tous les membres du laboratoire de génotypage et génétique de l'Hôpital-clinique CHU de Valence en Espagne. A Maria Luisa Mansego Talavera pour sa qualité humaine et professionnelle, à VERONICA pour sa bonne humeur et son aide précieux, à Carmen Ivora qui m'a entouré par son amitié et son affection et à Maria Jose pour son soutien moral, sans oublier le reste des membres de l'équipe que je tiens à remercier beaucoup pour le coté humain qu'elles ont et qui m'a facilité le séjour en Espagne et m'a permis de garder l'équilibre dans les moments les plus difficiles.

Je tiens à remercier le responsable de l'Institut pasteur du Maroc à Tanger Docteur Ahmed BENDALI qui m'a facilité les démarches de l'autorisation d'absence pour mon stage en Espagne et l'ex-directeur de l'IPM de Maroc professeur HASSAR Mohamed qui m'a accorder l'autorisation de stage pour réaliser ce travail.

Je ne peux passer inaperçu sur le rôle précieux qu'a joué notre infirmier à l'IPM Tanger Monsieur Monhim NAFIE dans la collecte des échantillons.

Je ne trouve pas de mots qui peuvent exprimer mes remerciements à Madame Nadia ELFASSI qui m'a assuré les prélèvements du sang au niveau des villes de Tétouan et de Sebta.

Je ne saurais remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenu, encouragé, aidé tout au long de la période du temps que j'ai investi dans cette recherche et la réalisation de cette thèse. J'estime essentiel de dire un grand merci au Docteur Abderrahmane AHANOU, ex-médecin biologiste à l'IPM Tanger qui m'a posé les premiers pas sur le chemin de la compréhension de mon sujet de thèse.

En fin, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans l'affection, les encouragements, et le soutien constant de mes parents.

Ce travail a été financé par l'Agence espagnole pour la Coopération Internationale réf. A/7087/06) (Ministère espagnol d'Affaires Internationales et Coopération), CIBER de diabète et troubles de métabolisme associé (CIBERDEM), PROMETEO/2009/029 (Generalitat Valenciana, Valencia, Spain) et CIT-00100-2007-36 (ministère espagnole de la science et technologie)

RESUME

L'hypercholestérolémie familiale autosomique dominante (ADH) occupe une place primordiale parmi les facteurs de risque de l'athérosclérose. Elle est caractérisée par une augmentation isolée du cholestérol total (CT) et du cholestérol-LDL (LDLc). Elle est principalement due à des mutations au niveau de trois gènes : le gène du récepteur LDL (*LDLR*), le gène de l'apolipoprotéine B (*APOB*), et le gène *PCSK9*. Le but de notre travail est de déterminer, dans la population du Nord du Maroc, le phénotype clinique et biologique des patients ADH, d'identifier les défauts moléculaires des trois gènes responsables de l'ADH et d'étudier la corrélation entre le phénotype et le génotype chez ces patients. Dans ce travail nous avons également déterminé le génotype de l'apoE dans la population du Nord du Maroc et étudié la fréquence de ces allèles et leur influence sur le profil lipidique et les caractéristiques clinique. Nous avons sélectionné 46 probands adultes cliniquement diagnostiqués ADH selon les programmes MEDPED, "Simon Broome Register Group" et "Dutch Lipid Clinic Network". 89 individus normocholestérolémiques et non apparentés ont été utilisés comme groupe contrôle. Nous avons mesuré les paramètres lipidiques, à savoir, le CT, les triglycérides, le HDLc, le LDLc et l'apoB. Nous avons analysé par séquençage direct automatique la totalité du gène *LDLR*, du gène *PCSK9* et des exons 26 et 29 du gène *APOB*. Au niveau du gène *LDLR*, nous avons identifié, quatre mutations ponctuelles à l'état hétérozygote causantes de l'HF: *p.C146X*, *p.R57H*, *p.W789L* et *p.V806F*. Les mutations faux sens (*p.R57H*, *p.W789L* et *p.V806F*) sont nouvelles et jamais décrites dans les autres populations. La mutation non sens (*p.C146X*) est nouvelle dans la population marocaine mais elle a été décrite précédemment ailleurs. Nous montrons, chez les patients hétérozygotes HF, une corrélation entre les mutations identifiées et le taux de cholestérol LDL (246 ± 79 mg/dl, $p < 0.05$), le score HF (12 ± 2 , $p < 0.01$), les xanthomes tendineux (40%, $p < 0.01$) et la maladie cardiovasculaire prématurée ($p < 0.01$). La contribution de ces mutations dans l'HF dans la population du Nord du Maroc est d'environ 11%. Nous avons également identifié 11 polymorphismes (*p.C6C*, *p.A370T*, *p.P518P*, *p.L554L*, *p.N570N*, *p.V632V*, *p.R450R*, *p.R723R*, *c.1706-10G>A*, *c.1060 +10 G>C* et *c.1060 +7 T>C*) n'ayant aucun impact sur la cholestérolémie. Aucun des sujets étudiés n'est porteur de mutations responsables de la maladie dans le gène *APOB* ou le gène *PCSK9* mais nous avons identifié quatre nouveaux polymorphismes dans le gène *APOB* : *p.T3567T* et *p.N3579N*, sur l'exon 26 du gène *APOB* et *p.S4211N* et *p.V4238A* sur l'exon 29.

A l'issue de ce travail, nous avons également déterminé le génotype de l'apoE. Les fréquences des allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, et $\epsilon 4$ dans notre population sont de 2.2%, 78.3% et 19.6% respectivement avec une fréquence très élevée de l'allèle $\epsilon 4$. Les génotypes de l'apo E n'influencent pas les taux du CT, du LDLc et la maladie cardiovasculaire chez les sujets hypercholestérolémiques mais l'allèle $\epsilon 4$ est associé à une augmentation de taux de l'apoB et à l'hypertriglycémie chez les sujets obèses. Dans ce travail nous apportons pour la première fois des informations importantes sur les bases moléculaires de l'ADH dans la population du Nord du Maroc. Nous montrons une forte hétérogénéité mutationnelle et une grande variabilité de l'expression de la maladie. Notre étude a montré que l'ADH dans le Nord du Maroc n'est pas principalement due aux défauts moléculaires dans le gène *LDLR* ni dans le gène *APOB* ni dans le gène *PCSK9*.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP:	Aminoantipyrine
ABCA-1 :	ATP-Binding Cassette Transporter A1
ADH :	Hypercholesterolemie Autosomique Dominante
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Dihydroxyacetone phosphate
Agarose- MS:	Agarose-Molecular Screening
Agaros-EEO:	Agarose-Electroendosmosis
Apo :	Apolipoprotéine
ARH :	Hypercholestérolémie à Transmission Autosomique Récessive
ARN :	Acide Ribonucléique
ATP :	Adenosine-5-Triphosphate
AVC :	Attaque Cérébrovasculaire
BMI :	Body Mass Index (indice de masse corporelle)
CE :	Cholestérol Estérase
CETP :	Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol
CM :	Chylomicrons
CO :	Cholesterol oxydase
CoA :	Coenzyme A
ddGTP :	Dideoxynucleotides
DEA-HCl/AAP:	N,N-diethylaniline-HCl/4-aminoantipyrine
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
dNTP:	Désoxyribonucléotides triphosphates
DO :	Densité optique
DSBmT :	N,N-bis(4-Sulphobutyl)-M-Toluidine-Disodique
EC :	Ester de cholestérol
ECG :	Electrocardiogramme
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF :	Epidermic Growth Factor (facteur de croissance épidermique)
FDB :	Déficiencia Familiale en ApoB-100 (<i>familial ligand defective apoB100</i>)
GK :	Glycérol kinase
GPO:	Glycerol-3-phosphateoxydase

HDL :	High density lipoprotein (Lipoprotéines de haute densité)
HDLc :	Cholestérol HDL
HF :	Hypercholestérolémie Familiale
HMG:	3-hydroxy-3méthylglutaryl
HMGCoA :	Hydroxymethyl-glutaryl-CoenzymeA
IDL :	Lipoprotéines de densité intermédiaire
IPP :	Pyrophosphate d'isopentyle
LCAT :	Lecithine cholestérol acyltransférase
LDL :	Low density lipoproteines (lipoprotéines de basse densité)
LDLc :	Cholestérol LDL
LE :	Lipase endothéliale
LH :	Lipase hépatique
Lp(a) :	Lipoproteine (a)
LPL :	Lipoprotéine lipase
LRP :	Protéine apparentée au LDLR
MCV :	Maladie cardiovasculaire
MCVP :	Maladies cardiovasculaires prématurées
MEDPED :	Make Early Diagnosis to Prevent Early Death
MLPA :	Multiplex ligation dependant probe amplification
MTP :	Protéine Microsomal de Transfert de Triglycérides
NaCl :	chlorure de sodium
Narc-1 :	Neural apoptosis regulated convertase 1
NCEP-ATP III :	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NPC1L1:	Nieman-Pick C1-Like 1
OMS :	Organisation mondiale de la santé
Pb :	paire de base
PCR :	Polymerase chain reaction
PCSK9 :	Proprotéine convertase subtilin/kexin type 9
PL :	Lipoprotéines
POD :	Peroxydase
POR :	Peroxydase de raifort
LDLR :	Récepteur de LDL
ROS :	Reactif species oxygene (espèces réactives d'oxygène)
SDS :	sodium dodécyl Sulfate

SIRE: Sterol-independent regulatory element
SR-B1/Cla-1: Récepteur scavenger type B classe 1
SRE: Sterol regulatory element
SREBP-1: Sterol regulatory element-binding protein-1
TAE : Tris Acétate EDTA
TBE : Tris-Borate-EDTA
TBE : Tris Borate EDTA
TG : Triglycérides
Tm : Température de Fusion
VLDL : Lipoprotéines de très basse densité

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires (Boland et al, 2000)...	6
Tableau 2:	Classification de Fredrickson des hyperlipidémies (Fredrickson et al, 1967)..	10
Tableau 3:	Composition de différents types de lipoprotéines (Hogue, 2004)	12
Tableau 4:	Diagnostic de l'hypercholestérolémie familiale selon les critères du programme US MEDPED.....	39
Tableau 5:	Critères de diagnostic de l'hypercholestérolémie familiale selon Simon Broome Familial Hypercholesterolemia.....	41
Tableau 6:	Critères de diagnostic de l'hypercholestérolémie familiale selon le Dutch Lipid network critères.....	42
Tableau 7:	Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène <i>RLDL</i> (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_results_help.cgi - PRIMER_THREE).....	75
Tableau 8:	Liste des amorces utilisées pour l'exploration des exons 26 et 29 du gène <i>APOB</i>	84
Tableau 9:	Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène <i>PCSK9</i>	85
Tableau 10:	Caractéristiques cliniques et biologiques de base des 46 patients sélectionnés selon les deux approches de diagnostic de l'ADH (MEDPED et Simon Broome Register Group Criteria).....	91
Tableau 11:	Proposition de classement des patients basée sur le score FH selon le "Dutch lipid Clinic Network criteria"	92
Tableau 12:	Caractéristiques biologiques des 46 patients et des témoins.....	94
Tableau 13:	Les 4 nouvelles mutations du gène <i>RLDL</i> identifiées chez cinq patients hétérozygotes HF du nord du Maroc.....	97
Tableau 14:	Polymorphismes du gène <i>RLDL</i> identifiés dans la population du nord du Maroc	99

Tableau 15: Données cliniques et biologiques de la patiente porteuse de la mutation <i>p.C146X</i> et les membres de sa famille	100
Tableau16: Données cliniques et biologiques présentées par les patients porteurs des mutations <i>p.R57H</i> , <i>p.W789L</i> et <i>p.V806F</i>	103
Tableau 17: Polymorphismes du gène <i>APOB</i> caractéristiques de la population du nord du Maroc	113
Tableau 18: Profil lipidique des trois patients porteurs du polymorphisme <i>p.V4238A</i>	115
Tableau 19: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients hétérozygotes HF et des patients sans mutations dans le gène <i>RLDL</i>	118
Tableau 20: Caractéristiques cliniques et biologiques des cinq patients hétérozygotes HF.	120
Tableau 21: Distribution et fréquence des allèles du gène de l'apoE selon le sexe chez la population du Nord du Maroc	123
Tableau 22: Influence des allèles de l'apoE sur les données cliniques et biologiques des sujets sans mutations.....	125
Tableau 23: Influence des allèles de l'apoE sur les données biologiques des sujets sans mutations selon le sexe.....	127
Tableau 24: Comparaison des fréquences alléliques de l'apo E entre la population du Nord du Maroc et des populations d'autres origines ethniques	145

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Schéma de processus de formation de la lésion athéromateuse	5
Figure 2:	Augmentation du risque de développer une pathologie cardio-vasculaire en considérant l'interaction de divers facteurs	8
Figure 3:	Voies de transport de cholestérol (Daniels et al, 2009)	14
Figure 4:	Cycle du LDLR. (Figure adaptée de Soutar, 1999 et de Goldstein, 2000) ...	23
Figure 5:	Domaines structuraux du récepteur LDL et les exons qui les codifient	26
Figure 6:	APOB, du gène à la protéine : mutations fréquentes et domaines protéiques codés par le gène <i>APOB</i> (Abifadel et al, 2006)	29
Figure 7:	PCSK9, du gène à la protéine : Variations hypo et Hypercholestérolémiantes et domaines protéiques codés par le gène <i>PCSK9</i> (Abifadel et al, 2006)	33
Figure 8:	ApoE et son polymorphisme (http://www.atgen.com.uy/english/images/graficaq_apoe.gif)	37
Figure 9:	Xanthomes tendineux	52
Figure 10:	Xanthomes cutanés	52
Figure 11:	Arc cornéen	52
Figure 12:	Schéma de la méthode résumée de l'extraction d'ADN par NaCl	63
Figure 13:	Diagramme schématique de processus de l'amplification par la méthode d'amplification GenomiPhi.	66
Figure 14:	Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	69
Figure 15:	Schéma de purification des produits de PCR pas les billes magnétiques du kit Aagencourt® AMpure® PCR Purification system	79
Figure 16 :	Comparaison des caractéristiques biologiques entre les patients et des témoins	95

Figure 17: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 4 du gène <i>RLDL</i> de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation <i>p.C146X</i> généré par séquençage automatique	102
Figure 18: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 3 du gène <i>RLDL</i> de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation <i>p.R57H</i> généré par séquençage automatique	104
Figure 19: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 17 du gène <i>RLDL</i> de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation <i>p.W789L</i> généré par séquençage automatique.....	106
Figure 20: Electrophoregramme des séquences sens et anti sens de l'exon 17 du gène <i>RLDL</i> de l'ADN génomique d'un sujet normal et un patient hétérozygote pour la mutation <i>p.V806F</i> généré par séquençage automatique	108
Figure 21: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 29z2 du gène <i>APOB</i> de l'ADN génomique d'un sujet normal et d'un patient hétérozygote pour la mutation <i>p.V4238A</i> généré par séquençage automatique	116
Figure 22 : Comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques entre des patients hétérozygotes HF et des patients sans mutations dans le gène <i>LDLR</i>	119
Figure 23 : Fréquences des allèles $\epsilon 2$ (E2/E3), $\epsilon 3$ (E3/E3), et $\epsilon 4$ (E4/E4 et E3/E4) dans la population du Nord du Maroc.....	122
Figure 24: Ccomparaison des données biologiques des patients en fonction des allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ (E4/E4 et E4/E3).....	126
Figure 25: Fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ chez la population du nord du Maroc et les populations des autres régions marocaine et les populations de l'Europe du Nord	144

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
A. Athérosclérose	4
1. Processus de la formation de lésion athéromateuse.....	4
2. Facteurs de risque de l'athérosclérose	4
2.1. Facteurs non modifiables	7
2.2. Facteurs modifiables	7
B. Hyperlipoprotéïnémies	9
1. Les hypercholestérolémies.....	11
1.1. Transport du cholestérol	11
1.1.1. Transport exogène.....	13
1.1.2. Transport endogène.....	13
1.1.3. Transport Inverse du Cholestérol.....	15
1.1.4. Régulation de l'apport du cholestérol.....	16
1.2. Hypercholestérolémies à transmission autosomique dominante (ADH)....	16
1.2.1. Aspects historiques	17
1.2.2. Aspects cliniques et biologique de l'ADH	18
1.2.2.1. Hypercholestérolémie Familiale (HF).....	18
1.2.2.2. Déficience familiale en apo B 100 (FDB).....	20
1.2.2.3. ADH liée au gène codant la protéine PCSK9.....	20
1.2.3. Aspect génétique de l'hypercholestérolémie autosome dominante (ADH)	21
1.2.3.1. Récepteur des LDL	21
1.2.3.1.1. Structure et fonction de la protéine	21
1.2.3.1.2. Synthèse et cycle du récepteur des LDL	22
1.2.3.1.3. Structure du gène Récepteur LDL	24
1.2.3.1.4. Mutations du gène <i>RLDL</i>	25
1.2.3.2. Gène <i>APOB</i>	27
1.2.3.2.1. Structure et fonction de la protéine apoB	28
1.2.3.2.2. Structure du gène <i>APOB</i>	28

1.2.3.2.3. Mutations du gène <i>APOB</i>	30
1.2.3.3. Gène <i>PCSK9</i>	32
1.2.3.3.1. <i>PCSK9</i> : gène/protéine.....	32
1.2.3.3.2. Structure de <i>PCSK9</i>	32
1.2.3.3.3. Rôle de <i>PCSK9</i> dans le métabolisme de LDL	32
1.2.3.3.4. Les mutations du gène <i>PCSK9</i>	34
1.3. Apolipoprotéine E	36
1.3.1. Le gène de l'apo E	36
1.3.2. Polymorphisme de l'apoE	36
1.3.3. Structure de l'apoE	36
1.3.4. Influence des phénotypes de l'apo E sur les lipides	37
2. Diagnostique des hypercholestérolémies.....	38
2.1. Diagnostique clinique et biochimique.....	38
2.1.1. Le programme MEDPED (Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths)	38
2.1.2. Simon Broome Register Group criteria	40
2.1.3. Dutch Lipid Clinic Network criteria	40
2.2. Diagnostique génétique.....	43
2.2.1. Diagnostique génétique direct.....	43
2.2.2. Diagnostique génétique indirect	44
2.2.3. Diagnostique fonctionnel.....	44
3. Traitement des hypercholestérolémies.....	44
3.1. Traitement non pharmacologique	45
3.1.1. Régime alimentaire	45
3.1.2. Activité physique	45
3.2. Traitement pharmacologique	45
3.2.1. Les statines (Inhibiteurs de la HMG-COA réductase).....	46
3.2.2. Fibrates	46
3.2.3. Résines (séquestrants d'acides biliaires)	47
3.2.4. Ezetimibe	47
3.2.5. Les inhibiteurs de la squalène synthase	47
3.2.6. Inhibiteur de la protéine de transfert microsomial (MTP)	47
3.2.7. Oligonucléotides anti-sens : ApoB-100 (Mipomersen)	47
3.2.8. Inhibiteur de <i>PCSK9</i>	48

3.3. Thérapie génique.....	48
C. But du travail.....	49
MATERIELS ET METHODES	50
A. Sujets Etudies.....	51
B. Analyses biochimiques	53
1. Prélèvement du sang	53
2. Dosage des paramètres lipidiques	53
2.1. L'automate analyseur	53
2.2. Techniques de dosage	53
2.2.1. Dosage du cholestérol total (CT).....	53
2.2.1.1. Principe de la technique	53
2.2.1.2. Résultats et interprétations.....	55
2.2.2. Dosage des triglycérides	55
2.2.2.1. Principe de la technique	55
2.2.2.2. Résultats et interprétations.....	56
2.2.3. Dosage du cholestérol HDL	57
2.2.3.1. Technique du dosage	57
2.2.3.2. Principe de la technique.....	57
2.2.3.3. Résultats et interprétations	58
2.2.4. Dosage du cholestérol LDL	58
2.2.5. Dosage de l'apolipoprotéine B (apoB)	59
2.2.5.1. Technique de dosage.....	59
2.2.5.2. Principe de la technique	59
2.2.5.3. Résultats et interprétations	60
C. Analyses Génétiques.....	60
1. Extraction d'ADN	61
1. 1. Prélèvement du sang.....	61
1. 2. Extraction d'ADN à partir du sang total par la méthode saline	61
1. 3. Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait	62
2. Amplification d'ADN par la technique GenomePhi.....	65
2.1. Principe de la technique GenomePhi.....	65

2.2. Protocole de la technique GenomePhi	67
3. Protocole de diagnostic de l'ADH	67
3.1. Analyse du gène <i>RLDL</i>	68
3.1.1. Amplification de l'ADN par réaction de PCR	68
3.1.1.1. La technique de la PCR Hotstart	73
3.1.1.1.1. Principe de la technique de la PCR HotStart.....	73
3.1.1.1.2. Enzyme Hotstart	73
3.1.1.1.3. La réaction d'amplification PCR HotStart	74
3.1.2. Vérification de la qualité des produits de PCR double brin	77
3.1.3. Purification des produits de PCR double brin	78
3.1.4. Séquençage de l'ADN	80
3.1.4.1. Réaction de séquençage	81
3.1.4.2. Purification des produits de la réaction de séquence	82
3.1.4.3. Analyse des séquences	82
3.2. Analyse du gène <i>APOB</i>	83
3.3. Analyse du gène <i>PCSK9</i>	84
4. Détermination des génotypes de l'apolipoprotéine E	87
D. Analyse statistique	87
RESULTATS	88
A. Phénotype clinique et biologique de l'ADH des patients du Nord du Maroc	89
1. Selon le programme MEDPED (Make Early Diagnosis-Prevent Early Death).....	89
2. Selon Simon Broome Register Group Criteria.....	89
3. Selon le Dutch lipid Clinic Network Criteria.....	90
B. Spectre génétique de l'hypercholestérolémie a transmission autosomique dominante (ADH) au Nord du Maroc	96
1. Gène de récepteur des LDL (<i>RLDL</i>)	96
1.1. L'Hypercholestérolémie Familiale au nord du Maroc	96
1.1.1. Les mutations causantes de l'HF chez la population du Nord du Maroc .	98
1.1.1.1. La mutation non sens (<i>p.C146X</i>)	98

1.1.1.2. Les mutations faux sens.....	101
1.1.2. Les polymorphismes du gène <i>RLDL</i> dans la population du Nord du Maroc	109
1.1.2.1. Nouveaux polymorphismes	109
1.1.2.2. Autres polymorphismes	110
2. Gène de l'apolipoprotéine B (APOB)	112
2.1. Variations du gène <i>APOB</i> dans la population du nord du Maroc	112
2.1.1. Polymorphisme de l'exon 26	112
2.1.2. Polymorphisme de l'exon 29.....	114
3. Gène <i>PCSK9</i>	117
C. Corrélation entre le phénotype et le génotype de l'ADH chez les patients hétérozygotes HF de la population du Nord du Maroc	117
D. Génotype de l'apolipoprotéine E	121
1. Distribution et fréquences des allèles du gène de l'apoE dans la population du Nord du Maroc	122
2. Influence de génotypes de l'apoE sur les caractéristiques cliniques et lipidiques chez la population hypercholestérolémique du nord du Maroc	124
DISCUSSION.....	128
A. Variations phénotypiques des patients hétérozygotes HF du Nord du Maroc	129
B. Spectre génétique de l'ADH dans la population du Nord du Maroc.....	130
1. Gène <i>RLDL</i>	131
1.1. Mutations causantes l'HF dans la population du Nord du Maroc	131
1.1.1. La mutation non sens (<i>p. C 146X</i>)	131
1.1.2. Les mutations faux sens	132
1.2. Polymorphismes du gène <i>RLDL</i> dans la population du Nord du Maroc	134
1.2.1. Nouveaux polymorphismes dans la population marocaine.....	134
1.2.2. Autres Polymorphismes	135
2. Gène <i>APOB</i>	137

2.1. Polymorphismes du gène APOB dans la population du nord du Maroc	138
2.1.1. Polymorphisme de l'exon 26	138
2.1.2. Polymorphisme de l'exon 29	138
3. Gène <i>PCSK9</i>	139
C. Corrélation entre le phénotype et le génotype dans les patients	
hétérozygotes HF du Nord du Maroc.....	140
D. Génotype de l'apolipoprotéine E (apoE).....	142
1. Distribution et fréquences des allèles du gène de l'apoE dans la population	
du Nord du Maroc	143
2. Influence du génotype de l'apoE sur les caractéristiques cliniques et lipidiques	
chez la population hypercholestérolémique du nord du Maroc	146
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
ANNEXES.....	176
Annexe 1	177
Annexe 2	178

INTRODUCTION GENERALE

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés et en voie de développement. Les principaux facteurs de risque traditionnels de l'athérosclérose sont la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme, le sexe masculin, le diabète, l'âge, l'obésité et l'histoire familiale. Les habitudes de la vie quotidienne, une mauvaise alimentation et le manque d'activité physique, sont également favorables au développement de l'athérosclérose, mais leur impact spécifique demeure moins bien connu et varie souvent selon les populations étudiées.

La dyslipidémie, un des facteurs de risque les plus importants, peut résulter d'une augmentation du cholestérol provenant des lipoprotéines de faible densité (LDLc), mais aussi d'une réduction du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDLc). La dyslipidémie la plus commune et la plus importante d'un point de vue clinique est caractérisée par une augmentation des lipoprotéines LDL riches en apolipoprotéine B (apoB) associées à une hypercholestérolémie. L'importance des facteurs génétiques dans le développement de l'athérosclérose a été démontrée par l'identification de l'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH).

L'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH, OMIM#143890) est génétiquement hétérogène. Elle est associée aux déficits dans au moins trois gènes différents. Le premier gène impliqué dans l'ADH est le gène de récepteur des LDL (*LDLR*). Il joue un rôle crucial dans le déterminisme de la maladie désignée par HF pour hypercholestérolémie familiale (OMIM#606945). Le deuxième gène impliqué dans l'ADH est le gène *APOB*, qui code le ligand principal pour le récepteur LDL : apolipoprotéine B-100 (apo B-100) impliqué dans l'assimilation des particules LDL du sang. Le défaut moléculaire du gène *APOB* est appelé déficience familiale en apolipoprotéine B-100 (FDB) (OMIM#107730) (Innerarity et al, 1987). Le troisième gène majeur impliqué dans le phénotype de l'ADH est le gène *PCSK9* codant pour la *proprotein convertase subtilin/kexin type9* (NM_174936; OMIM #603776; #607786) (Abifadel et al, 2009).

L'ADH se traduit par des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol véhiculé par des lipoprotéines de basse densité (LDL), par la présence des xanthes tendineux chez le patient ou au moins chez l'un de ses parents, et par des antécédents familiaux en maladies cardiaques prématurées ou en hypercholestérolémie. Elle touche une personne sur 500 à l'état hétérozygote et une personne sur un million à l'état homozygote (Austin et al, 2004a). Cette prévalence est très forte dans certaines populations, où un effet fondateur est observé, notamment chez les Africains en Afrique de Sud (Leitersdorf et al, 1989), les Chrétiens libanais (Lerham et al, 1987) et les Canadiens français (Leitersdorf et al, 1990). Malgré cette fréquence élevée, l'ADH reste encore sous-diagnostiquée dans la population générale et partiellement élucidée sur le plan génétique.

En raison de cette situation insatisfaisante, des programmes ont été mis en œuvre dans de très nombreux pays pour prévenir les maladies cardiaques dues aux ADH et par conséquent, d'abaisser la morbidité et la mortalité des maladies cardiovasculaires génétiquement déterminées. Le Programme MEDPED coordonne ces efforts internationaux en réseau mondial (plus de 40 pays) sous le patronage de l'OMS, visant à dépister les formes d'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH), principalement l'hypercholestérolémie familiale (HF) résultante de déficit du récepteur des LDL, le trouble le plus grave, mais le mieux examiné en clinique et en génétique moléculaire.

Au Maroc, les ADH sont très peu étudiées et les résultats des études réalisées sont insuffisants pour décrire le spectre génétique et le phénotype clinique de la maladie dans la population marocaine (El Messal et al, 2003; Chater et al, 2006; Ait Chihab et al, 2007).

Dans ce travail nous proposons de déterminer, dans la population du Nord du Maroc, le phénotype clinique et biologique des patients ADH et identifier les défauts moléculaires qui en sont la cause dans les trois gènes (le gène *LDLR*, le gène *APOB* et le gène *PCSK9*). Nos résultats permettront un diagnostic précoce de la maladie et contribueront à prévenir les maladies cardiovasculaires, principale cause de mortalité dans notre pays.

Revue bibliographique

A. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie fréquente, complexe et multifactorielle qui se développe dès la naissance. Elle est la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés. Elle est considérée comme un processus inflammatoire chronique de la paroi artérielle, qui commence comme une lésion dans la couche média ou intima des artères puis évolue et envahit le lumen et provoque différents syndromes ischémiques, comme les cardiopathies ischémiques (angine, infarctus de myocarde, etc.), les vasculopathies périphériques et les accidents ischémiques cérébrales.

1. Processus de formation de la lésion athéromateuse (Figure 1) :

Le processus commence par une concentration trop importante des molécules transporteuses du cholestérol dans le sang: les lipoprotéines de basse densité (LDL). Ces molécules vont être captées par les cellules présentes autour des vaisseaux sanguins : les cellules endothéliales. Par un processus d'oxydation, ces LDL vont être reconnus comme des corps étrangers par les cellules environnantes, qui vont ensuite recruter des macrophages pour permettre l'élimination des LDL (Sparrow et al, 1989; Boullier et al, 2001). Les macrophages ne peuvent détruire ces LDL, ils sont surchargés par ces molécules et deviennent spongieux (cellule spumeuses). Ils prennent plus de place et c'est le début de la formation de la plaque d'athérome. Des cellules musculaires migrent au niveau de la plaque d'athérome, elles sécrètent alors des facteurs fibrillaires qui, à force de s'accumuler, vont engendrer ou rigidifier la plaque d'athérome qui sera alors moins souple (Grech et al, 2003). Une rupture de la plaque entraîne la formation d'un thrombus dont le rôle principal est de colmater la blessure, mais qui est susceptible d'obstruer l'artère et de provoquer un syndrome ischémique.

2. Facteurs de risque de l'athérosclérose :

Les facteurs qui augmentent le risque d'apparition de cette maladie peuvent être d'origines génétiques ou environnementales. Ils sont nombreux et se divisent en deux grands groupes (Tableau 1):

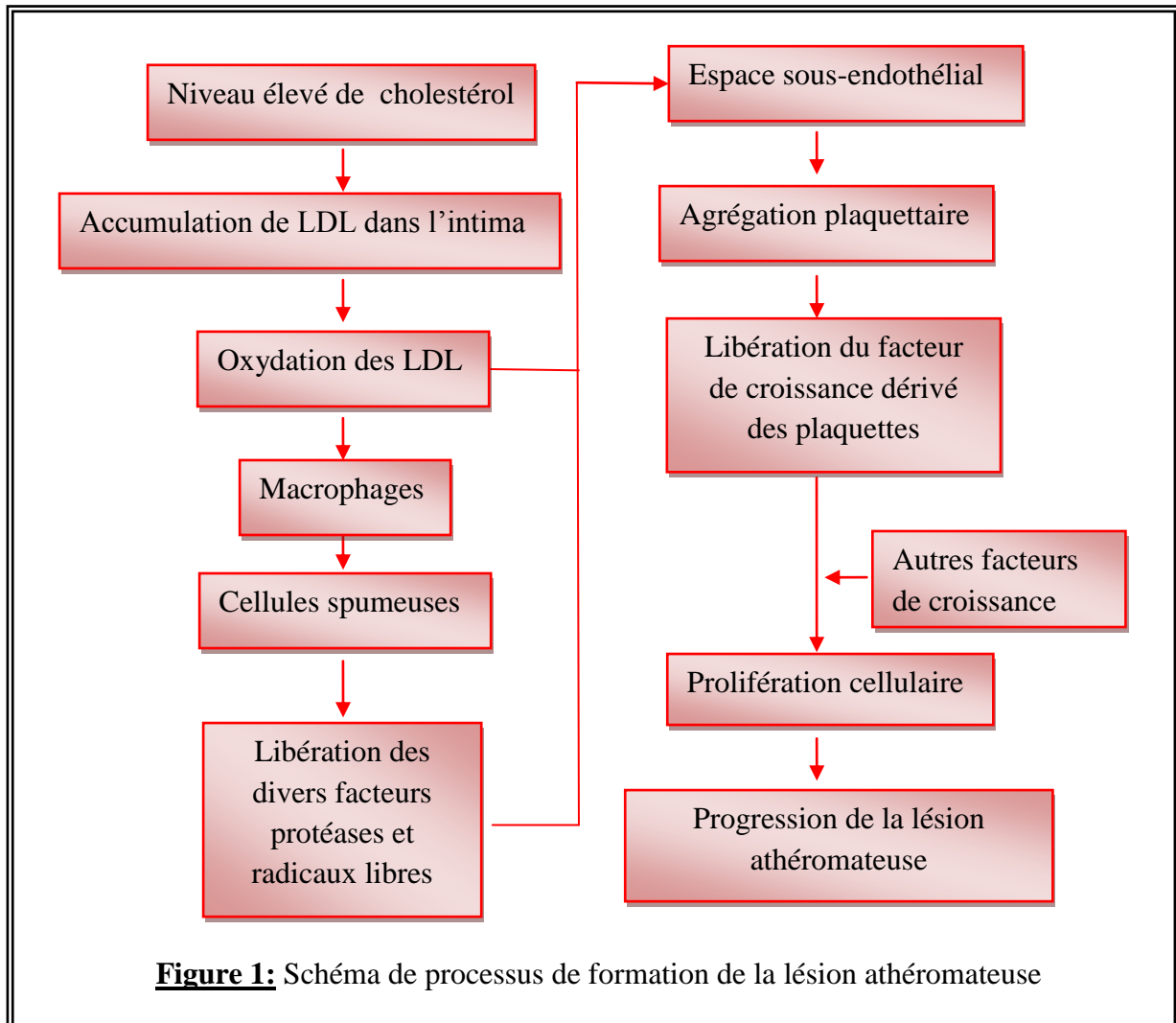


Figure 1: Schéma de processus de formation de la lésion athéromateuse

Tableau 1: Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires (Boland et al, 2000)

Facteurs non modifiables	Facteurs modifiables	
	Comportementaux	Métaboliques
Age*	Tabagisme*	Pression artérielle*
Sexe*	Graisses saturées	Diabète°
ACV personnels	Excès d'alcool	Cholestérol total *et LDL
ACV familiaux°	Sédentarité	HDL cholestérol°
Hyperlipidémie génétique°	Obésité viscérale°	Triglycérides
Lipoprotéine (a)		CRP-fibrinogène

* Facteurs de risque principaux (n=5) utilisés dans la Table Européenne du risque coronarien

° Facteurs de risque supplémentaires (n=5) de la Table Européenne du risque coronarien

NB: facteurs à l'étude: carence oestrogénique; homocystéine; fibrinogène/CRP, chlamydia pneumoniae,...

(Boland et al, 2000).

ACV : Antécédents cardiovasculaires

2.1. Facteurs non modifiables:

On ne peut pas agir sur ces facteurs de point de vue thérapeutique. Parmi ceux-ci se trouvent :

- ***l'hérédité (antécédents familiaux):*** Différentes études épidémiologiques longitudinales ont montré que l'hérédité est l'un des principaux facteurs qui prédisposent au développement de l'artériosclérose (Boland et al, 2000).
- ***l'âge d'apparition de la maladie chez les membres de la famille:*** Il y a un risque majeur si la maladie apparaît avant les 50 ans pour les hommes et 60 ans pour les femmes (Boland et al, 2000).
- ***le sexe:*** les hommes sont plus susceptibles de développer la maladie que les femmes.

2.2. Facteurs modifiables:

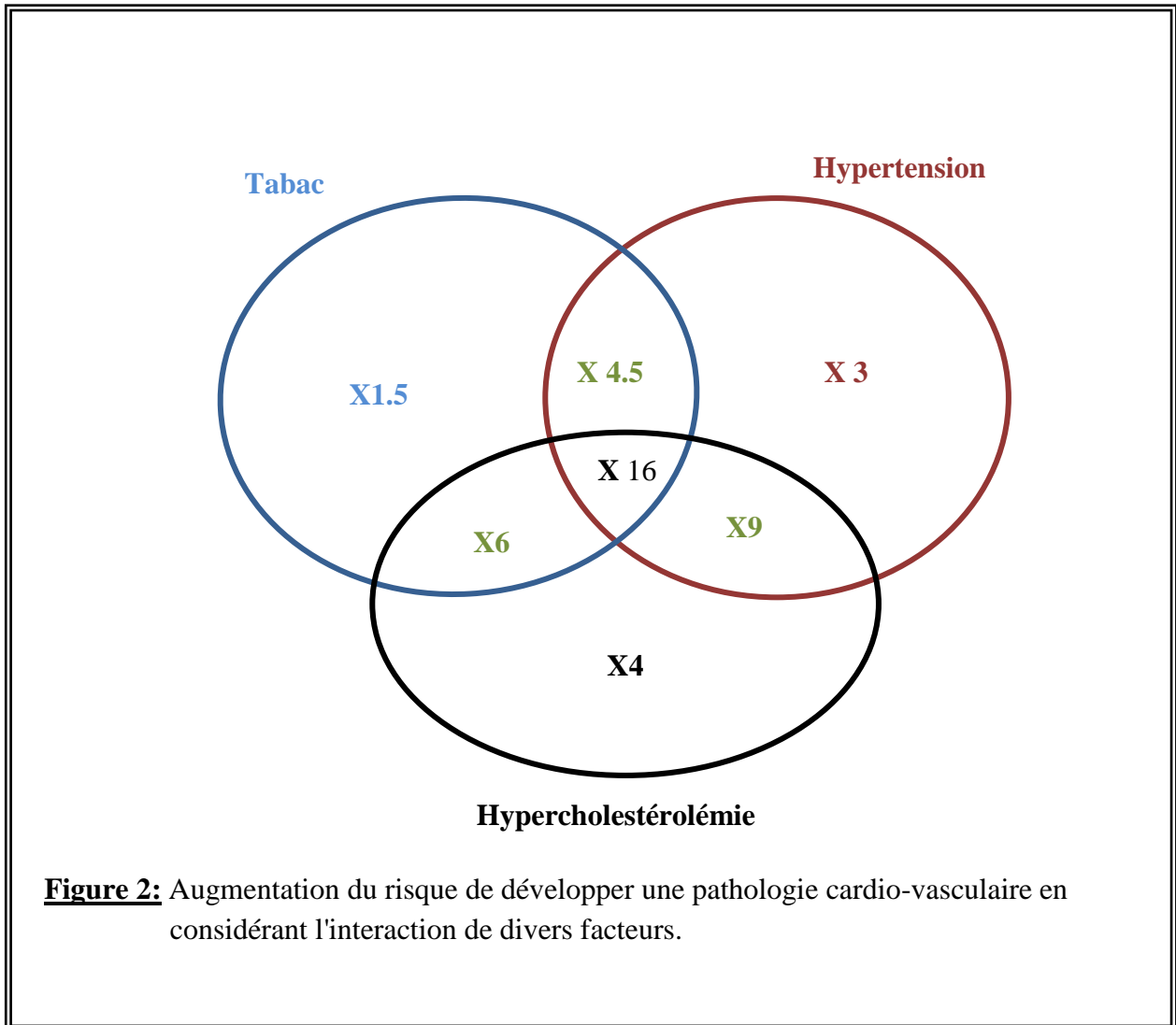
Ils sont divisés en deux types :

- ***Facteurs comportementaux :*** ils peuvent jouer un rôle de formes variables. Parmi ceux-ci on peut noter l'hypertension artérielle, le tabagisme, le diabète, l'hypertrophie cardiaque et les dyslipidémies.
- ***Facteurs métaboliques:*** Parmi ces facteurs on note le sédentarisme, le régime alimentaire, l'obésité, les facteurs psychosociaux, l'alcool, l'acide urique élevé et l'hypertriglycéridémie.

L'addition de chaque facteur chez un individu produit un effet cumulatif dans le risque de développer la maladie. Le tabagisme augmente de 1,5 fois le risque de développer la lésion athéromateuse, l'hypertension artérielle l'augmente 3 fois et l'hypercholestérolémie 4 fois. La présence cohérente d'une hypertension et d'une hypercholestérolémie augmentent la probabilité 9 fois et si nous incluons aussi le tabagisme, le risque peut être 16 fois plus grand (Figure 2).

Les dyslipidémies, et spécialement celles qui correspondent à l'augmentation d'un type particulier de protéines transporteurs de cholestérol dans le plasma, les LDL, s'associent à une grande prévalence d'athérosclérose (Goldstein *et al.*, 1973; Neaton *et al.*, 1992). Chez les populations à grand risque de développer cette maladie, la principale cause

d'augmentation de cholestérol sérique est un type particulier de l'hyperlipidémie : l'hypercholestérolémie, qui peut être mono ou polygénique (Durrington, 1989).



B. Hyperlipoprotéïnémies

Les hyperlipoprotéïnémies sont des stades physiologiques ou pathologiques dans lesquels se manifeste, en général, une élévation des taux des lipides plasmatiques. Elles peuvent être primaires (ou génétiques), si la cause est un dérangement propre du métabolisme lipidique ou des lipoprotéïnes, ou secondaires si l'élévation de lipoprotéïnes est secondaire à un autre désordre de l'organisme comme les diabètes, l'obésité ou syndrome néphrotique entre autres. Les hyperlipoprotéïnémies sont classées en six types selon les phénotypes qu'elles provoquent (Fredrikson et al, 1967) (Tableau 2):

– **Hyperlipoprotéïnémie de type I:** Elle se caractérise par une augmentation des concentrations de triglycérides (TG) et de chylomicrons (CM). Les concentrations des lipoprotéïnes de haute densité (HDL) et des lipoprotéïnes de basse densité (LDL) sont faibles ou diminuées. Elle résulte fondamentalement d'un défaut de l'action de la lipoprotéïne lipase (LPL), suite à la diminution de sa synthèse à cause de l'absence de son activateur ApoC_{II}.

– **Hyperlipoprotéïnémie de type IIa:** Elle se manifeste par une élévation plasmatique de cholestérol, avec un taux normal de TG. L'augmentation de cholestérol résulte d'une grande élévation des LDL, avec des valeurs de lipoprotéïnes de très basse densité (VLDL) et de HDL normales ou légèrement réduits. Elle est connue sous le nom de l'hypercholestérolémie et elle est due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux qui empêchent le transport correct des LDL, soit par défaut dans le récepteur des LDL (ce qui est connu sous le nom de l'Hypercholestérolémie Familiale, HF) soit dans son ligand apoB (connu sous le nom de Déficience Familiale en apoB-100, FBD). L'hyperlipoprotéïnémie la plus fréquente de ce type est l'Hypercholestérolémie polygénique.

– **Hyperlipoprotéïnémie de type IIb:** Elle se caractérise par une élévation importante des LDL et une modération des VLDL. Elle est très semblable à la précédente, mais présente une légère hypertriglycéridémie. Au sein de ce groupe se trouve l'Hypercholestérolémie Familiale combinée qui est une maladie autosomique dominante dans laquelle l'hypercholestérolémie n'est jamais si élevée comme dans la HF. Le défaut est dû à une surproduction de l'apoB-100 dans le foie et à une augmentation de VLDL.

Tableau 2: Classification de Fredrickson des hyperlipidémies (Fredrickson et al, 1967)

phénotype	Lipoprotéines élevées	Concentration plasmatique du cholestérol	Concentration plasmatique des triglycérides	athérogénicité	Pourcentage des hyperlipidémies
I	Chylomicrons	Normal à ↑	↑↑↑↑	Rarement observée	< 1%
IIa	LDL	↑↑↑	Normale	+++	10%
IIb	LDL et VLDL	↑↑↑	↑↑	+++	40%
III	IDL	↑↑	↑↑	+++	<1%
IV	VLDL	Normal à ↑	↑↑↑	+	45%
V	VLDL et chylomicrons	↑	↑↑↑↑	+	5%

– **Hyperlipoprotéinémie de type III:** Elle se manifeste par une augmentation de TG et de cholestérol total et une composition altérée des VLDL. Les individus portant ce phénotype sont homozygotes (HMZ) pour une isoforme de l'apoE: l'apoE₂. La manifestation de cette maladie nécessite la présence d'autres altérations du métabolisme protéique ou une hyperlipoprotéinémie secondaire.

– **Hyperlipoprotéinémie de type IV:** Elle est caractérisée par l'augmentation de VLDL et de TG. Les taux de CM et de LDL sont constamment normaux. L'étiologie de ce type d'hyperlipoprotéinémies est très diverse, commence à partir d'une surproduction de VLDL et peut arriver jusqu'à une incapacité de leur métabolisme.

– **Hyperlipoprotéinémie de type V:** Elle se manifeste par l'augmentation de TG, de VLDL et de CM, alors que les taux de HDL et de LDL sont bas.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux hyperlipoprotéinémies, en particuliers les hypercholestérolémies, qui se caractérisent par une augmentation des LDLc et présentent un grand risque de provoquer les maladies cardiovasculaires.

1. Les hypercholestérolémies :

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur d'athérosclérose, problème important de santé publique des pays industrialisés (Varret et al, 1997 ; Abifadel et al, 2006 ; Leren et al, 2008 ; varret et al, 2008). Le cholestérol total représente l'ensemble du cholestérol présent dans toutes les lipoprotéines. Il existe un lien très fort entre la quantité du cholestérol porté par les lipoprotéines LDL et le risque de pathologie cardiovasculaire, notamment coronarienne.

1.1. Transport du cholestérol :

Le cholestérol est transporté dans le sang sous forme de lipoprotéines qui sont des particules globulaires avec une partie intérieure de nature hydrophobe constituée par les lipides apolaires (esters de cholestérol et triglycérides) couverte d'une monocouche de lipides amphipatiques (phospholipides et cholestérol libre) dans laquelle se trouvent des protéines spécifiques qui s'appellent apolipoprotéines. L'union des lipides du noyau à la superficie externe des phospholipides et les apolipoprotéines est covalente, ce qui permet les échanges des lipides et des apolipoprotéines entre les différentes lipoprotéines et entre elles et les tissus. Différents types de lipoprotéines ont été identifiées dans le plasma dont les principales sont les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui à leurs tours comprennent

deux sous-fractions, HDL₂ et HDL₃. Ces fractions se différencient par leurs caractéristiques fonctionnelles et notamment par leurs implications cliniques (Durrington, 2007). Ces lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité qui diffère selon la proportion de lipides et de protéines qui les constituent. Le tableau 3 montre que les CM et les VLDL sont des lipoprotéines riches en triglycérides, bien que leurs origines soient différentes : du régime alimentaire dans le cas des CM et de la synthèse endogène dans le cas des VLDL. Les HDL sont ceux qui contiennent la faible proportion de cholestérol, et les LDL sont ceux qui portent le plus de cholestérol, ils peuvent transporter 70% du cholestérol plasmatique (Hogue, 2004). Les lipoprotéines jouent un rôle fondamental dans tout le métabolisme lipidique et il est bien connu que l'augmentation de cholestérol plasmatique augmente le risque des maladies cardiovasculaires (Grundy, 1997 ; Lambert, 2004 ; Leren et al, 2008 ; Varret et al, 2008).

Tableau 3: Composition de différents types de lipoprotéines (Hogue, 2004)

Classe de lipoprotéines	Protéine total (%)	Lipide total (%)	Composition de la fraction lipidique en pourcentage			
			Phospholipides	Cholestérol estérifié	Cholestérol non estérifié	Triglycérides
HDL ₂	40-45	55	35	12	4	5
HDL ₃	50-55	50	20-25	12	3-4	3
LDL	20-25	75-80	15-20	35-40	7-10	7-10
IDL	15-20	80-85	22	22	8	30
VLDL	5-10	90-95	15-20	10-15	5-10	50-65
CM	1,5-2,5	97-99	7-9	3-5	1-3	84-89

Classe de lipoprotéine	Principales apolipoprotéines
HDL	A _I , A _{II} , E
LDL	B ₁₀₀
IDL	B ₁₀₀ , E
VLDL	B ₁₀₀ , C _I , C _{II} , C _{III} , E
CM	A _{GLI} A _{IV} , B ₄₈ , C _I , C _{III} , E

1.1.1. Transport exogène:

Sa fonction est d'amener les lipides alimentaires (de provenance exogène) aux tissus pour la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules de lipide (Figure 3).

Les lipides alimentaires sont hydrolysés dans le petit intestin et sont absorbés par les cellules épithéliales intestinales. Les lipides y seront ré-estérifiés et seront assemblés à l'aide de l'apo B-48 pour former des CM. L'apo B-48 est nécessaire à la formation des CM et elle est obtenue des premiers 48% de l'apo B-100 par épissage de l'ARN messager (Olofsson et al, 2000). Les CM sont excrétés dans la lymphe et se retrouvent dans la circulation sanguine. Au niveau des muscles et du tissu adipeux, les TG contenus dans les CM sont hydrolysés en acides gras libres par la lipoprotéine lipase (LPL) intestinale et pancréatique pour stockage ou production d'énergie (Charlton-Menys et al, 2008). L'apo C-II contenue dans les CM active la LPL, alors que l'apo C-III en diminue l'activité. C'est donc le ratio entre l'apo C-II et l'apo C-III qui déterminera la rapidité à laquelle le CM sera transformé en résidu de CM. Puisque seuls les TG ont été hydrolysés, le résidu sera enrichi en EC et en apo E. Il est à noter que l'apo A-I, A-IV, CII, C-III et E peuvent subir des échanges avec les autres classes de lipoprotéines et, si elles sont relâchées en circulation, elles peuvent servir de constituants de base pour la formation des HDL naissantes. Les résidus de CM sont captés au niveau du foie via le LDLR et la protéine apparentée au LDLR (LRP). Habituellement, il ne reste que des taux très bas de CM en circulation après environ 12 heures suivant un repas (Gagné et Gaudet, 1997; Redgrave, 1999; Packard et Shepherd, 1999; Charlton-Menys et al, 2008).

1.1.2. Transport endogène:

Ce processus schématise le transport des lipides endogènes, du foie aux tissus périphériques (Figure 3). Quelques heures suivant un repas, lorsque la quantité de CM en circulation est faible, les besoins en TG des tissus périphériques sont assurés par les lipides synthétisés par le foie ou transitant par celui-ci, qui sont alors acheminés par les VLDL. De la même manière que les CM, les VLDL seront hydrolysées par la LPL dans les capillaires et l'activité LPL sera modulée par le ratio apo C-II/apo C-III. Les acides gras libérés par ces lipases serviront alors de source d'énergie. Les résidus des VLDL, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), subiront l'hydrolyse de leurs TG par l'action de la lipase hépatique (LH), menant ainsi à la particule LDL fortement enrichie en ester de cholestérol (EC). La LH peut aussi hydrolyser les TG restant dans la particule LDL.

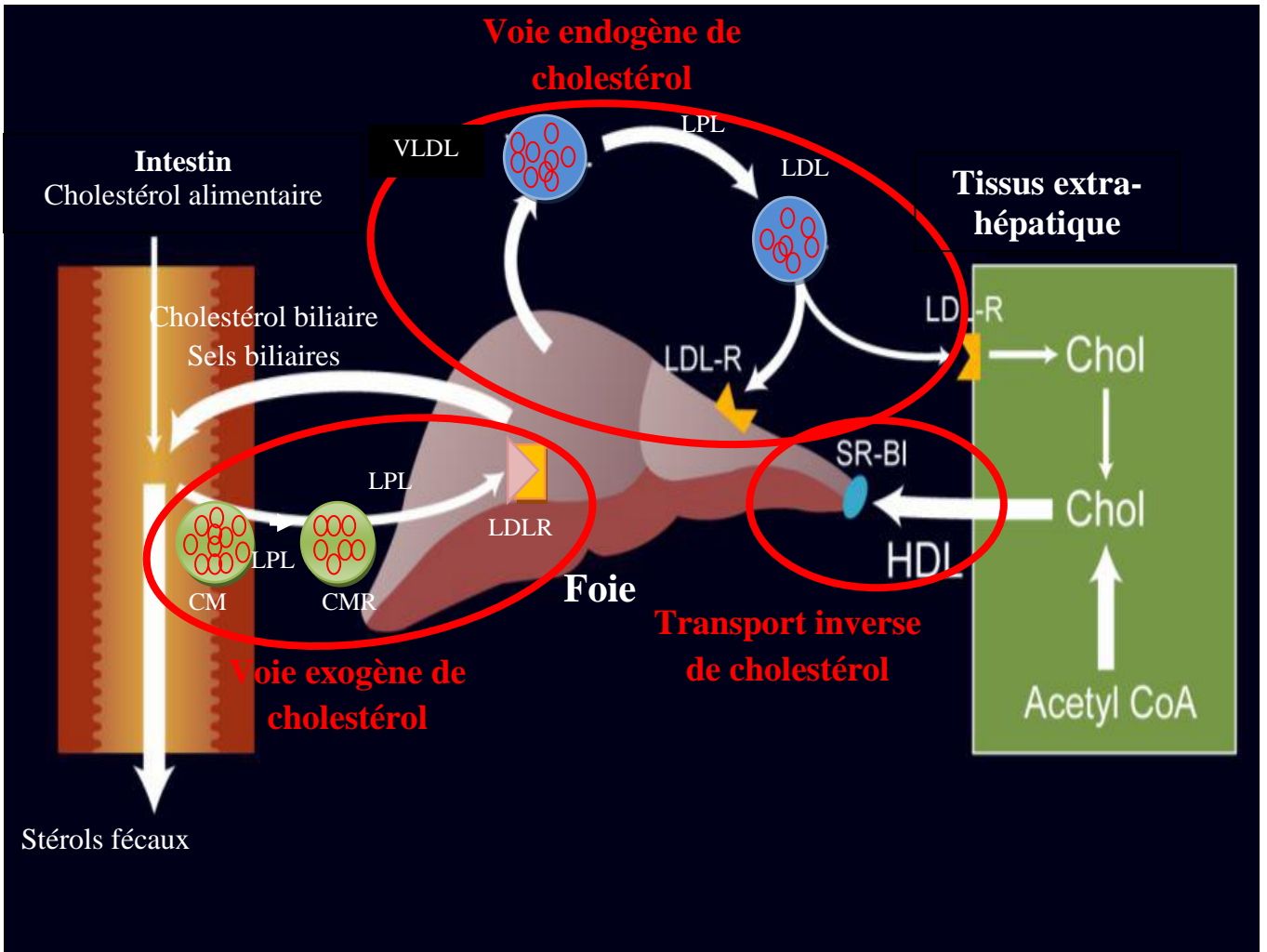


Figure 3 : Voies de transport de cholestérol (Daniels et al, 2009)

La lipase endothéliale (LE) est aussi capable d'hydrolyser les TG contenus dans les lipoprotéines contenant l'apo B-100 (Olofsson et al, 2000), mais cet aspect de cette lipase n'a été que récemment décrit (Broedl et al, 2004). Aussi, en cours de route, les apo des VLDL sont perdues, soit par échange ou soit par libération dans le plasma, et il ne reste alors qu'une seule molécule d'apo B-100, nécessaire au maintien de l'intégrité du LDL. La lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) peut agir sur les LDL pour estérifier le CL qu'elles contiennent. La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) peut échanger des EC contre des TG entre différentes classes de lipoprotéines : des EC des HDL contre des TG des LDL, VLDL et IDL; et des EC des LDL contre des TG des IDL et des VLDL. Les LDL seront retirés de la circulation par le LDLR qui reconnaît l'apo B-100. Leur demi-vie moyenne des LDL est d'environ 2.7 jours. Ce temps peut être augmenté dans le cas de pathologies diminuant la clairance des LDL, comme l'HF (Gagné et Gaudet, 1997; Redgrave, 1999; Packard et Shepherd, 1999; Goldstein et al, 2000; Charlton-Menys et al, 2008).

1.1.3. Transport Inverse du Cholestérol:

Cette voie de transport du cholestérol joue un rôle important dans la protection contre l'athérosclérose. Selon plusieurs modèles, les HDL captent le cholestérol libre des cellules périphériques pour le transporter au foie pour son élimination (Figure 3). Les apolipoprotéines formant la partie protéique de HDL sont synthétisées par le foie et l'intestin et proviennent également de l'hydrolyse des CM et des VLDL par les lipases, qui relâchent alors des constituants en circulation. Les lipoprotéines (PL) composants les HDL proviennent principalement des autres lipoprotéines lors de leur hydrolyse. La HDL reçoit du CL et des EC des autres lipoprotéines lors de leur hydrolyse, mais aussi via le récepteur SR-B1 et le transporteur *ATP-binding cassette A1* (ABCA-1) (Attie et al, 2001). Le CL est alors estérifié par la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT). Au fur et à mesure que la HDL reçoit du cholestérol, sa taille augmente, passant de la classe HDL₃ à la classe HDL₂. Les EC peuvent par la suite être échangés contre des TG entre les HDL et les lipoprotéines contenant l'apo B-100 sous l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (Barter et al, 2003). Les EC ainsi transférés aux LDL et aux VLDL retourneront alors au foie via le LDLR. La HDL sera capté par un récepteur SR-B1 du foie ou d'un tissu stéroïdogénique auquel il donnera son cholestérol. Il est important de noter que la HDL n'est pas internalisée par SR-B1; après avoir livré ses EC, la HDL se retrouve à nouveau en circulation et redevient disponible pour recevoir des EC.

La lipase hépatique (LH) est capable d'hydrolyser les TG contenus dans la HDL. Dans le foie, le cholestérol sera transformé en sels biliaires ou sera directement excrété dans la bile, alors que dans les tissus stéroïdogéniques, le cholestérol sera transformé en hormones stéroïdiennes (Pownall et Gotto, 1999 ; Eisenberg, 1999; Tall et al, 2002). L'apoAI dissociée est éliminée par les reins, et peut servir de précurseur de HDL ou s'associer à une HDL mature.

1.1.4. Régulation de l'apport du cholestérol:

La régulation de l'apport du cholestérol se fait par :

- *L'enzyme Hydroxymethyl-glutaryl-CoenzymeA réductase (HMG-CoA réductase) :* catalyse la première étape de la synthèse endogène de cholestérol, par lequel l'hydroxymethylglutaryl-CoenzymeA (HMG-CoA) formé à partir de l'acetyl-CoenzymeA est réduit en acide mévalonique.
- *L'enzyme Acétyl-Coenzyme A-acyl transférase (ACAT) :* catalyse l'estérification intracellulaire de cholestérol,
- *Récepteur des LDL (LDLR) :* internalise les LDL présents dans le plasma, qui dans les lysosomes se séparent en ses composantes, en laissant le cholestérol qu'ils transportent à l'intérieur de la cellule.

1.2. Hypercholestérolémies à transmission autosomique dominante (ADH) :

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'hypercholestérolémie est l'un des principaux facteurs de risque d'athérosclérose, première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés et en voie de développement (Goldstein et Brown, 1989). L'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante (ADH, OMIM#143890) est la plus fréquente et la plus sévère des hypercholestérolémies monogéniques. Elle se traduit par des concentrations plasmatiques élevées en cholestérol véhiculé par des lipoprotéines de basse densité (LDL). Ces lipoprotéines se caractérisent par la présence d'une seule apolipoprotéine : l'apolipoprotéine B100 (apoB-100). Le signe clinique le plus marquant de cette maladie est l'apparition des xanthomes, qui sont des dépôts extravasculaires de cholestérol en excès (Jelassi et al, 2009). Il a été confirmé que l'hypercholestérolémie autosomique dominante

(ADH) est une maladie génétiquement hétérogène et associée aux déficits dans au moins trois gènes (Varret et al, 2008).

1.2.1. Aspects historiques:

L'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante (ADH) a une histoire riche dans le domaine de l'épidémiologie génétique. L'apparition simultanée, chez un patient, de xanthomes tendineux et de plaques d'athérome avait déjà été décrite avant le XXe siècle (Fogge, 1872 ; Fox, 1879 ; Lehzen et Knauss, 1889). À la fin des années 1930, les Norvégiens Thannhauser et Muller reconnaissaient le caractère héréditaire de l'hypercholestérolémie associée à des xanthomes et à des accidents cardiovasculaires prématurés. Dans les années 1940 et 1950, l'origine génétique de l'hypercholestérolémie familiale était confirmée par Wilkinson et Adlersberg. Mais ce n'est qu'au début des années 1960, par l'étude de grandes familles libanaises, que Khachadurian montra de façon définitive la transmission autosomique dominante et différencia, sur le plan clinique, les malades hétérozygotes des homozygotes (Khachadurian, 1964). A la même période, Fredrickson, Lees et Levy montrèrent que l'hypercholestérolémie familiale de type IIa (HF) était un désordre impliquant le métabolisme des apolipoprotéines et du cholestérol contenus dans les lipoparticules LDL (Fredrickson et al, 1967). Brown et Goldstein montrèrent, par leurs études sur des cultures de fibroblastes de patients homozygotes, que la protéine déficiente était un récepteur cellulaire qui fixait les LDL plasmatiques et réglait la dégradation et la synthèse du cholestérol : le récepteur LDL (Goldstein et al, 1973). Ils associèrent ce déficit à l'HF (hypercholestérolémie familiale; OMIM #143890), et estimèrent la fréquence des défauts du récepteur LDL à 1/500 pour les personnes à l'état hétérozygote et 1/1 000 000 pour les personnes à l'état homozygote (Austin et al, 2004a).

Par la suite, en 1987, Innerarity a relevé l'hétérogénéité génétique de l'ADH par rapport aux patients hypercholestérolémiques avec une activité normale du récepteur de LDL (Innerarity et al, 1987). Son travail sur ces patients a amené à la détection de la première mutation dans le gène *APOB*, qui code le principal ligand pour le LDL récepteur: apolipoprotéine B-100 (apo B-100) impliqué dans la fixation des particules LDL du sang (Soria et al, 1989). Ce nouveau désordre moléculaire est appelé déficience familiale en apolipoprotéine B-100 (FDB; OMIM #144010). Cependant, il a été montré que la contribution de ces déficits est moins que celle des mutations dans le gène *LDLR* (Varret et al, 2008). L'équipe de Varret avait lancé l'affirmation que l'ADH est très hétérogène et avait

identifié des familles ADH non liées à aucun des gènes *LDLR* ou *APOB* (Varret et al, 2008). Ils ont localisé, par analyse de liaison, le troisième gène majeur d'ADH (HCHOLA3) en 1p32-p34.1 (Varret et al, 1999 ; Hunt et al, 2000; Lambert, 2004) puis ils ont montré que HCHOLA3 est en fait la PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilysin Kexin 9) (NM_174936; OMIM #603776; #607786) (Abifadel et al, 2003). Ses mutations sont également associées à l'ADH comme une forme dominante de l'hypercholestérolémie (Barter et al, 2003, Abifadel et al, 2003 ; Cohen et al, 2005). La découverte de l'implication du gène *PCSK9*, qui apporte des éléments nouveaux dans la connaissance du métabolisme du cholestérol, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement de la maladie et, particulièrement, de la prévention de l'infarctus du myocarde.

1.2.2. Aspects cliniques et biologique de l'ADH :

Les principaux diagnostics cliniques et biologiques des ADH sont une élévation de la concentration de cholestérol dans le plasma, la présence de xanthes tendineux chez les patients ou au moins chez un de leurs parents de premier degré et des antécédents familiaux en maladie cardiovasculaire prématurée (MCVP) ou des taux de cholestérol plasmatique élevés. Cet aspect clinique et biologique peut être lié à un déficit au niveau de gène de récepteur des LDL qui détermine la maladie désignée par HF pour l'hypercholestérolémie familiale ; ou à un déficit au niveau de gène codant l'apoB-100 appelé FDB pour la déficience familial en apolipoprotéine B-100; ou au déficit de gène *PCSK9* codant pour la Proprotéine Convertase Subtilin/Kexin type 9.

1.2.2.1. Hypercholestérolémie Familiale (HF):

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie monogénique à transmission autosomique dominante caractérisée par une élévation de la concentration de cholestérol dans le plasma, présence de xanthes tendineux chez les patients ou au moins chez un de leurs parents de premier degré et des antécédents familiaux en maladie cardiovasculaire prématurée (MCVP) ou en hypercholestérolémie. L'origine de cette pathologie se trouve, dans la majorité des cas, dans des changements au niveau du gène codant le récepteur des LDL (le gène *LDLR*) qui peuvent l'empêcher de développer correctement sa fonction, et par conséquence, les LDL ne peuvent pas être éliminées de la circulation et leur concentration augmente dans le sang. Par ailleurs, puisque la cellule ne peut pas capter le cholestérol, les concentrations intracellulaires de cholestérol diminuent, elle réagit en augmentant la synthèse endogène du

cholestérol ce qui augmente la transcription du gène *LDLR* (mais cette augmentation n'est pas suffisante pour compenser l'effet des allèles mutés) et diminue l'estérification du cholestérol libre. Elle en résulte une augmentation du cholestérol libre intracellulaire, qui migre en partie à la circulation par l'intermédiaire des HDL. Le cholestérol est donc transféré depuis les cellules vers les LDL, ce qui provoque une augmentation des taux de cholestérol dans les LDL alors que les concentrations sanguines en cholestérol HDL (HDLc) et en triglycérides restent normales. L'excès de cholestérol se dépose au niveau des tendons ou de la peau entraînant la formation de xanthomes, au niveau de la cornée où ils forment des arcs cornéens, et au niveau des artères coronaires et de l'aorte où apparaissent des plaques d'athérome induisant des complications cardiovasculaires graves.

L'hypercholestérolémie familiale existe sous deux formes cliniques, les formes homozygotes (HMZ) et hétérozygotes (HTZ). Les formes de l'HF se différencient par l'âge d'apparition et par la gravité de l'atteinte (Jelassi et al, 2009). Les sujets hétérozygotes ont une cholestérolémie comprise entre 2,5 et 6 g/l; des xanthomes tendineux et/ou un arc cornéen sont présents dans 50 % des cas dès l'âge de 30 ans, et dans 80% des cas au moment du décès. En l'absence d'un traitement efficace et prolongé, les complications cardiovasculaires débutent dans 50 % des cas avant 50 ans chez l'homme et avant 60 ans chez la femme et sont présentes chez 85% des sujets masculins avant 60 ans ou féminins avant 70 ans (Jelassi et al, 2009). Les sujets homozygotes ont une cholestérolémie supérieure à 6 g/l et des signes cliniques dès l'enfance : Les xanthomes sont très fréquents et les dépôts athéromateux très importants. Ces patients souffrent très tôt d'infarctus du myocarde, au cours de la deuxième décennie. Les sujets homozygotes sont dépourvus de récepteurs LDL fonctionnels et leur fréquence dans le monde est de 1/1 000 000, alors que les sujets hétérozygotes, qui ont 50% de récepteurs LDL fonctionnels, sont présents à raison de 0,2 % dans les pays développés (Jelassi et al, 2009). Ces fréquences peuvent être beaucoup plus élevées et dépassent le 1/67 (Barter et al, 2003) dans les communautés où certaines mutations sont dues à un effet fondateur notamment chez les Africains en Afrique de Sud (Leitersdorf et al, 1989), les chrétiens libanais (Lerham et al, 1987) et les Canadiens français (Leitersdorf et al, 1990). Malgré cette fréquence élevée, elle reste encore sous-diagnostiquée dans la population générale et partiellement élucidée sur le plan génétique. Au Maghreb, des études effectuées en Tunisie ont montré que cette maladie touche un sujet sur 165 (1/165) à l'état hétérozygote. Cette élévation serait due essentiellement aux mariages consanguins et au nombre élevé de naissances, surtout dans les zones rurales (Slimane et al, 1993).

1.2.2.2. Déficience familiale en apo B 100 (FDB):

La déficience familiale en apolipoprotéine B-100 (*familial defective apoB-100*; FDB) est un désordre monogénique à transmission autosomique dominante due à des mutations dans le gène *APOB* localisé sur le chromosome 2 (2p23-p24) (Innerarity et al, 1990 ; Davignon et Dufour, 2007). L'apoB-100 est la seule apolipoprotéine associée aux LDL et représente le ligand du LDLR. Par conséquent, une mutation affectant l'affinité de l'apoB pour son récepteur en résulte une clairance retardée des particules de LDL-apoB avec un temps de séjour ~3,6 fois plus long que chez les sujets normolipidémiques (8,2 vs 2,3 jours) (Davignon et Dufour, 2007). Jusqu'à présent, 5 mutations du gène dans l'exon 26, codant pour le site de liaison au récepteur des LDL, peuvent causer cette condition : R3500Q (la première mutation commune identifiée), R3500W, R3531C, R3480W et T3492I (Davignon et Dufour, 2007).

La prévalence de la FDB varie largement d'un pays à l'autre, allant de 1/209 à 1/230 en Suisse à une absence totale chez les populations turques ou finlandaises. Chez les caucasiens des États-Unis et d'Europe, elle est en moyenne de 1:500 à 1:700 (Davignon et Dufour, 2007). Les caractéristiques cliniques de la FDB sont également très variables en fonction principalement de la sévérité de l'hypercholestérolémie et de la présence de facteurs génétiques et/ou environnementaux influençant le risque cardiovasculaire. Pourtant, le FDB ne peut pas être aisément distingué cliniquement de l'HF.

1.2.2.3. ADH liée au gène codant la protéine PCSK9 :

Les mutations localisées au niveau du gène *LDLR* et du gène *APOB* n'expliquent pas tous les cas de l'hypercholestérolémie autosomique dominante. L'étude des familles dont l'hypercholestérolémie n'était liée ni au gène *LDLR* ni au gène *APOB* a permis à l'équipe de Varret d'identifier dans une famille française un nouveau locus en 1p34.1-p32 ségrégeant avec l'HF (Varret et al, 1999). L'étude de nouvelles familles dont l'hypercholestérolémie est liée à ce locus a permis d'identifier le troisième gène impliqué dans l'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante : gène *PCSK9* (Abifadel et al, 2003). Le substrat ainsi que le rôle exact de cette protéase sont encore mal connus. Cependant certaines mutations du gène *PCSK9* sont responsables d'une hypercholestérolémie tandis que d'autres mutations sont associées à une diminution du cholestérol plasmatique. Par conséquent, le phénotype lié au déficit dans le gène *PCSK9* reste encore difficile à estimer (Jelassi et al, 2009) et la

comparaison clinique des porteurs de mutations du gène *PCSK9* avec les sujets de l'HF ou FDB est jusqu'à présent difficile à estimer puisque la plupart des porteurs de mutations du gène *PCSK9* ont été identifiés dans un échantillon choisi pour le diagnostic clinique de l'HF (Abifadel et al, 2003 ; Timms et al, 2004; Leren, 2004; Allard et al, 2005).

1.2.3. Aspect génétique de l'hypercholestérolémie autosome dominante (ADH).

A ce jour, les mutations responsables de l'ADH touchent trois gènes: le gène *LDLR*, le gène *APOB* et le gène *PCSK9*. Ces mutations sont distribuées sur les gènes avec les incidences suivantes : 67% des mutations du gène *LDLR*, 14% des mutations du gène *APOB* et 2.3% des mutations du gène *PCSK9*. 16.7% de mutations sont liés à d'autres gènes probables (Seidah et Prat, 2007).

1.2.3.1. Récepteur des LDL:

1.2.3.1.1. Structure et fonction de la protéine :

Le récepteur des LDL est une glycoprotéine composée de 839 acides aminés. Il se localise à la surface des hépatocytes et d'autres types de cellules où il lie et internalise les lipoprotéines plasmatiques : l'apo B ou l'apo E. Ainsi, le *LDLR* reconnaît les LDL, les IDL et les résidus de CM (Brown et al, 1981). L'affinité du *LDLR* est plus grande pour les lipoprotéines contenant l'apo E du fait que cette dernière est habituellement présente en plusieurs copies à la surface des IDL, alors que l'apo B-100 n'est présente qu'en une seule copie à la surface des LDL (Pitas et al, 1980). Même s'ils contiennent l'apo B-100, les VLDL et les Lp(a) sont de pauvres ligands du *LDLR*, probablement à cause de la conformation particulière que prend l'apo B-100 sur ces lipoprotéines (Soutar, 1999).

Le récepteur LDL est composé, fonctionnellement, de 5 domaines distincts qui peuvent fonctionner indépendamment les uns des autres (Soutar, 1999). De l'extrémité *N*-terminale au *C*- terminal sont:

- **Peptide signal:** Il se compose des 21 premiers acides aminés qui sont éliminés quand le récepteur se fixe à la membrane de réticulum endoplasmique.

- **Domaine d'union du ligand:**

Il se compose de 292 résidus d'acides aminés (après élimination du peptide signal). Il est formé par 7 répétitions de 40 acides aminés chacune nommée répétition de type A du

LDLR (LA) (Figure 8). Chaque répétition, qui contient 6 cystéines formant 3 ponts disulfures, contribue de forme différente à l'union des ligands (Russell *et al*, 1989).

– **Domaine d'homologie au précurseur du facteur de croissance épidermique humaine (EGF):**

Il se compose de 400 résidus d'acides aminés. On trouve trois répétitions de 40 acides aminés riches en cystéine, qui sont différentes de celles qui sont observées dans le domaine d'union. Les deux premières répétitions *EGF-like* sont fortement liées et sont séparées de la troisième par 280 acides aminés constituant le motif YWTD (nommé ainsi pour les résidus tyrosine, tryptophane, thréonine et aspartate). Ce domaine a une double fonction: la dissociation, qui se produit à pH acide (pH=5.0), des lipoprotéines liées au LDLR durant le recyclage du récepteur et la facilitation de la disposition correcte du domaine d'union sur la surface cellulaire, de façon à ce qu'il puisse unir les lipoprotéines correspondants (Davis *et al*, 1987 et Hogue, 2004).

– **Domaine de glycosylation:**

Il se compose de 58 résidus d'acides aminés, riches en Sérine et Thréonine, qui servent de sites d'union aux chaînes d'*O*-oligosaccharides. La fonction de ce domaine n'est pas très bien connue bien que l'on pense qu'il joue un rôle spécifique dans la fonction du récepteur dans le foie. La localisation exacte de chaque chaîne n'est pas connue, mais 16 d'entre elles sont groupées dans une zone et les deux restantes dans une autre, ce qui peut influencer la stabilité de la protéine.

– **Domaine transmembranaire:** il se compose de 22 résidus d'acides aminés hydrophobes, qui traversent la membrane plasmique de la cellule.

– **Domaine cytoplasmique:** il se compose de 50 résidus d'acides aminés. Ce domaine contient une séquence NPxY qui dirige le récepteur vers les puits de clathrine (Davis *et al*, 1986 et Hogue, 2004) et aussi une séquence requise pour diriger le récepteur vers la membrane basolatérale dans les cellules polarisées.

1.2.3.1.2. Synthèse et cycle du récepteur des LDL:

La Figure 4 présente le cycle de synthèse/recyclage du LDLR. Le récepteur des LDL est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux sous la forme d'un précurseur qui subit une maturation dans l'appareil de Golgi où il subit des changements dans sa conformation moléculaire, en changeant sa mobilité électrophorétique. Le récepteur migre à la surface de la cellule. L'intervalle entre la synthèse et l'arrivée dans l'appareil de Golgi dure en

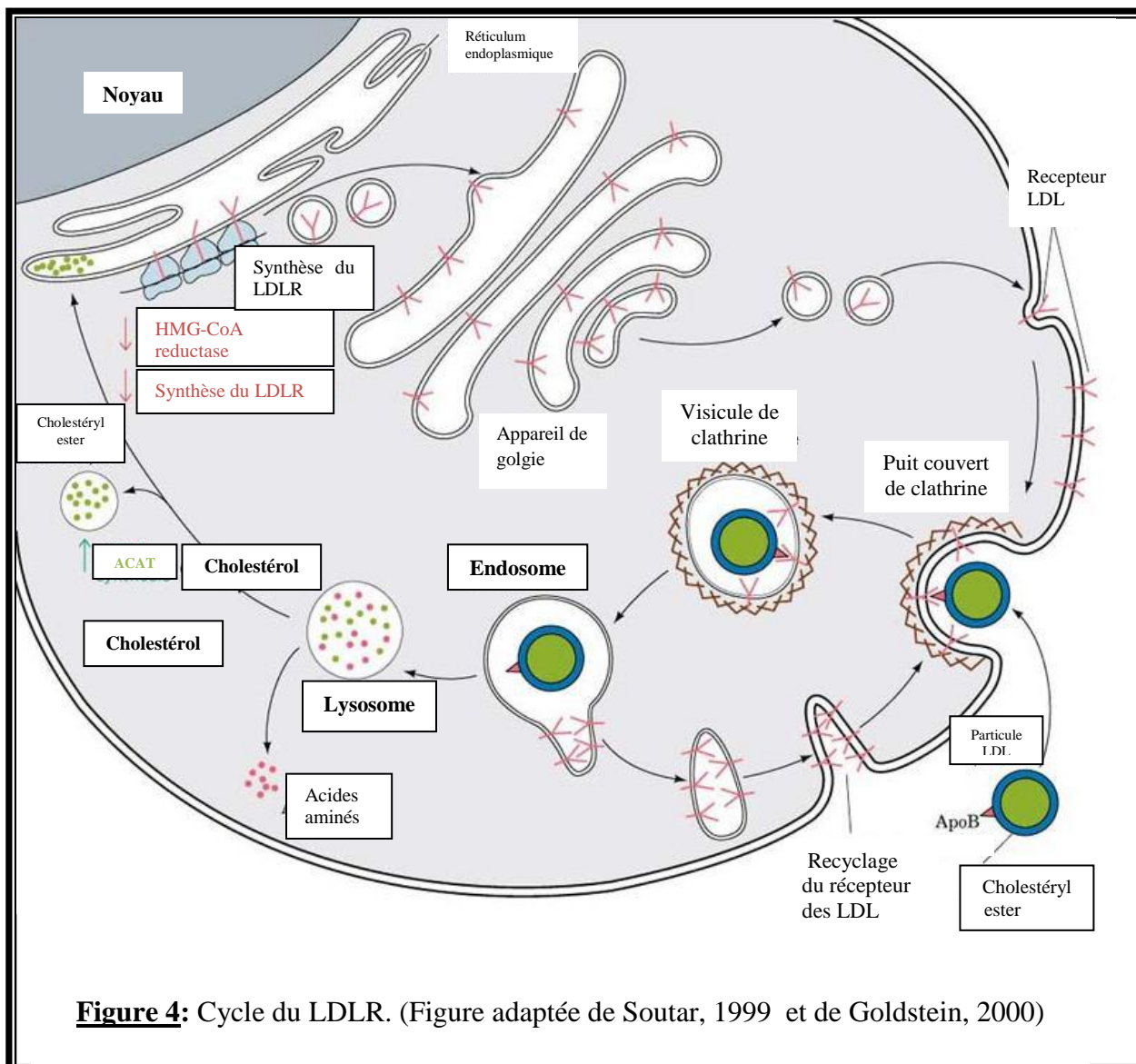


Figure 4: Cycle du LDLR. (Figure adaptée de Soutar, 1999 et de Goldstein, 2000)

moyenne 45 minutes. A l'intérieur de la cellule, le récepteur fixe une lipoparticule LDL, puis le complexe LDL/récepteur-LDL migre dans un puit couvert de clathrine où il est internalisé par endocytose. Dans l'endosome, les pompes protoniques ATP-dépendant baissent le pH du liquide fermé et le complexe LDL/ LDLR se dissocie. Là, le récepteur des LDL quitte l'endosome et migre à la surface cellulaire où il est recyclé. Il s'associe avec d'autres récepteurs après un passage dans l'appareil de Golgi. Ce recyclage des récepteurs des LDL est fortement dépendant de la clathrine qui est essentielle pour l'arrivée du récepteur dans les puits de la membrane cellulaire. Le cycle entier prend environ 10 minutes (Charlton-Menys et al, 2008). Le cholestérol obtenu par la dégradation de la lipoprotéine peut être immédiatement utilisé ou estérifié pour stockage (Goldstein et al, 2000).

La synthèse du LDLR est soumise à un processus de contrôle par rétroinhibition qui a pour principal rôle de stabiliser la composition lipidique des membranes cellulaires (Goldstein et al, 2000). Le cholestérol intracellulaire est le principal agent contrôlant l'expression du LDLR. Ainsi, si la cellule manque de cholestérol, elle synthétisera des récepteurs afin d'aller chercher le cholestérol manquant en circulation (Hogue, 2004).

1.2.3.1.3. Structure du gène Récepteur LDL :

Le gène codant pour le LDLR a une taille d'environ 45kb. Il comprend 18 exons et 17 introns qui sont édités pour produire un ARN messager d'environ 5.3 kb (Brown et Goldstein, 1986). Il est situé sur le bras court du chromosome 19 (localisé en 19p13.1-13.3). La région promotrice permet l'activation ou l'inhibition de la transcription au moyen de l'union des protéines spécifiques qui règlent l'activité du complexe de transcription. Elle comprend 250 pb dans la direction 5' depuis l'initiation de la traduction. Elle contient la séquence TATA essentielle pour l'initiation de la transcription et trois répétitions imparfaites de 16 pb. La première et la troisième répétition sont des zones d'union de l'activateur de la transcription Sp1 (Goldstein et Brown, 1990) et sont essentielles pour la transcription du gène, mais elles ne peuvent pas, à elles seules, produire une expression élevée du gène. Elles ont besoin de la contribution de la deuxième répétition, qui contient une séquence de la réponse aux stérols dénommée SRE-1 (Smith et al ; 1990). Cette séquence est présente aussi sur les promoteurs des gènes HMG-CoA réductase et synthétase. En l'absence de stérols, la protéine SREBP-1 s'unit à la séquence SRE-1 pour activer la transcription du gène LDLR et la réprime en leur présence. Cette deuxième répétition est fondamentale pour la régulation par l'intermédiaire des stérols (Assouline et al, 1998).

Les exons du gène sont en corrélation avec les domaines fonctionnels de la protéine (Figure 5) :

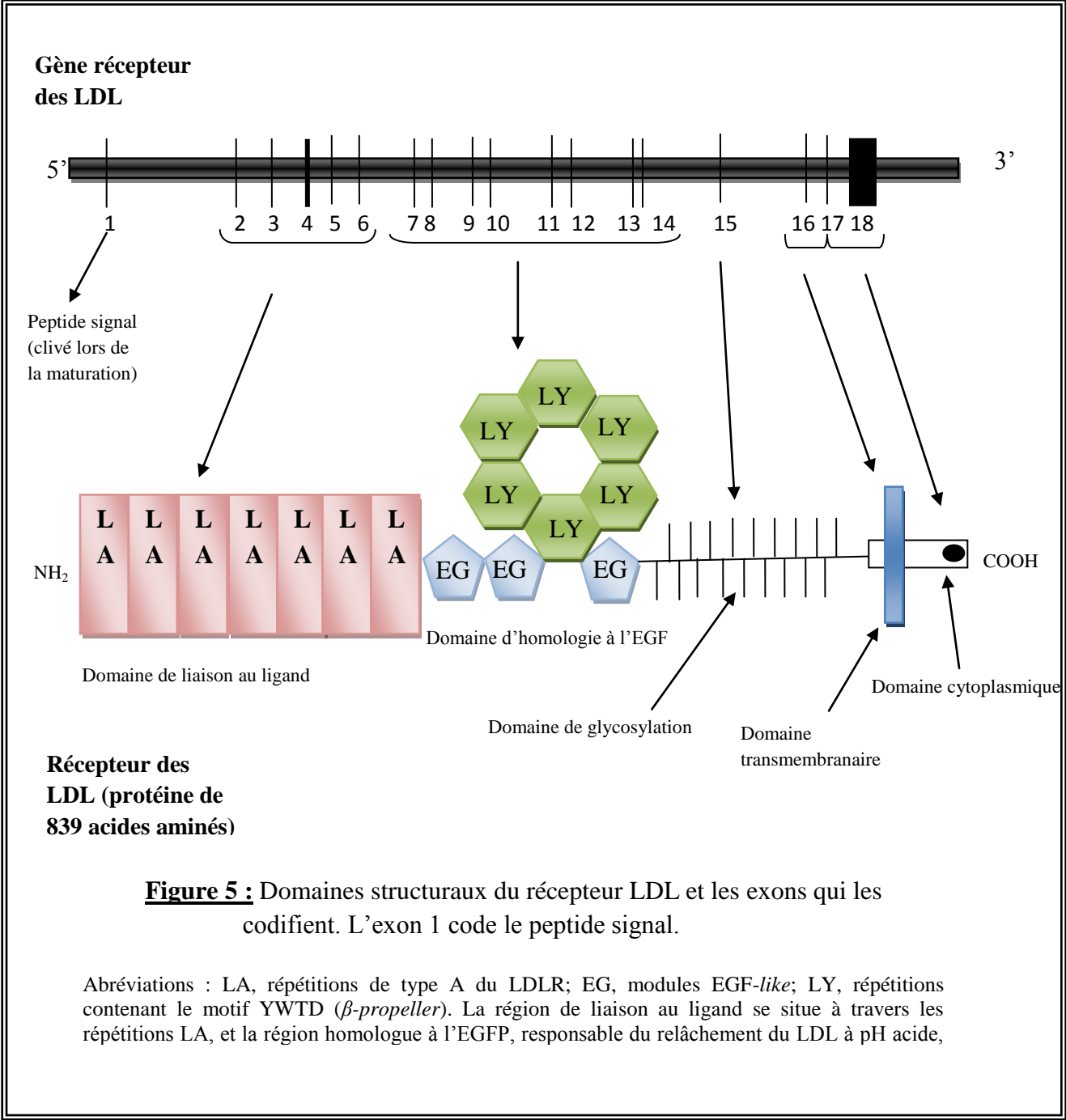
- **Exon 1:** Code pour le domaine de peptide signal formée d'une suite de 21 acides aminés hydrophobes essentiels à la translocation de la protéine naissante dans le réticulum endoplasmique.
- **Exons 2 à 6:** Codent pour le domaine d'union.
- **Exons 7 à 14:** Codent pour le domaine d'homologie au précurseur du facteur de croissance épidermique (EGF) humain.
- **Exon 15:** Code pour le domaine de glycosylation
- **Exon 16 et partie de l'exon 17:** Codent pour le domaine transmembranaire.
- **Reste de l'exon 17 et partie de l'exon 18:** codent pour le domaine cytoplasmique.

L'exon 18 ne se traduit pas à partir du nucléotide 2581 (selon la numération de Yamamoto et al, 1984) et il contient trois séquences Alu entre les nucléotides 3704 et 4465.

1.2.3.1.4. Mutations du gène *LDLR* :

Le nombre de mutations touchant le gène *LDLR* augmente continuellement depuis sa découverte. Actuellement, 1700 mutations touchant ce gène ont été rapportées dans le monde entier (Akl et Georges, 2011). Ces mutations sont représentées dans la base de données de l'université de London : (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>).

Les premières mutations du gène *LDLR* qui ont été décrites, étaient essentiellement des larges délétions identifiées par la technique Southern blot. Le développement de la technique d'amplification enzymatique *in vitro* (PCR) et du séquençage automatique a considérablement augmenté le nombre des mutations ponctuelles et des réarrangements mineurs (insertion/délétion). La nouvelle technique de détection des réarrangements majeurs des gènes (la technique MLPA: multiplex ligation dependant probe amplification) a permis la détermination de nouvelles mutations de ce type (Soutar et Naoumova, 2007). Les mutations de substitutions et de réarrangements mineurs d'ADN sont répertoriées le long du gène *LDLR*, 20 % d'entre elles touchent l'exon 4 (Jelassi et al, 2009). Le séquençage récent a permis l'identification d'une grande proportion de mutations d'épissage (Graham et al, 2005). On note que la majorité des points de cassure de l'ADN sont localisés au niveau des introns 1, 6, 8 et 15 (Leigh et al, 2008).



Les mutations du gène *LDLR* rapportées dans les différentes populations sont traditionnellement classées selon un critère fonctionnel en cinq groupes selon l'étape du cycle du LDLR qu'elles affectent (Hobbs et al, 1990) :

– **Mutations de classe 1:** Allèles nuls; la protéine immunoprécipitable ne se produit pas (Goldstein et al, 2000). Les cellules porteuses d'une mutation de classe 1 démontrent une activité du LDLR inférieure à 2% de l'activité normale.

– **Mutations de classe 2:** Allèles avec défaut de transport. Le récepteur est synthétisé, mais son passage du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi est complètement aboli (classe 2A) ou fortement ralenti (classe 2B) (Goldstein et al, 2000). Ainsi, le récepteur est parfois dégradé avant même d'atteindre la surface de la cellule.

– **Mutations de classe 3:** Allèles avec défaut de liaison au ligand. Les protéines sont produites et transportées normalement, mais sont incapables de lier correctement le ligand, soit l'apo B ou l'apo E. Ces mutations sont généralement causées par des insertions ou des délétions qui ne changent pas le cadre de lecture lors de la traduction (Goldstein et al, 2000).

– **Mutations de classe 4:** Allèles avec défaut d'internalisation. Les LDLR ne se localisent pas dans les puits couverts de clathrine après avoir lié le ligand. Ainsi, le complexe LDLR /ligand ne peut être internalisé dans la cellule. Toutes les mutations de classe 4 touchent les exons 16, 17 et 18. Lorsque seul le domaine cytoplasmique de la protéine est touché, la mutation est classée 4A, et si le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique sont tous les deux touchés, la mutation est classée 4B (Goldstein et al, 2000).

– **Mutations de classe 5:** Allèles avec défaut de recyclage; Les récepteurs lient et internalisent normalement les lipoprotéines liées, mais la dissociation du complexe LDLR /ligand ne se produit pas, ce qui empêche le recyclage du récepteur à la surface de la cellule (Varret et al, 2008).

1.2.3.2. Gène *APOB* :

L'apolipoprotéine B (apoB) est la principale apolipoprotéine de LDL qui est responsable de transport de cholestérol vers les tissus. Bien que le rôle fonctionnel de l'apoB dans le LDL ne soit pas connu, elle est sa principale composante et elle est absolument nécessaire pour sa formation. L'apoB agit, dans les différentes cellules du corps, sur les particules LDL comme ligand de récepteurs LDL. Par un mécanisme qui n'est pas complètement connu, des taux élevés d'apoB peuvent conduire à la formation des plaques qui causent les maladies vasculaires (athérosclérose), principalement la maladie cardiaque.

1.2.3.2.1. Structure et fonction de la protéine apoB :

La protéine apoB existe sous deux formes dans l'organisme. L'apoB-100 (550 kDa) s'exprime seulement dans le foie bien qu'il y ait des évidences qu'il peut aussi s'exprimer dans le muscle cardiaque (Nielsen *et al.*, 1998 et Lars *et al.*, 1999). Elle se trouve dans les VLDL et les résidus de chylomicrons, IDL et LDL. L'apoB-48 (265 kDa) s'exprime seulement dans l'intestin et elle se trouve dans les chylomicrons (CM). Les deux formes d'apoB sont codées par le même gène *APOB*. L'apoB-48 résulte d'un processus unique de transcription du gène dans lequel la cytosine en position 6666 est convertie en uracile, produisant ainsi un codon stop (Chen *et al.*, 1987 ; Burnett *et al.*, 2003).

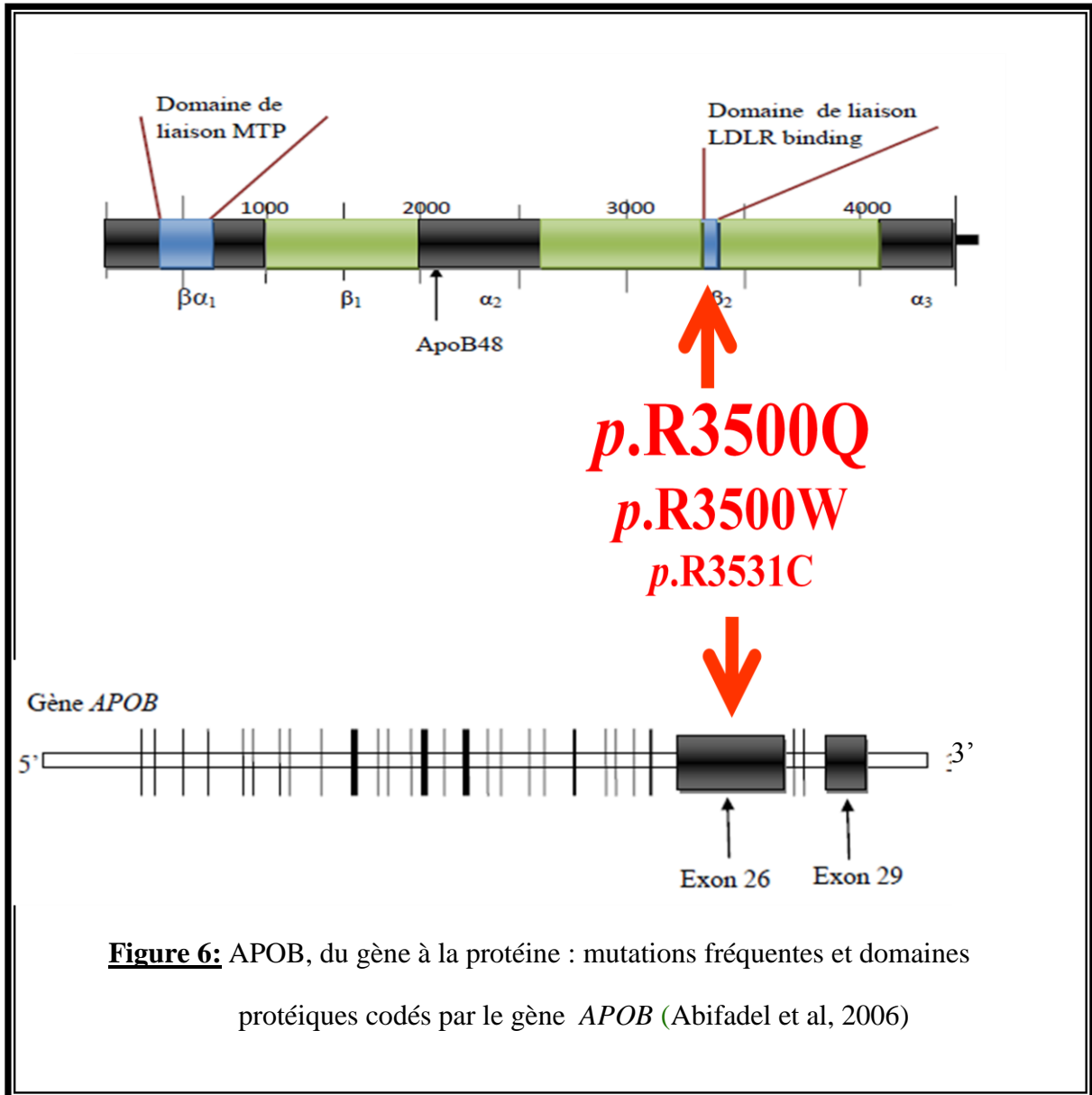
À cause de sa grande taille susceptible de former des agrégats insolubles dans les solutions aqueuses, et sa sensibilité à la dégradation protéolytique, la structure principale d'apoB n'a été élucidée que jusqu'à 1986 (Chen *et al.*, 1986). L'apoB contient des régions hydrophobes pour la liaison des lipides et des régions hydrophiles qui agissent réciproquement avec l'environnement aqueux de plasma. Ces régions sont arrangées sous forme d'une série d'hélices- α amphipathiques et de domaines β -sheet : NH_2 - $\beta\alpha_1$ - β_1 - α_2 - β_2 - α_3 -COOH (Segrest *et al.*, 2001) (Figure 6).

L'apoB-48 comprend les deux premiers domaines. Le domaine- $\beta\alpha_1$ se compose des 1000 premiers acides aminés de l'apoB. C'est le domaine qui se lie à la Protéine Microsomal de Transfert de Triglycérides (MTP) au cours de l'assemblage de l'apoB. Les domaines β_1 et β_2 sont associés irréversiblement aux lipides du noyau de la lipoprotéine. Les hélices- α des domaines α_1 et α_2 se lient aux lipides externes.

Le domaine de liaison de récepteur des LDL est localisé dans la portion carboxyl-terminale de l'apoB, spécialement, les résidus 3359–3369 (le site B) (Boren *et al.*, 1998).

1.2.3.2.2. Structure du gène *APOB* :

Le gène *APOB* a une taille d'environ 43 kb. Il est localisé sur le bras court du chromosome 2. Il est composé de 29 exons de tailles variables : 32pb de l'exon 2 à 7500 pb de l'exon 26 qui code pratiquement la moitié de la protéine (Amanda *et al.*, 2004 et John *et al.*, 2003) (Figure 6).



L'exon 26 a la plus grande taille

L'organisation des cinq domaines structuraux de la protéine apoB-100: $\beta\alpha_1$ - β_1 - α_2 - β_2 - α_3 .
 Les positions des domaines de liaison de la MTP et LDLR sont aussi indiquées.
 La flèche indique la taille de l'apoB-48.

1.2.3.2.3. Mutations du gène *APOB* :

Malgré la grande taille de la protéine ApoB100, les mutations décrites responsables de l'hypercholestérolémie se restreignent à la zone d'union au récepteur des LDL.

En 1995, Pullinger, Nissen et Gaffney ont montré que le FDB est hétérogène et n'est plus restreint aux mutations p.R3531C, p.R3480P et p.R3500W dans le gène *APOB* (Varret et al, 2008). Jusqu'à présent, le spectre des mutations du gène *APOB* est incomplet (Akl et Georges, 2011). Cependant, plus de 10 mutations sont décrites sur le gène *APOB* responsables de FDB (Nora et al, 1985; Innerarity et al, 1990 ; Williams et al, 1993; Defeche, 2000 ; Marks et al, 2003; Cohen et al, 2005; Rashid et al, 2005 et Lagace et al, 2006 ; Varret et al, 2008). Les mutations identifiées jusqu'à nos jours sur le gène *APOB* sont situées sur les exons 26 et 29:

Sur l'exon 26 :

- Mutation *p.R3480P*: cette mutation provoque une substitution du résidu arginine en position 3480 par la proline. Elle est détectée par Nissen *et al.* en 1995. La mutation *p.R3480W* qui est une substitution de l'arginine en tryptophane se produit sur la même position 3480 (Boren et al, 2001). La mutation *p.R3480W* est associée au FDB à cause de sa proximité de tryptophane 4369 qui interagit avec l'arginine 3500 et facilite la conformation de l'apo B-100 pour la liaison normale de récepteur LDL (Boren et al, 2001). Cependant, l'effet causatif de la mutation *p.R3480P* n'a pas été démontré (Varret et al, 2008).

- Mutation *p.R3500Q*: la mutation produit une substitution du résidu arginine en position 3500 par la glutamine (Soria *et al* en 1989). La mutation *p.R3500W* décrite par Gaffney *et al.* en 1995 apparait à la même position et crée un changement de l'acide aminé arginine par le tryptophane. La mutation *p.R5300L* décrite par Foushier en 2005 provoque en cette même position 3500 une substitution de l'arginine par la leucine

- La variation *p.R3531C* qui est à l'origine d'une substitution de l'arginine par la cystéine décrite par Pullinger. en 1995 n'est pas une variante allélique causant le FDB (Varret et al, 2008). Lorsqu'elle est associée à une mutation du gène *LDLR*, elle augmente l'effet hypercholestérolémique causé par le défaut du gène *LDLR*. Il est suggéré qu'elle est une variation influençable plus qu'une mutation causative (Rabes et al, 2000 et Varret al, 2008).

Les mutations *p.R3500Q* et *p.R3531C* réduisent l'affinité de liaison de l'apoB au récepteur LDL de 30 % et 70 %, respectivement (Varret et al, 2008 ; Pullinger et al, 1995 ; Nissen et al, 1995 et Gaffney et al, 1995).

– Mutation *p.E3405Q*: elle est causante d'une substitution du résidu glutamique en glutamine en position 3405 (Fisher et al, 1999). Cette mutation est associée à un taux normal des LDL liés aux récepteurs des LDL, mais l'assimilation et la dégradation du complexe LDL/Récepteur LDL sont significativement réduites, suggérant que les domaines d'apo B-100 impliqués dans ces processus ne se chevauchent pas complètement (Varret et al, 2008).

– Mutation *p.N3516K*: cette mutation provoque la substitution de l'asparagine en position 3516 par la lysine. Elle a été détectée en 2002 par Gaffney et al. La mutation *p.N3516K* présente un acide aminé chargé positivement (lysine), ce qui influence la conformation de complexe LDL-apo B et son interaction avec le récepteur LDL (Gaffney et al, 2002).

– Mutation *p.H3543Y*: elle cause la substitution de l'acide aminé histidine en tyrosine en position 3543 (Soufi et al, 2004).

Sur l'exon 29:

– Mutation *p.R4358H*: elle provoque un changement de l'arginine par l'histidine en position 4358 (Foushier et al en 2005).

– Mutation *p.V4367A*: la valine en position 4367 s'est substituée en alanine à cause de cette mutation (Foushier et al en 2005).

L'effet causatif de ces deux dernières mutations n'a pas été démontré (Varret et al, 2008).

La mutation *p.R3500Q* est la plus fréquente des mutations du gène APOB qui cause d'une façon dominante le désordre clinique autosomique FDB (OMIM *144010).

Au Maroc, aucune mutation du gène *APOB* n'a été détectée jusqu'à présent chez les personnes cliniquement diagnostiquées comme ADH (El Messal et al, 2003 ; Chater et al, 2006 et Ait Chihab et al, 2007).

1.2.3.3. Gène *PCSK9* :

1.2.3.3.1. *PCSK9*: gène/protéine

Le gène *PCSK9* humain (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9) est localisé sur le chromosome 1 (1p32). L'ADNc de *PCSK9* (NM_174936) s'étend sur 3636 pb et comprend 12 exons codant pour une protéine de 692 acides aminés (Figure 7).

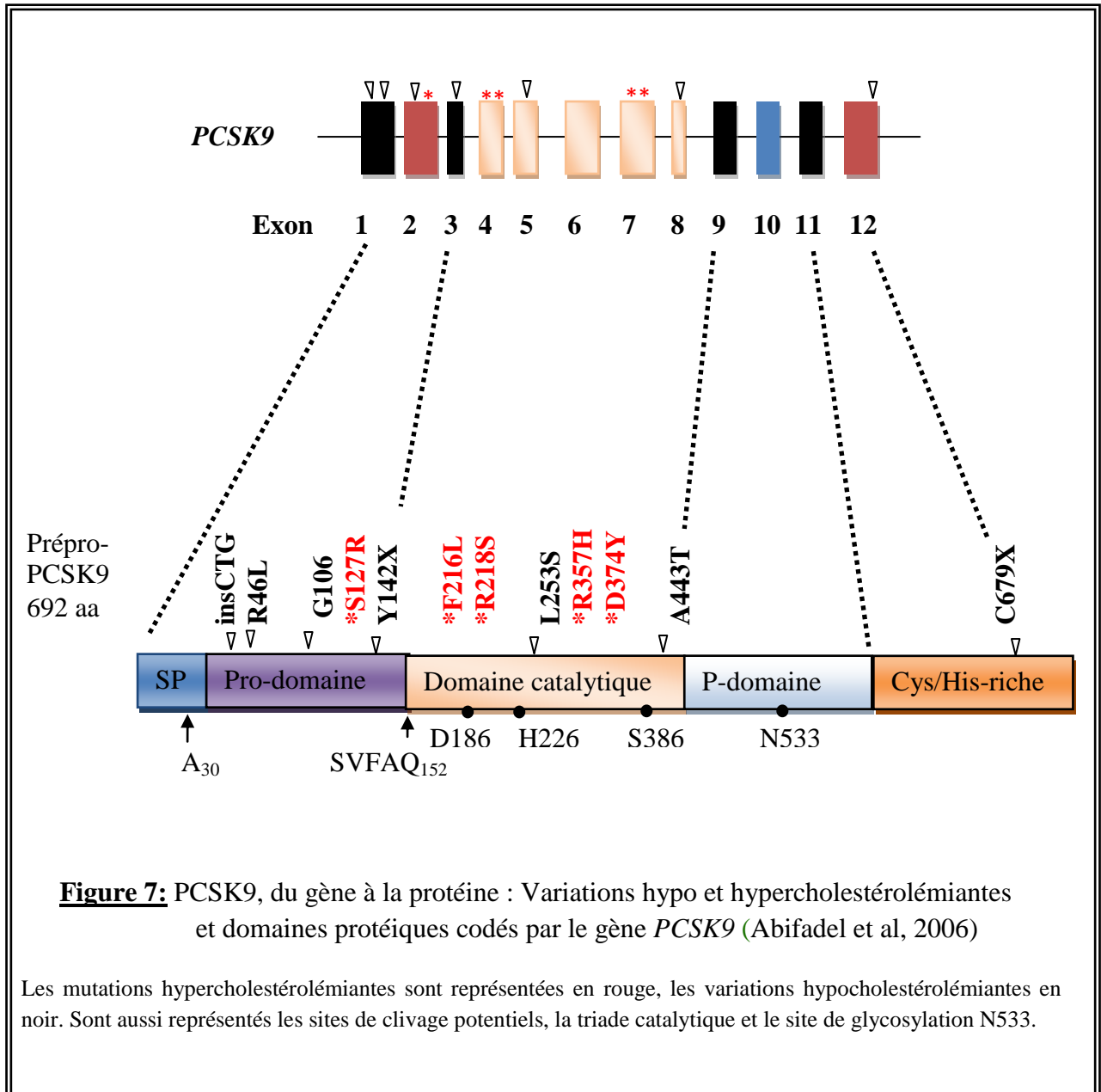
Le gène *PCSK9* code une enzyme initialement nommée Narc-1 (neural apoptosis regulated convertase 1) puisque son ADNc fut cloné suite à sa surexpression dans des neurones en apoptose induite par une privation en sérum. Elle est principalement exprimée dans le foie, l'iléon, le côlon, le rein et le système nerveux (Seidah et al, 2003 ; Graham et al, 2005). Narc1 est le 9ème membre de la famille des proprotéines convertases, enzymes impliquées dans la protéolyse ciblée de précurseurs protéiques, tels que les prohormones au cours de leur processus sécrétoire. Elle est synthétisée sous forme de zymogène (pro*PCSK9*) qui subit un autoclivage dans le réticulum endoplasmique (Seidah et al, 2003 ; Graham et al, 2005). Ses substrats ainsi que leurs rôle exact sont encore inconnus (Abifadel et al, 2006).

1.2.3.3.2. Structure de *PCSK9* :

Comme les autres membres de la famille des proprotéines convertases, la *PCSK9* est constituée d'un peptide signal (acides aminés 1-30), suivi du pro-domaine (acides aminés 31-152), du domaine catalytique (acides aminés 153-474) et d'un domaine riche en cystéines et en histidines (CHRD), comme illustré sur la figure 7. Les acides aminés Asp186, His226 et Ser386 forment la triade catalytique tandis que l'Asn317 occupe la poche oxyanionique (Seidah et al, 2003). La *PCSK9* possède une N-glycosylation en Asn533 dans le domaine CHRD, une tyrosine sulfatée dans le pro-segment (Tyr38) (Benjannet et al, 2004) ainsi que deux résidus phosphorylés, un dans le pro-segment (Ser47) et un autre dans le domaine C-terminal (Ser688) (Dewpura et al , 2008).

1.2.3.3.3. Rôle de *PCSK9* dans le métabolisme de LDLR :

La *PCSK9* joue un rôle antagoniste majeur sur l'expression et l'activité du récepteur des LDL *in vivo*. En revanche, les mécanismes moléculaires responsables de cette régulation restent à découvrir (Seidah et al, 2003).



Le rôle exact de PCSK9 dans l'homéostasie du cholestérol n'est pas encore élucidé. L'effet principalement étudié de PCSK9 est de réguler la variation du taux des récepteurs des LDL à la surface cellulaire. L'hypothèse issue des travaux réalisée dans ce sens positionne la PCSK9 dans un processus de dégradation du récepteur des LDL au niveau du compartiment postréticulum endoplasmique (Maxwell et Breslow, 2005). La PCSK9, sécrétée dans le plasma, semble capable d'agir à distance dans ce même processus (Cameron et al, 2006). Parallèlement à son impact sur le récepteur des LDL, la PCSK9 agit en augmentant la biosynthèse hépatique des lipoprotéines riches en apo B-100 (Ouguerram et al, 2004).

Par ailleurs, l'expression du gène *PCSK9* est régulée par les facteurs de transcription SRE (Breslow, 2005).

1.2.3.3.4. Les mutations du gène *PCSK9* :

Jusqu'à présent, environ 70 variations d'acides aminés de PCSK9 ont été rapportées (Akl et Georges, 2001), mais seulement quelques unes de ces variations ont démontré un effet significatif sur le taux de LDLc plasmatique (Figure 7).

Mutations hypercholestérolémiantes du gène PCSK9 (mutations de « gain de fonction de PCSK9 ») :

Les deux premières mutations faux sens du gène *PCSK9* étaient identifiées chez trois familles françaises avec l'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH) non-*LDLR*/non-*APOB* déficients (Abifadel et al, 2003).

- La mutation *p.S127R* : elle affecte un acide aminé localisé sur le prosegment connu comme ayant un effet inhibiteur de l'activité de la protéase (Timms et al, 2004).

- La mutation *p.F216L* : Elle est localisée dans le domaine catalytique proche de l'acide aminé p.His-226 du triade catalytique standard (Timms et al, 2004).

- La mutation récurrente, *p.D374Y* : elle est aussi localisée dans le domaine catalytique près de l'acide aminé p.Ser-386 du triade (Timms et al, 2004 ; Leren, 2004; Sun et al, 2005).

- Autres mutations ont été détectées, *p.R218S* et *p.R357H* (Allard et al, 2005), *p.D129G* et *p.A168E* (Homer et al 2008).

- Les mutations *p.R469W* et *p.N425S* : Elles ont été associées à des mutations du gène *LDLR* chez des patients dont l'hypercholestérolémie était particulièrement sévère (Maxwell et Breslow, 2004 ; Allard et al, 2005 et Pisciotta et al, 2006).

L'hypercholestérolémie provoquée par ces mutations serait liée directement à une diminution du nombre de récepteurs des LDL suite à un gain de fonction du gène *PCSK9*

(Benjannet et al, 2004 et Maxwell et Breslow, 2004). Cette diminution des récepteurs des LDL ne semble pas due à une diminution de la transcription du gène, puisque les quantités d'ARNm restent inchangées lors de la surexpression de *PCSK9* (Benjannet et al, 2004 et Maxwell et Breslow, 2004).

Variations hypocholestérolémiantes de PCSK9 (mutations de « perte de fonction» :

Deux mutations non-sens du gène *PCSK9* hypocholestérolémiantes ont été mises en évidence à l'état hétérozygote (Cohen et al, 2005) : La mutation *p.Y142X* entraîne une délétion des 4/5 de la protéine et la mutation *p.C679X* entraîne la délétion des 14 derniers acides aminés. Ces mutations sont globalement associées à des diminutions de 40% du taux de cholestérol LDL (Cohen et al, 2005). Plus récemment, trois variations *p.R46L*, *p.L253F* et *p.A443T* de *PCSK9* ont été identifiées et sont associées à des réductions des taux de cholestérol LDL variant de 3,5 à 30 % (Kotowski et al, 2006; Kostrzewa et al, 2008 et Polisecki et al, 2008). Ces variations entraînent une perte d'activité de *PCSK9*, ce qui provoque une augmentation du nombre des récepteurs des LDL à la surface cellulaire pouvant atteindre 16 % et une augmentation de l'internalisation des LDL pouvant atteindre 35 % en comparaison avec le gène sauvage (Cameron et al, 2006).

Bien que les mutations du gène *PCSK9* ne soient pas fréquentes, elles constituent un facteur important de modification du taux de cholestérol et leur dépistage moléculaire est désormais possible. En outre, l'intérêt principal de leur mise en évidence réside dans l'identification des mécanismes physiopathologiques de l'hypercholestérolémie non encore connus qui pourraient être fondamentaux dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, les inhibiteurs de cette enzyme, non encore identifiés, constitueraient de nouvelles cibles et de nouveaux espoirs pour le traitement de l'hypercholestérolémie (Abifadel et al, 2008).

Il est intéressant de noter qu'il existe un site qui répertorie toutes les mutations et polymorphismes du gène *PCSK9* dans une banque de données continuellement mise à jour, située sur le même site que la banque des mutations du gène *LDLR* (http://www.ucl.ac.uk/ldlr/Current/index.php?select_db=PCSK9) (Seidah, 2009).

I.3. Apolipoprotéine E :

A côté des gènes qui interviennent dans le cadre des formes autosomiques dominantes de l'ADH, un autre gène peut influencer les concentrations des paramètres lipidiques. Il s'agit du gène de l'apolipoprotéine E (apoE).

1.3.1. Le gène de l'apo E :

Le gène de l'apo E est situé à l'extrémité centromérique de l'ensemble d'une famille de gènes codant pour le groupe apolipoprotéine E, CI, et CII. Il est localisé sur le chromosome 19, dans la région q13.2 (Olaisen et al, 1982). Ce gène de 3,7 kb codant un ARNm d'une longueur de 1163 pb comporte quatre exons et trois introns (Smit et al, 1988). Le premier exon est non codant, le deuxième exon code pour un peptide signal (18 acides aminés), le troisième exon pour les 61 premiers acides aminés et le quatrième pour l'essentiel de la protéine mature (Olaisen et al, 1982 ; Smit et al, 1988).

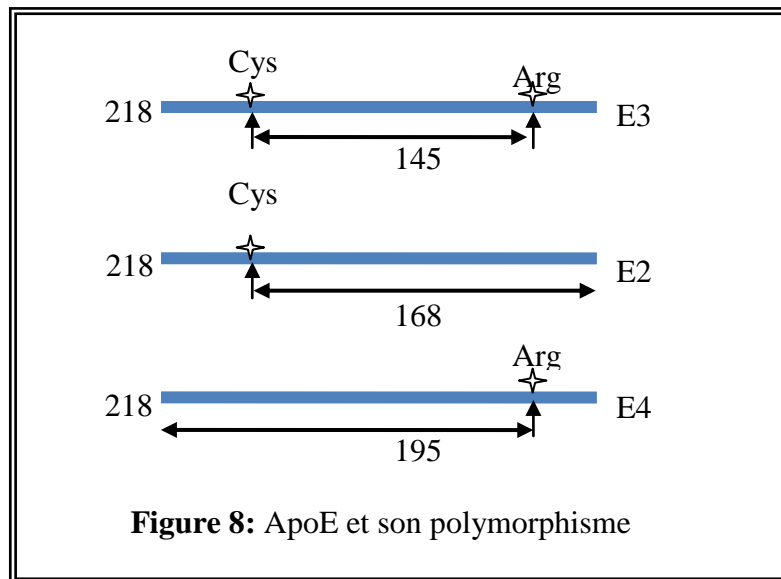
1.3.2. Polymorphisme de l'apoE :

L'apo E existe sous trois isoformes principales E2, E3, E4, produits des allèles ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 . La fréquence des allèles varie selon les populations, toutefois l'isoforme E3 reste la plus fréquente. Ces trois isoformes peuvent donner six génotypes: trois génotypes homozygotes (E2/E2, E3/E3, E4/E4) et trois génotypes hétérozygotes (E3/E2, E3/E4, E2/E4), le génotype le plus commun est E3/E3. Les différences entre les trois allèles résultent d'une transition de la cytosine en thymine aux positions correspondantes, modifiant les sites de restriction HhaI. L'apo E3 comporte une cystéine au niveau du résidu 112 et une arginine au niveau du résidu 158; la cystéine est présente à ces deux résidus pour l'isoforme E2, et l'arginine à ces deux mêmes positions pour l'apo E4 (Breslow et al, 1982) (figure 8).

1.3.3. Structure de l'apoE :

L'apo E comporte deux domaines structuraux correspondant à deux domaines fonctionnels, qui peuvent être individualisés par clivage à la thrombine (Wilson C. et al, 1991). La partie N-terminale (1-191) (22 kDa) comporte quatre hélices amphiphiles de 22 acides aminés (caractéristiques des apolipoprotéines) arrangées de façon antiparallèle et un domaine riche en acides aminés basiques (lysine et arginine) qui représente un site de fixation à l'héparine et de liaison avec le récepteur LDL (Hixson et Vernier, 1990). La partie C-terminale (10 kDa) joue un rôle majeur dans le transport des lipides, grâce à un site de liaison aux

lipides. La partie située entre ces deux domaines fonctionnels est une région de structure non ordonnée, sensible au clivage protéasique, et contenant un site potentiel d'attache glycanique. Bien que les deux domaines (N-terminal et C-terminal) soient indépendants, ils peuvent avoir une influence de l'une sur les propriétés de l'autre (Wilson C. et al, 1991 ; Hixson et Vernier, 1990).



I.3.4. Influence des phénotypes de l'apo E sur les lipides :

L'apo E est un des composants des lipoprotéines. Elle est un des constituants des VLDL, des HDL, et des chylomicrons. L'apo E3 a une préférence pour former des complexes de type HDL, de même que l'apo E2; l'apo E4 forme plutôt des VLDL (Huang et al, 2004). Cette interaction spécifique des isoformes de l'apo E avec les lipoprotéines pourrait être due à une structure différente de ces trois protéines apo E.

Le polymorphisme des isoformes E2, E3 et E4 interviennent au niveau du site d'interaction avec les récepteurs LDL et entraînent des changements de charges. Ces changements pourront modifier les interactions avec les récepteurs. L'isoforme E2 serait moins affine que les isoformes E3 et E4 pour ces récepteurs, l'isoforme E4 a plus d'affinité que E3. La présence de l'isoforme E4 se traduit par un métabolisme accéléré des lipoprotéines riches en triglycérides. Bien que son effet soit indétectable à l'échelle individuelle, le

polymorphisme génétique de l'apoE déterminerait 10% de la variance des taux de cholestérol dans les populations.

2. Diagnostique des hypercholestérolémies:

2.1. Diagnostique clinique et biochimique :

Traditionnellement, le diagnostic des ADH hétérozygotes repose sur l'existence de :

- valeurs de LDLc et de CT du plasma supérieurs à 95% de l'intervalle des valeurs normales de la population générale. Les taux de triglycéride et de cholestérol associé aux VLDL sont normaux et les valeurs de cholestérol associé aux HDL (HDLc) sont légèrement diminuées.
- symptômes comme les xanthomes tendineux et/ou cutanés et/ou l'arc cornéen qui aident à diagnostiquer la maladie.
- antécédents familiaux: approximativement 50% des familles consanguines présentent des symptômes cliniques et au minimum un descendant souffre de l'hypercholestérolémie.

Il faut exclure les autres altérations qui peuvent donner des symptômes semblables au phénotype IIa et par conséquent dévier le diagnostique (par exemple le diabète sucré, le syndrome néphrotique, l'hypothyroïdisme, ingestion de certains médicaments, autres dyslipidémies).

Dans ce sens, trois groupes de recherche ont développé les outils de diagnostique de l'ADH. Le programme MEDPED aux états unis (US), le Simon Broome Register Group au Royaume Uni (UK), et le Dutch Lipid Clinic Network criteria.

2.1.1. Le programme MEDPED USA(Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths) :

Ce programme se base sur les valeurs limites de taux du cholestérol total et de cholestérol LDL spécifiques à l'âge de l'individu, et sur les antécédents familiaux (Williams et al, 1993 ; Marks et al, 2003 ; Varret et al, 2008). Ces valeurs limites varient entre les individus qui ont un parent de premier degré, ceux qui ont un parent de deuxième degré, ceux qui ont un parent de troisième degré présentant l'hypercholestérolémie familiale, et la population générale (Tableau 4).

Tableau 4: Diagnostic de l'hypercholestérolémie familial selon les critères du programme US MEDPED *

Age(en ans)	Valeurs limites de cholestérol total (mmol/l)			
	Parent de premier degré avec FH†	Parent de deuxième degré avec FH	Parent de troisième degré avec FH	Population générale
<20	5.7	5.9	6.2	7.0
20-29	6.2	6.5	6.5	7.5
30-39	7.0	7.2	7.5	8.8
≥ 40	7.5	7.8	8	9.3

Diagnostic FH est diagnostiquée si les taux de cholestérol dépassent les valeurs limites

* Williams et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. Am J Cardiol 1993;72:171–6.

† FH, hypercholestérolémie familiale.

2.1.2. Simon Broome Register Group criteria :

Il se base, en plus des critères de programme MEDPED, sur les caractéristiques cliniques et le diagnostique moléculaire (Tableau 5) (Williams et al, 1993 ; Marks et al, 2003 ; Varret et al, 2008). En effet, un diagnostique de l'HF est dit "définitif" si un patient a des taux élevés de cholestérol et les xanthomes tendineux, ou si le patient a une mutation identifiée sur l'un des gènes responsables de l'ADH. Un diagnostique est dit "probable" si le patient a des taux élevés de cholestérol et des antécédents familiaux en hypercholestérolémie ou maladie cardiaque prématurée.

2.1.3. Dutch Lipid Clinic Network criteria :

Il est similaire au critère du Simon Broome Register Group (Defeché, 2000 ; Varret et al, 2008). Pour ce programme, des "Points" sont attribués aux antécédents familiaux en hyperlipidémie ou maladie cardiaque prématurée, aux symptômes cliniques tels que les xanthomes tendineux et à l'élévation du taux de cholestérol LDL et/ou mutation identifiée. Un score total des points supérieur à 8 est considéré "définitif" HF, de 6–8 est "probable" HF, et de 3–5 est "possible" HF (Tableau 6). Bien que le critère de Simon Broome Register Group considère le diagnostique moléculaire comme évident pour un diagnostique définitif de l'HF, le Dutch Lipid Clinic Network exige la présence d'au moins un autre critère clinique ou biochimique soit rencontré en plus du diagnostique moléculaire. Ces outils de diagnostique prouvent la standardisation de phénotype de l'HF (Melissa et al, 2004).

Le diagnostique clinique et biochimique de l'ADH homozygote n'est pas difficile puisque les symptômes évidents de la maladie (xanthomes tendineux et/ou cutanés, l'athérosclérose juvénile et les taux de cholestérol supérieurs à 550 mg/dl) apparaissent chez les enfants sans interaction avec les autres pathologies. Ce diagnostique est plus compliqué chez les patients hétérozygotes et présente un pourcentage élevé d'erreur principalement chez les enfants. D'après l'OMS (Organisation mondiale de la santé), seulement 15% des Canadiens atteints d'HF HTZ sont diagnostiqués (DoNDP, 1999). En effet, les symptômes cliniques tels les xanthomes, l'arc cornéen et la maladie coronarienne n'apparaissent qu'après l'âge de 40 ans (Austin, 2004 b). En effet, les symptômes cliniques tels les xanthomes, l'arc cornéen et la maladie coronarienne n'apparaissent qu'après l'âge de 40 ans (Austin, 2004 b) et les taux du cholestérol peuvent être normaux à l'âge d'enfant. En plus, 50% des individus qui présentent des xanthomes sont normolipidiques (taux de CT normaux), et seule 50% à 60% de patients hypercholestérolémiques présentent des xanthomes tendineux (Gagne et al, 1979).

Tableau 5: Critères de diagnostique de l'hypercholestérolémie familiale selon Simon Broome Familial Hypercholestreomemia*

Critères	Description
A	Concentration du cholestérol total au dessus de 7.5mmol/l chez les adultes ou concentration du cholestérol total au dessus de 6.7 chez les enfants de moins de 16 ans, ou Concentration de LDLc supérieur à 4.9 mmol/l chez les adultes ou supérieur à 4.0 mmoml/l chez les enfants
B	Xanthomes tendineux chez les patients ou un parent de premier degré
C	Présence de mutation dans le gène LDLR ou le gène Apo B
D	Antécédent familial d'infraction myocardique avant l'âge de 50 ans chez un parent de second degré ou avant 60 ans chez un parent de premier degré
E	Antécéden familial de concentration de cholestérol total au dessus de 7.5 mmol/l chez un parent de premier degré ou un parent de deuxième degré
Diagnostique	
Un diagnostique FH† "définitif" nécessite à la fois les critères A et B ou critère C	Un diagnostique FH "probable" nécessite à la fois les critères A et D ou les critères A et E

* Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ* 1991;303:893–6 ; Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *Atherosclerosis* 1999;142:105–12 .

† FH, familial hypercholesterolemia.

Tableau 6: Critères de diagnostic de l'hypercholestérolémie familiale selon le Duch Lipid network critéria*

Critères	Points
– Antécédents familiaux	
Parent de premier degré connu avec maladie cardiaque prématurée (homme:<55ans; femme :<60ans) et maladie vasculaire, ou Parent de premier degré connu avec LDLc dépasse les 95% de l'intervalle des valeurs normales	1
Parent de premier degré avec xanthomes tendineux et/ou arc cornéen, ou enfant âgé de moins de 18 ans avec LDLc dépasse les 95% de l'intervalle des valeurs normales	2
– Histoire clinique	
Patient avec maladie coronarienne prématurée (homme: <55ans ; femme :< 60ans)	2
Patient avec maladie cérébrale prématurée (homme<55ans; femme:<60ans) ou maladie vasculaire périphérique	1
– Examen physique	
Xanthomes tendineux	6
Arc cornéen avant l'âge de 45 ans	4
Taux de cholestérol (mmol/l)	
LDLc†, ≥8,5	8
LDLc, 6.5-8,4	5
LDLc, 5,0-6,4	3
LDL, 4,0-4,9	1
– Analyse de l'ADN	
Mutation fonctionnelle dans le gène LDLR	8
– Diagnostique (le diagnostique est basé sur le nombre total de points obtenus)	
Un diagnostique “ définitif” nécessite plus de 8 points	
Un diagnostique “ probable” nécessite 6-8 points	
Un diagnostique “ possible” nécessite 3-5 points	

* world Health Organization. Familial hypercholesterolemia—report of a second WHO Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999. (WHO publication no, WHO/HGN/FH/CONS/99.2).

† LDLc, low density lipoprotein cholesterol; FH, hypercholestérolémie familiale.

2.2. Diagnostique génétique:

A cause des inconvénients du diagnostique clinique et biochimique déjà mentionnés, la réalisation d'un diagnostique moléculaire, direct ou indirect, est nécessaire pour lier les manifestations cliniques et biologiques aux altérations du gène *LDLR* (en cas de l'HF) ou du domaine d'union de l'ApoB (en cas de FDB) ou du gène PCSK9 (en cas d'ADH liée aux mutations dans le gène PCSK9) (Defesche et al, 1999 ; Varret et al, 2008).

Le diagnostique génétique permet de déterminer les individus porteurs d'une mutation et ceux qui n'en ont pas hérité. On distingue le diagnostique génétique direct et le diagnostique génétique indirect.

2.2.1. Diagnostique génétique direct:

Le diagnostic moléculaire direct est utilisé pour la recherche de la lésion génétique causale chez l'individu atteint et permet de confirmer le diagnostic. Ce type de diagnostic est le plus spécifique et le plus fiable. Les méthodes du diagnostique utilisées dépendront des types des lésions génétiques pour le gène en cause. Pour la recherche de :

- **mutation unique** : Comme la mutation *p.R3500Q* dans le gène APOB dans le cas de déficience familiale en apo B-100, les méthodes de diagnostique utilisées sont le séquençage direct qui est une méthode de référence et la technique de Southern Blot particulièrement dans le cas de réarrangements majeurs difficilement accessibles par amplification. Afin d'établir un diagnostic fiable à 100 %, il est souhaitable de réaliser soit deux déterminations indépendantes par la même méthode soit deux déterminations par des méthodes différentes. Cette double détermination permet de vérifier l'absence d'erreur de prélèvement et de manipulation.

- **quelques mutations associées à l'effet fondateur** : Les techniques qui peuvent être utilisées sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent.

- **grande hétérogénéité allélique** : lorsqu'il s'agit d'un type particulier de mutations (remaniements majeurs) d'un point chaud de mutation, la technique de Southern Blot est la mieux adaptée. Lorsqu'il existe une très grande hétérogénéité allélique (cas de la majorité des maladies), l'identification des mutations ne peut être réalisée que par séquençage systématique du gène.

2.2.2. Diagnostique génétique indirect:

Le diagnostic indirect ou analyse familiale a pour objectif d'identifier l'allèle du gène porteur de la mutation familiale. Il permet de confirmer un diagnostic clinique, classer un individu douteux comme porteur ou non de l'allèle défectueux et il est de grande utilité dans les populations non endogamiques. Le recours au diagnostic indirect a lieu lorsque le gène associé à la maladie a été localisé mais non encore cloné ou lorsque le gène est cloné mais la mutation familiale non identifiée.

2.2.3. Diagnostique fonctionnel:

La nécessité de disposer des essais qui rendent possibles de réaliser un diagnostic fonctionnel, c.-à-d., les méthodes qui permettent d'analyser si le gène exprimé par un patient peut ou ne pas réaliser correctement sa fonction résulte de la présence d'une série d'inconvénients présentés par le diagnostic génétique tels que :

- l'identification de mutations dans une population non endogamique qui de plus elles peuvent être distribuées le long d'un gène relativement grand comme celui du LDLR, est un processus laborieux à réaliser.
- plusieurs mutations identifiées sur le gène supposent le changement d'un acide aminé par un autre et peuvent ne pas affecter l'activité de la protéine en n'étant pas responsables de la maladie (Leitersdorf et al, 1989).
- des individus qui ne manifestent pas la maladie (asymptomatiques) bien qu'ils soient porteurs d'une mutation pathogénique pour d'autres individus (Hobbs et al 1989).

3. Traitement des hypercholestérolémies:

Devant l'augmentation de risque de développer l'athérosclérose par des taux élevés de cholestérol plasmatique que présentent les patients hypercholestérolémiques, il est nécessaire d'instaurer un traitement adéquat afin de diminuer les taux de cholestérol total et de cholestérol LDL. Le traitement des hypercholestérolémies type IIa (Hypercholestérolémie familiale à transmission autosomique dominante (ADH)) peut être soit pharmacologique ou non pharmacologique.

3.1. Traitement non pharmacologique:

3.1.1. Régime alimentaire :

La première recommandation devant des taux élevés de cholestérol plasmatique est l'instauration d'un régime alimentaire adéquat similaire à la traditionnelle "régime alimentaire méditerranéen" avec la consommation des céréales, des pâtes, du riz, des légumes, des poissons blancs et des fibres, et diminution de consommation des sucreries, des charcuteries, des viandes rouges, des œufs, des fromages et des jambons. Dans toutes les dyslipidémies un minimum de six mois de traitement diététique est recommandé avant d'appliquer le traitement pharmacologique (Genest et al, 2003).

En complément du régime alimentaire, certains phytothérapeutes préconisent l'utilisation de plantes médicinales pour traiter l'hypercholestérolémie en association avec un régime approprié (Hurtel, 2005, Becker et al, 2009) :

- plantes qui agiraient directement sur le métabolisme des lipides comme l'ail,
- plantes qui augmenteraient la synthèse et l'excrétion des sels biliaires comme l'artichaut et le romarin.
- plantes qui pourraient prévenir le dépôt ou le développement des plaques d'athérome secondaires à l'hypercholestérolémie comme le thé vert.

3.1.2. Activité physique :

Un bon type d'exercice va contribuer à diminuer le cholestérol sanguin tout en augmentant faiblement le niveau du cholestérol HDL (Kodama et al, 2007). L'exercice aérobique est le plus indiqué pour atteindre ce but. Il s'agit typiquement d'exercices d'endurance. Les meilleurs types d'exercices impliquent l'utilisation continue des muscles des jambes, comme dans la marche (assez rapide), le cyclisme ou la natation.

3.2. Traitement pharmacologique:

Il est connu qu'une augmentation de la concentration de LDL plasmatique et d'apoB est associée à une augmentation de l'athérosclérose et du risque de maladie coronarienne. Par conséquent, il est important de maintenir une concentration de LDL basse. Les principaux moyens pharmaceutiques pour y parvenir sont les suivants :

3.2.1. Les statines (Inhibiteurs de la HMG-COA réductase):

Le principal effet des statines sur le profil lipidique est une réduction de la concentration du cholestérol LDL (de 20 à 50%) (Steinberg, 2006). On observe également une diminution des triglycérides et des résidus de chylomicrons, ainsi qu'une augmentation du HDLc de 5 à 10% (Sposito et Chapman, 2002). Les statines agissent principalement en augmentant la capture hépatique des LDL favorisant ainsi leur catabolisme. Les statines stimulent indirectement l'expression du gène du LDLR par des mécanismes de rétrocontrôles biomoléculaires (Law *et al.* 2003 ; Rosenson, 2007 et Charlton-Menys et Durrington , 2008).

Les statines, grâce à leur structure similaire à celle de l'HMG-CoA réductase, inhibent de façon compétitive et réversible l'activité de cette enzyme (Albers-Schonberg et al, 1981). Les principales molécules connues sont la lovastatine, la simvastatine, la pravastatine, la fluvastatine, la cérvastatine, l'atorvastatine et la rosuvastatine.

3.2.2. Fibrates

Les fibrates agissent principalement sur l'hypertriglycéridémie en augmentant le catabolisme hépatique des acides gras, diminuant ainsi leur disponibilité pour la synthèse de VLDL (Duriez, 2003). De plus, les fibrates induisent l'expression de la LPL et inhibent celle de l'apoCIII, l'inhibiteur naturel de la LPL, ce qui produit une augmentation marquée de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL, et une diminution de la triglycéridémie (Schoonjans et al, 1996).

3.2.3. Résines (séquestrants d'acides biliaires)

Les séquestrants d'acides biliaires sont des résines insolubles et indigestibles chargées positivement qui se lient aux acides biliaires chargés négativement dans la lumière intestinale et qui sont ensuite excrétées. Ainsi la réabsorption des acides biliaires, qui se fait normalement dans l'ilium, est empêchée et ceux fixés par les résines sont éliminés du corps dans les excréments. L'élimination fécale des acides biliaires est ainsi, considérablement augmentée (Charlton-Menys et Durrington ; 2008).

3.2.4. Ezetimibe :

L'ezetimibe semble se lier à la protéine Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), un transporteur impliqué dans l'absorption du cholestérol et situé sur la membrane des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Garcia-Calvo et al, 2005) et des hépatocytes (Temel et al, 2007). En plus de cet effet direct, une diminution de l'absorption de cholestérol mène à une expression plus élevée du LDLR sur la surface cellulaire et à une internalisation plus élevée des LDL, diminuant ainsi la concentration plasmatique de LDLc.

3.2.5. Les inhibiteurs de la squalène synthase :

La squalène synthase est l'enzyme qui convertit le farnesyl pyrophosphate en squalène dans la voie de synthèse du cholestérol. Vu que les inhibiteurs de la squalène synthase inhibent la synthèse de cholestérol à une étape suivant la synthèse de mévalonate et des métabolites isoprénylés, ces agents pourraient avoir des effets hypolipémiants sans myotoxicité ni hépatotoxicité observées quelques fois avec les statines (Charlton-Menys et Durrington , 2008).

3.2.6. Inhibiteur de la protéine de transfert microsomial (MTP) :

La MTP joue un rôle important dans l'assemblage des lipoprotéines contenant l'apoB, notamment les VLDL du foie et les chylomicrons de l'intestin. En bloquant cette enzyme, il serait donc possible de réduire l'absorption intestinale de lipides et de réduire la production hépatique de VLDL, et par conséquent, de LDL (Cuchel *et al.* 2007).

3.2.7. Oligonucléotides anti-sens : ApoB-100 (Mipomersen)

Les oligonucléotides anti-sens (ASO) sont de l'ADN simple brin qui correspond à une séquence spécifique d'ARNm. Les ASO s'hybrident à l'ARNm ciblé, induisant la dégradation sélective de cet ARNm. Les ASO donnés en injection sous-cutanée ont une longue demi-vie et se dirigent principalement vers le foie et le rein pour leur catabolisme (Kastelein et al, 2006)

3.2.8. Inhibiteur de PCSK9:

Récemment, l'effet de l'inhibition de l'expression de PCSK9 (par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens et l'interférence ARN) (Graham et al, 2007 ; Frank-Kamenetsky et al, 2008 ; Gupta et al, 2010) ou de son activité (injection d'un anticorps monoclonal contre PCSK9) (Chan et al, 2009) sur le LDLR ont été testés dans des modèles animaux, incluant la souris et le singe, mais rien n'a été vérifié chez l'humain à ce jour.

3.3. Thérapie génique :

Les techniques de l'ADN recombinant ont été envisagées pour corriger les dyslipidémies monogéniques sévères qui restent hors de tout traitement curatif. Un nombre croissant d'expériences sont actuellement en cours d'étude pour le déficit en LPL, en MTP ou en LCAT chez l'animal. Toutefois, seule l'hypercholestérolémie familiale homozygote par déficit en récepteur des LDL a fait l'objet d'un des premiers essais de thérapie génique chez l'homme. Pour séduisantes que soient ces premières expérimentations, des questions tant éthiques que technologiques limitent encore le développement de telles stratégies. Elles sont essentiellement liées à la sécurité et à la biologie de la cellule. Le développement de méthodes peu invasives, utilisant des vecteurs non viraux permettant un ciblage tissulaire spécifique, sûr et durable, de la séquence à corriger en position « orthotopique », donnera son plein essor à ces traitements d'un genre nouveau.

C. But du travail:

L'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante (ADH, OMIM#143890) est la plus fréquente et la plus sévère des hypercholestérolémies monogéniques. Elle est l'un des principaux facteurs de risque d'athérosclérose, première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés et aussi dans notre pays. Au Maroc, en l'an 2000, 35.5% des décès étaient causés par les maladies cardiovasculaires en comparaison avec les maladies respiratoires (10.7%) et le cancer (11.7%). Le traitement médicamenteux moderne peut baisser efficacement les concentrations plasmatiques de cholestérol de nombreuses personnes ayant l'ADH. Les enquêtes effectuées par l'OMS sur les ADH ont révélé que ce problème n'est ni diagnostiqué ni traité, ou il reste insuffisamment diagnostiqué et traité dans la plupart des nations et pour la plupart des personnes concernées. Selon l'OMS, moins de 10% des membres des familles sont examinés sachant que la plupart des efforts soutenus pour identifier les ADH sont limités selon les régions.

Au Maroc, la majorité des patients hypercholestérolémiques ne sont diagnostiqués et traités qu'après l'apparition d'une maladie cardiaque et aucune étude génétique n'a été réalisée au nord du Maroc pour diagnostiquer les ADHs. Devant cette situation, nous avons mené cette étude chez la population du nord du Maroc en fixant les objectifs suivants :

- L'objectif majeur de notre étude est de déterminer, dans notre population, un diagnostic clinique et biologique de l'ADH en utilisant le programme MEDPED et les deux autres approches reconnus par l'OMS, le Simon Broome Register Group criteria et le Dutch Lipid Clinic Network criteria.
- Etudier les trois gènes impliqués dans l'ADH afin de déterminer le spectre des mutations du gène *LDLR*, du gène *APOB* et du gène *PCSK9*.
- Etudier la corrélation entre le génotype et le phénotype de l'ADH chez la population du Nord du Maroc.
- Déterminer le génotype de l'apoE et étudier la fréquence de ses allèles et leur influence sur le profil lipidique et les caractéristiques cliniques.

*Matériels
et
Méthodes*

A. Sujets Etudies:

La population étudiée comprend 46 probands qui ont été cliniquement diagnostiqués ADH selon les critères standards. Tous les patients sont originaires de la région du nord du Maroc : Tanger, Assilah, Tétouan, Sebta, Larache, Chefchaouen et El Hoceima. Ils ont été adressés aux laboratoires de l'Institut Pasteur de Maroc à Tanger et aux laboratoires d'analyse médicale de la ville de Tétouan pour effectuer un bilan lipidique. L'âge moyen de ces patients est de 57 ± 10 ans. Les patients ont été sélectionnés en utilisant un questionnaire (annexe 1) comprenant les critères de diagnostic d'ADH selon les directives des trois approches de diagnostics d'ADH reconnus par l'OMS (le programme MEDPED, le Simon Broome Register group criteria et le Dutch lipid Clinic Network criteria). Ces critères sont les taux élevés du cholestérol total (CT) et de cholestérol LDL (LDLc) dans le plasma ($CT > 250$ mg/dl et $LDLc > 190$ mg/dl), concentrations normales de TG et de HDLc dans quatre visites de contrôle consécutives, antécédents familiaux en hypercholestérolémie, antécédents personnelles et/ou familiaux en maladies cardiovasculaires prématurées (MCVP), présence de xanthomes tendineux et/ou cutanés (Figure 9 et 10), présence d'arcs cornéens (Figure 11). Les causes secondaires de l'hypercholestérolémie tels que les diabètes, l'hypothyroïdie, syndromes néphrotiques, etc. ont été exclues. Lorsqu'il a été possible, des antécédents médicaux complets et des données familiaux détaillées ont été obtenus. L'indice de masse corporelle (BMI) a été calculé comme étant le poids divisé par la taille (kg/m^2). La tension artérielle a été mesurée avec le Von Recklinghausen sphygmomanometer en position assise et après 5 minutes de repos. La maladie cardiovasculaire prématurée (MCVP) a été diagnostiquée d'après un historique documenté d'infarction myocardique précédente, une angioplastie, des antécédents d'angine de poitrine et des altérations dans l'électrocardiogramme (ECG).

Le groupe de témoins est formé de 89 individus, non apparentés, d'âge et de sexe identiques au groupe de patients, normocholestérolémiques et qui ne portent pas d'antécédents personnelles ou familiaux en ADH ou en maladies cardiovasculaires (MCV).

Tous les participants ont donné leur consentement écrit (annexe 2).



Figure 9: Xanthomes tendineux



Figure 10: Xanthomes cutanés

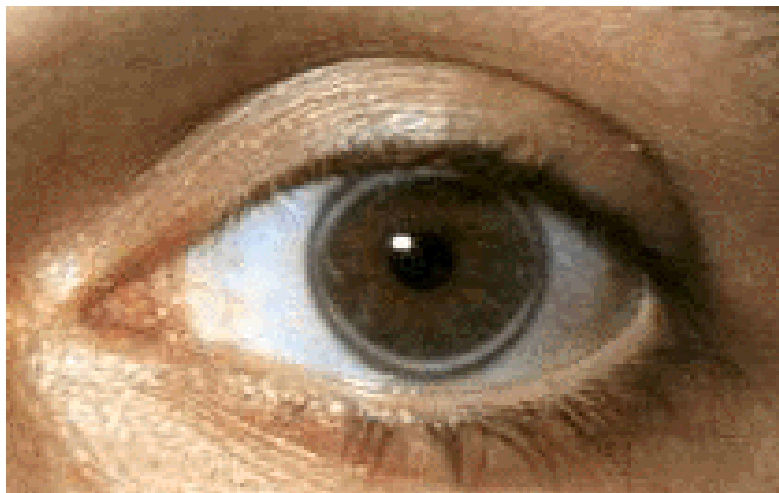


Figure 11: Arc cornéen

B. Analyses biochimiques:

1. Prélèvement du sang :

Les prélèvements du sang sont recueillis dans un tube sec après 12 heures de jeûne. Après centrifugation du sang à 3 500 rpm pendant 10 min, les sérums sont décantés et aliquotés. Les paramètres lipidiques suivants : CT, HDLc et TG, ont été dosés dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. L'apolipoprotéine B (apoB) a été dosée sur un sérum congelé et conservé à -70°C .

2. Dosage des paramètres lipidiques :

2.1. L'automate analyseur :

Notre laboratoire de biochimie au centre de biologie médicale de l'Institut Pasteur à Tanger est équipé de l'analyseur DimensionXpand (DADE BEHRING). L'analyseur a été paramétré à partir des adaptations fournies par les fabricants des réactifs. Ces programmations avaient été installées dans le laboratoire de biochimie depuis l'année 2002 et validées par des séries d'échantillons incluant les contrôles fournis dans les kits.

2.2. Techniques de dosage :

Les paramètres lipidiques (CT, TG et HDLc) ont été mesurés par la technique enzymatique avec un kit commercial (Dimension® clinical chemistry system : Flex® reagent cartridge (DADE BEHRING)) en utilisant l'automate analyseur (Dimension Xpand, Dade Behring).

2.2.1. Dosage du cholestérol total (CT):

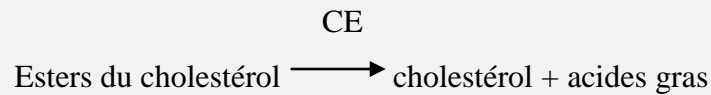
La technique de dosage du cholestérol employée au cours de notre étude repose sur le principe introduit par Stadtman en 1957 et adapté par la suite en 1978 par d'autres auteurs dont Rauteta et Liedtke.

2.2.1.1. Principe de la technique :

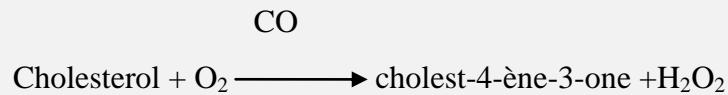
La cholestérol estérase (CE) catalyse l'hydrolyse des esters du cholestérol en cholestérol libre qui s'ajoute à la fraction de cholestérol libre déjà existant dans l'échantillon. Tout le cholestérol libre est oxydé en cholest-4-ène-3-one et en peroxyde d'hydrogène sous l'influence d'une cholestérol oxydase (CO). En présence de peroxydase de raifort (POR),

l'eau oxygénée ainsi formée est utilisée pour oxyder la N,N-diétylaniline-HCl/4-aminoantipyrine (DEA-HCl/AAP), produisant un chromophore absorbant à 540 nm. L'absorbance due à l'oxydation de la DEA-HCl/AAP est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total dans l'échantillon et est mesurée par une technique polychromatique à 452, 540 et 700 nm. C'est une technique qui comporte 3 étapes :

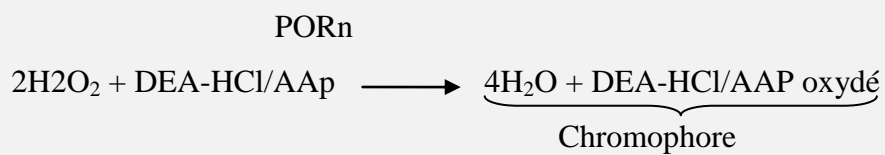
Réaction préliminaire : Elle permet l'hydrolyse du cholestérol estérifié



Réaction principale : Elle permet l'oxydation du cholestérol libre



Reaction indicatrice: Elle permet la production du chromophore absorbant à la longueur d'onde 540nm.



2.2.1.2. Résultats et interprétations:

L'intensité de la coloration de la quinone imine (chromophore) mesuré à 540 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

La concentration du CT est mesurée en mg/dl [mmol/l]. Le facteur de conversion des unités conventionnelles en unités S.I est : **0.026**.

$$\text{mg/dl} \times 0.026 = \text{mmol/l}$$

Chez l'adulte, les concentrations du cholestérol sérique inférieures à 200 mg/dl (< 5.2 mmol/l) sont considérées souhaitables, celles comprises entre 200 et 240 mg/dl (5.2- 6.2 mmol/l) sont considérées comme des taux critiques et les concentrations supérieures à 240mg/dl (>6.2 mmol/l) sont des taux à haut risque.

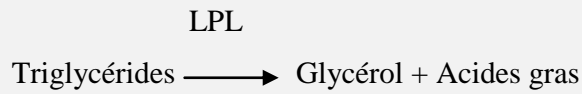
2.2.2. Dosage des triglycérides:

Pour le dosage des triglycérides, nous avons utilisé la technique basée sur une procédure enzymatique dans laquelle une combinaison d'enzymes est employée pour mesurer les triglycérides sériques ou plasmatiques.

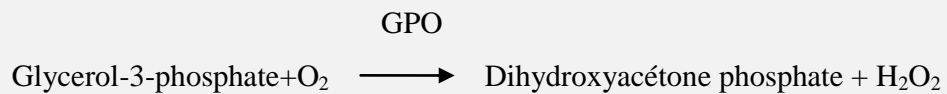
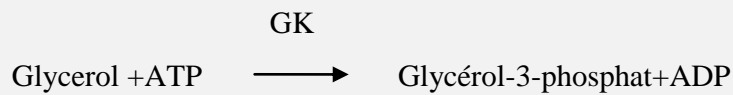
2.2.2.1. Principe de la technique :

Le sérum est incubé en présence d'une lipoprotéine lipase (LPL), qui transforme les triglycérides en acides gras libres et en glycérol. La glycérol kinase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol par l'adenosine-5-triphosphate (ATP) en glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate-oxydase oxyde le glycérol-3-phosphate en dihydroxyacetone phosphate et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'action catalytique de la peroxydase (POD) forme de la quinonéimine à partir de H₂O₂, de l'aminopyrine et du 4-chlorophénol. Le changement d'absorbance résultant de la formation de quinoneimine est directement proportionnel à la quantité totale de glycérol et de ses précurseurs dans l'échantillon. Il est mesuré à l'aide d'une technique cinétique bichromatique (510, 700 nm). C'est une technique qui comporte 4 étapes :

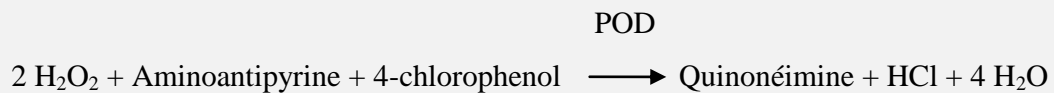
Une réaction principale :



Deux réactions auxiliaires :



Une réaction indicatrice :



2.2.2.2. Résultats et interprétations:

La concentration des triglycérides est mesurée en mg/dl [mmol/l]. Le facteur de conversion des unités conventionnelles en unités S.I est : **0.0114**

$$\text{mg/dl} \times 0.0114 = \text{mmol/l triglycerides}$$

Les concentrations normales des TG sériques sont inférieures à 150 mg/dl (< 1.70 mmol/l). Les limites supérieures des taux des TG sériques sont comprises entre 150 et 199 mg/dl (1.70 - 2.25 mmol/l). Les taux des TG sériques compris dans l'intervalle 200- 499 mg/dl (2.26-5.64 mmol/l) sont considérées comme des taux élevés et les taux supérieurs à 500 mg/dl (≥5.65 mmol/l) sont considérés très élevés.

2.2.3. Dosage du cholestérol HDL :

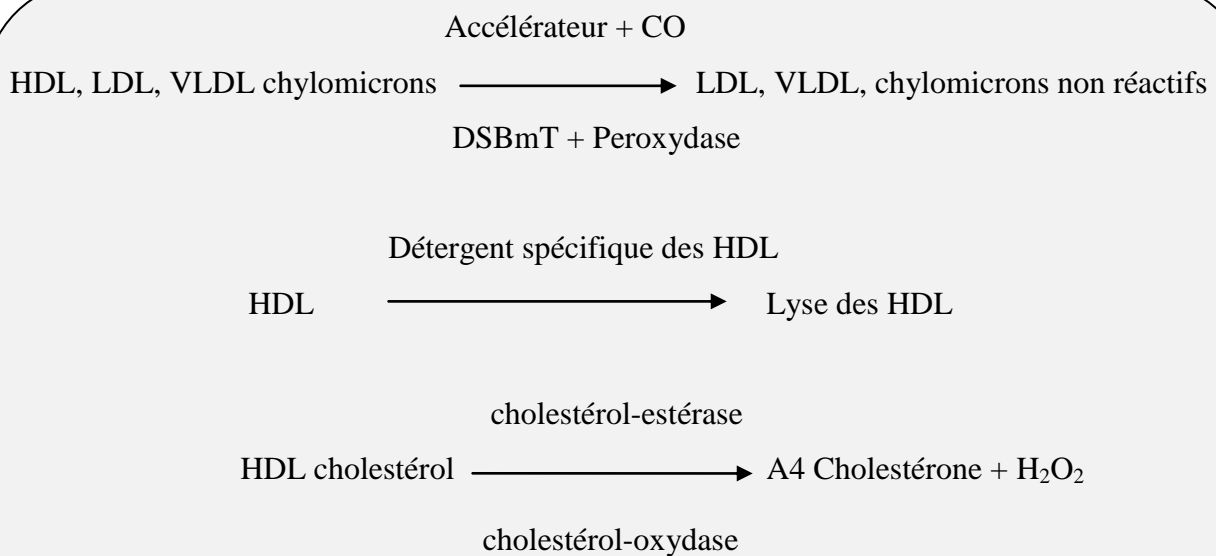
2.2.3.1. Technique du dosage :

Dans notre travail, nous avons utilisé la technique automatisée récente qui permet le dosage direct du cholestérol HDL. Cette technique permet d'éviter les erreurs liées aux étapes manuelles du dosage par la technique de la précipitation.

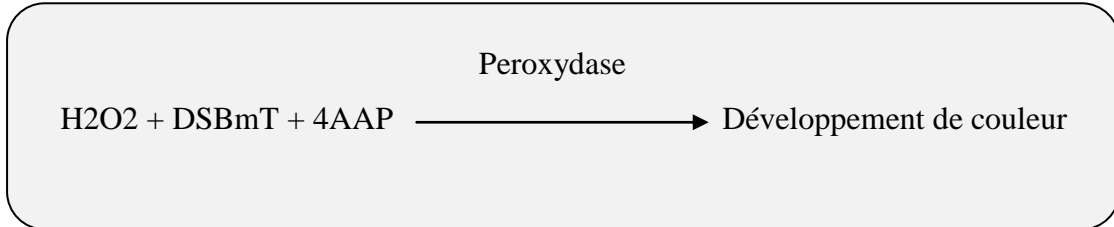
2.2.3.2. Principe de la technique:

Le principe de la technique automatisée est basé sur la formation de complexes hydrosolubles entre les chylomicrons (CM), VLDL et LDL et les sulfates d'alpha-cyclodextrine et de dextrane. Les complexes ainsi formés sont alors insensibles à l'action des enzymes de dosage du cholestérol (cholestérol estérase et cholestérol oxydase) dont les activités catalytiques ont été modifiées par couplage avec du polyéthylèneglycol. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène généré réagit avec la 4-aminophénazone pour former un dérivé quinone-imine dont l'intensité de la coloration mesurée à 600 nm est proportionnelle à la concentration de HDLc. La technique se fait en deux étapes :

La première étape : Le cholestérol non-estérifié non-HDL subit une réaction enzymatique et le peroxyde produit est consommé par une réaction de peroxydase avec le DSBmT (N,N-bis(4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodique) pour donner un produit incolore.



La deuxième étape : Les HDL sont spécifiquement solubilisés, tandis que le cholestérol-estérase (CE) et un coupleur chromogène développent la couleur pour la détermination quantitative des HDLc.



2.2.3.3. Résultats et interprétations:

La concentration d'HDLc est donnée en mg/dl [mmol/l]. Le facteur de conversion des unités conventionnelles en unités S.I est : **0.0259**

$$\text{mg/dl} \times 0.0259 = \text{mmol/l cholestérol HDL}$$

Les concentrations du HDLc sériques inférieures à 40 mg/dl (< 1.04 mmol/l) sont considérées comme des taux faibles du HDLc. Les concentrations supérieures ou égales à 60mg/dl (1.55 mmol/l) sont considérées comme des taux élevés du HDLc.

2.2.4. Dosage du cholestérol LDL:

Le cholestérol LDL est habituellement calculé par la formule de Friedewald (Friedewald et al, 1972) :

$$\text{cholestérol-LDL} = \text{cholestérol total} - (\text{cholestérol-HDL} + \text{triglycérides}/2,2\text{mmol/l})$$

$$\text{cholestérol-LDL} = \text{cholestérol total} - (\text{cholestérol-HDL} + \text{triglycérides}/5 \text{ g/l})$$

Cette formule nécessite la mesure du cholestérol HDL et des TG ; il est donc nécessaire de faire le prélèvement du sang à jeun. Lorsque le taux des TG est supérieur à 4,5 mmol/l, le calcul n'est pas valide et les TG sont alors calculés par la formule de Planelle.

$$\text{Cholestérol LDL} = 0,41 \text{ Cholestérol total} - 0,32 \text{ TG} + 1,70 \text{ ApoB}$$

Les taux du LDLc inférieures à 130mg/dl (< 3.35 mmol/l) sont souhaitables. Les concentrations du LDLc supérieures à 160 mg/dl (>4.15mmol/l) sont considérées comme des seuils d'interventions.

2.2.5. Dosage de l'apolipoprotéine B (apoB) :

2.2.5.1. Technique de dosage :

Dans notre travail, nous avons utilisé la technique enzymo-immunologique « sandwich » pour le dosage de l'apolipoprotéine B. Cette technique se base sur l'utilisation d'anticorps marqués par une enzyme : la peroxydase.

2.2.5.2. Principe de la technique :

Cette méthode remplace le traceur radioactif par l'enzyme (peroxydase). La réaction immunologique est suivie d'une réaction indicatrice qui permet la détection spectrométrique de l'activité enzymatique liée au complexe antigène-anticorps. C'est l'anticorps qui est marqué par l'enzyme.

Initialement, la méthode réalise une compétition entre l'apolipoprotéine présent dans le sérum et l'apolipoprotéine adsorbée sur un support insoluble pour l'anticorps marqué par la peroxydase en solution. Ce complexe apolipoprotéine-anticorps est mesuré par un second anticorps marqué par la peroxydase.

2.2.5.3. Résultats et interprétations :

Les concentrations de l'apoB sont mesurées en g/l ou en mg/dl. Le facteur de conversion des unités de g/l en mg/dl est : **0.01**

$$\text{mg/dl} \times 0.01 = \text{g/l Apolipoprotéine B}$$

Les valeurs normales de l'Apolipoprotéine B sont inférieures à 125mg/dl (1.25 g/l) pour les femmes et inférieures à 135 mg/dl (1.35 g/l) pour les hommes. Des concentrations supérieures à 135 mg/dl (1.35 g/l) sont considérées comme des valeurs du risque.

C. Analyses Génétiques:

Pour déterminer les mutations causantes de l'hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante (ADH) chez nos patients cliniquement diagnostiqués hétérozygotes ADH, nous avons utilisé la technique de séquençage direct automatique pour explorer le gène *LDLR*, le gène *APOB* (exons 26 et 29) et le gène *PCSK9*. Nous l'avons utilisé pour déterminer les isoformes du gène de l'apoE. La technique consiste en une succession de réaction d'amplification PCR et une réaction de séquençage. Ceci permet d'obtenir la séquence nucléotidique du fragment amplifié sans faire appel au sous clonage.

Les étapes techniques réalisées pour l'analyse génétique de nos échantillons sont les suivantes:

- Extraction de l'ADN génomique : l'ADN génomique a été isolée à partir de sang total prélevé sur EDTA, en utilisant la méthode des sels décrite précédemment (Miller et al, 1988).
- Réalisation des réactions de PCR : la technique PCR utilisée au cours de cette thèse est la PCR HotStart. Les réactions de PCR HotStart ont été réalisées en utilisant le kit HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN). La Polymérase HotStarTaq Plus DNA exige une étape d'activation de 5 minutes à 95°C. Nous avons analysé le promoteur et les 18 exons du gène *LDLR* incluant environ 50 pb des extrémités introniques, le promoteur et les 12 exons du gène *PCSK9* incluant environ 50 pb des extrémités introniques et les régions du gène *APOB*

situées sur les exons 26 et 29 où étaient décrites les mutations causant la FDB. Nous avons également analysé l'exon 4 du gène de l'apo E pour déterminer les génotypes de l'apo E.

– Réalisation des réactions de séquençage : Les produits de PCR sont purifiés en utilisant la technique de purification par les billes paramagnétiques. Nous avons utilisé le kit Aagencourt® AMpure® PCR Purification system (Beckman, Coulter). Des réactions de séquençage d'ADN utilisant la version 3.1 de kit Big Dye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) ont été effectuées.

– Analyse des produits de séquençage : Les produits de séquençage sont purifiés en utilisant la technique de purification aux billes paramagnétiques. Les produits de séquençage purifiés ont été analysés sur un Analyseur Génétique 3730® (ABI) (Applied Biosystems).

– Lorsqu'une mutation est identifiée, le fragment qui contient cette mutation est réanalysé en utilisant un nouveau aliquot d'ADN génomique du patient. Les mutations identifiées sont explorées chez tous les sujets témoins normocholestérolémiques (contrôles). Les mutations sont nommées selon Yamamoto (Yamamoto et al, 1984).

1. Extraction d'ADN :

1. 1. Prélèvement du sang :

5 ml du sang total sont recueillis sur EDTA, chélateur des ions divalents, cofacteurs des nucléases. Les échantillons du sang sont par la suite conservés à -20°C.

1.2. Extraction d'ADN à partir du sang total par la méthode saline :

Nous avons utilisé la technique d'extraction par NaCl pour la préparation de l'ADN génomique. La technique consiste à éliminer les protéines cellulaires par déshydratations et précipitation par une solution saturée de NaCl.

5ml du sang décongelé est doucement agité par retournement jusqu'à ce qu'il soit parfaitement mélangé. Le sang est ensuite transféré dans un tube Falcon de 50 ml contenant 15 ml de la solution de lyse des globules rouges. Le mélange est agité par retournement puis incubé dans la glace ou à + 4°C pendant 30 min. Pendant ce temps, les ions positifs présents dans la solution de lyse des globules rouges exercent une pression osmotique à l'intérieur des érythrocytes provoquant ainsi la destruction de leurs membranes. L'EDTA également présent

dans la solution de lyse, agit comme chélateur des ions divalents, indispensables pour l'activité des nucléases (Blackburn et Gait, 1990).

Le mélange est centrifugé 10 min à 2500 rpm ; le surnageant contenant les débris des globules rouges est éliminé et les leucocytes sont récupérés dans le culot au fond de tube. Le culot des leucocytes est vortexé vigoureusement 10 à 20 secondes afin que toutes les cellules nucléées soient resuspendues. 10 ml de la solution de lyse est ajoutée au culot puis centrifugée à 2500 rpm pendant 10 min (Figure 12). Après l'élimination de surnageant, le culot leucocytaire est suspendu dans un tube polypropylène avec 3 ml de la solution de lyse des noyaux de globules blancs (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl et 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2). Les cellules lysées sont digérées pendant une nuit dans 0.2 ml de SDS à 10% et 0.5 ml de solution de protéinase K (1 mg protéase K dans 1% SDS et 2 mM Na₂EDTA). Après digestion complète, 1 ml de solution saturée de NaCl (environ 6M) est ajouté au tube et vortexé vigoureusement pendant 15 secondes, suivie d'une centrifugation à 3600 rpm pendant 15 min. Le culot de protéine est précipitée au fond de tube et le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube de 15 ml. Deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés pour précipiter l'ADN. Les brins d'ADN précipités sont récupérés par une pipette pasteur stérile et transférés dans un tube eppendorff de 1,5 ml contenant 100 à 200 µl de solution TE (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 7.5). L'ADN est adéquatement dissout pendant 2 heures à 37°C avant d'être quantifié. L'ADN ainsi préparé est conservé à +4°C pour un stockage à court terme, ou placé à -20°C pour un stockage à long terme.

1.3. Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait:

La concentration de l'ADN extrait est mesurée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. Etant donné que l'absorbance de 50 µg/ml d'ADN double brin est de 1 unité de densité optique à 260 nm (DO₂₆₀), donc la concentration de l'ADN mesurée en µg/ml est égale à 50µg/ml X DO₂₆₀ X facteur de dilution.

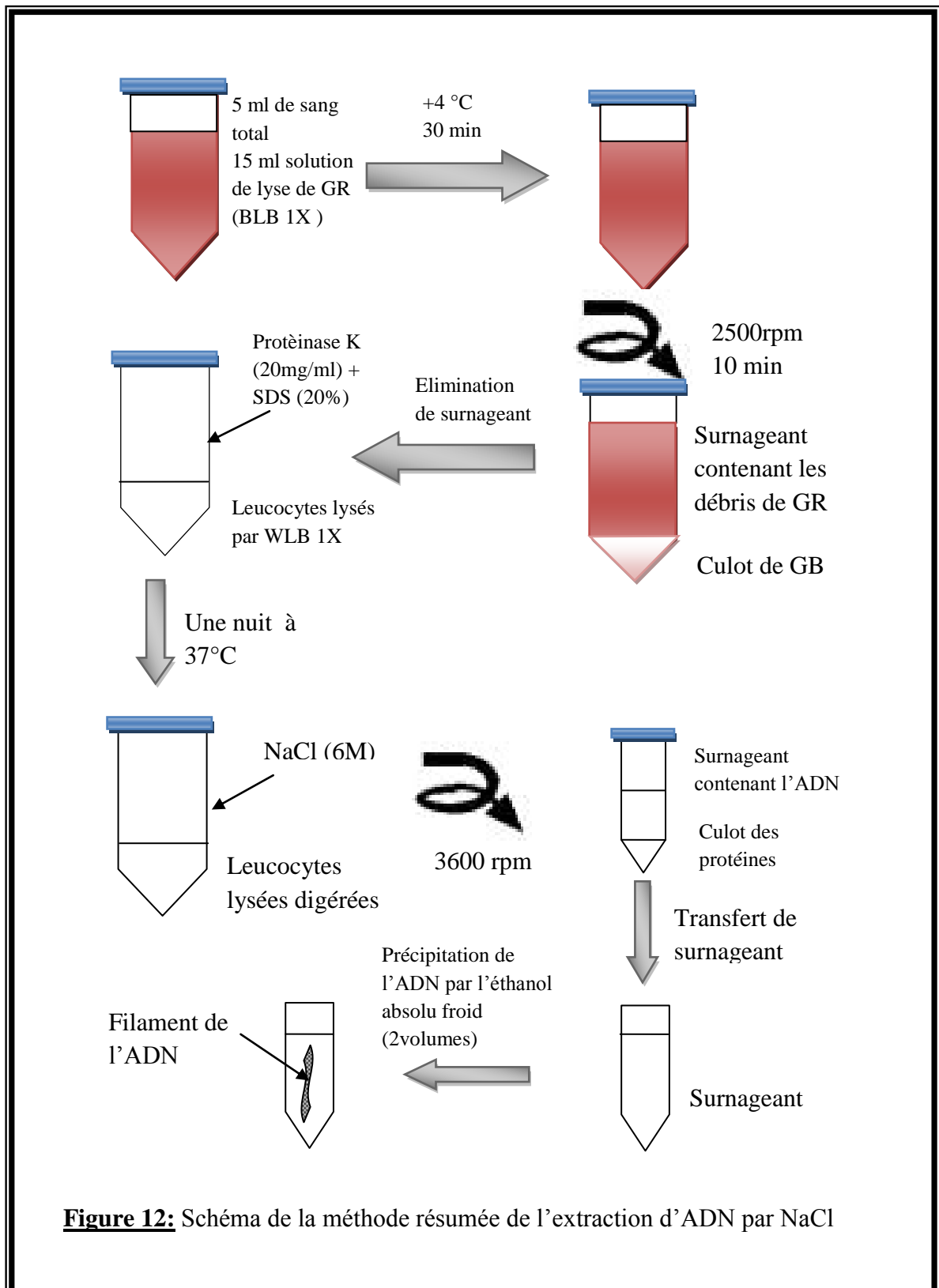


Figure 12: Schéma de la méthode résumée de l'extraction d'ADN par NaCl

Le rapport des densités optiques 260nm / 280 nm (DO_{260} / DO_{280}) permet d'estimer le degré de pureté de l'ADN isolé :

- Des valeurs comprises entre 1.8 et 2 démontrent une bonne déprotéinisation (ADN pur).
- Des valeurs inférieures à 1.8 indiquent une contamination protéique. Une purification est nécessaire pour éliminer les protéines et améliorer la qualité d'ADN génomique.

La purification d'une solution d'ADN se fait par de nombreuses techniques. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la technique de précipitation par le chloroforme et l'acétate d'ammoniaque. La solution d'ADN est portée à haute force ionique par addition de chloroforme ($CHCl_3$) (1/10 du volume) et agitée par retournement puis centrifugée 5 min à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré dans un tube propre. Au surnageant, on ajoute l'acétate d'ammoniaque (10M) et un grand excès d'isopropanol pur à 20°C. Au bout de quelques minutes, on voit apparaître un précipité blanchâtre, translucide et filamenteux (la « méduse ») constitué de longs filaments d'ADN précipité. Ce précipité est recueilli par centrifugation à 13000 rpm pendant un quart d'heure environ. Pour laver l'ADN, le précipité est resuspendu dans de l'éthanol à 75 % à -20°C puis centrifugé à nouveau. Le culot obtenu de cette dernière centrifugation est égoutté, puis séché à l'aire. L'ADN est redissout immédiatement dans le tampon TRIS-HCl (20 M) pH=8.

- Des valeurs supérieures à 2 traduisent une digestion de l'ADN (contamination par ARN) (Maniatis, 1989).

L'intégrité et la digestibilité de l'ADN génomique sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8%. C'est une technique standard qui permet de séparer et d'identifier les fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Le gel d'agarose est préparé en mélangeant 0.8 g d'agarose D-1 Low EEO (basse résolution) avec 100 ml de tampon TBE à 1% à pH 8.3. Ce mélange est porté à ébullition dans un four à micro-ondes. Le gel doit être transparent et sans grumeaux. Une fois le mélange est refroidi aux alentours de 55°C, le bromure d'éthidium est additionné à une concentration finale de 0.5 mg/ml. Le mélange est ensuite coulé dans le moule et le peigne y sera placé. Après solidification du gel, le moule sera installé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TBE à 1X à pH 8.3. Dans les puits d'une plaque de 96 propre sont placés 2 μ l d'ADN génomique. Aux échantillons d'ADN, on ajoute la solution de dépôt : c'est un colorant de charge qui permet de suivre visuellement l'avancé de la migration d'ADN. La solution de dépôt (bleu de bromophenol)

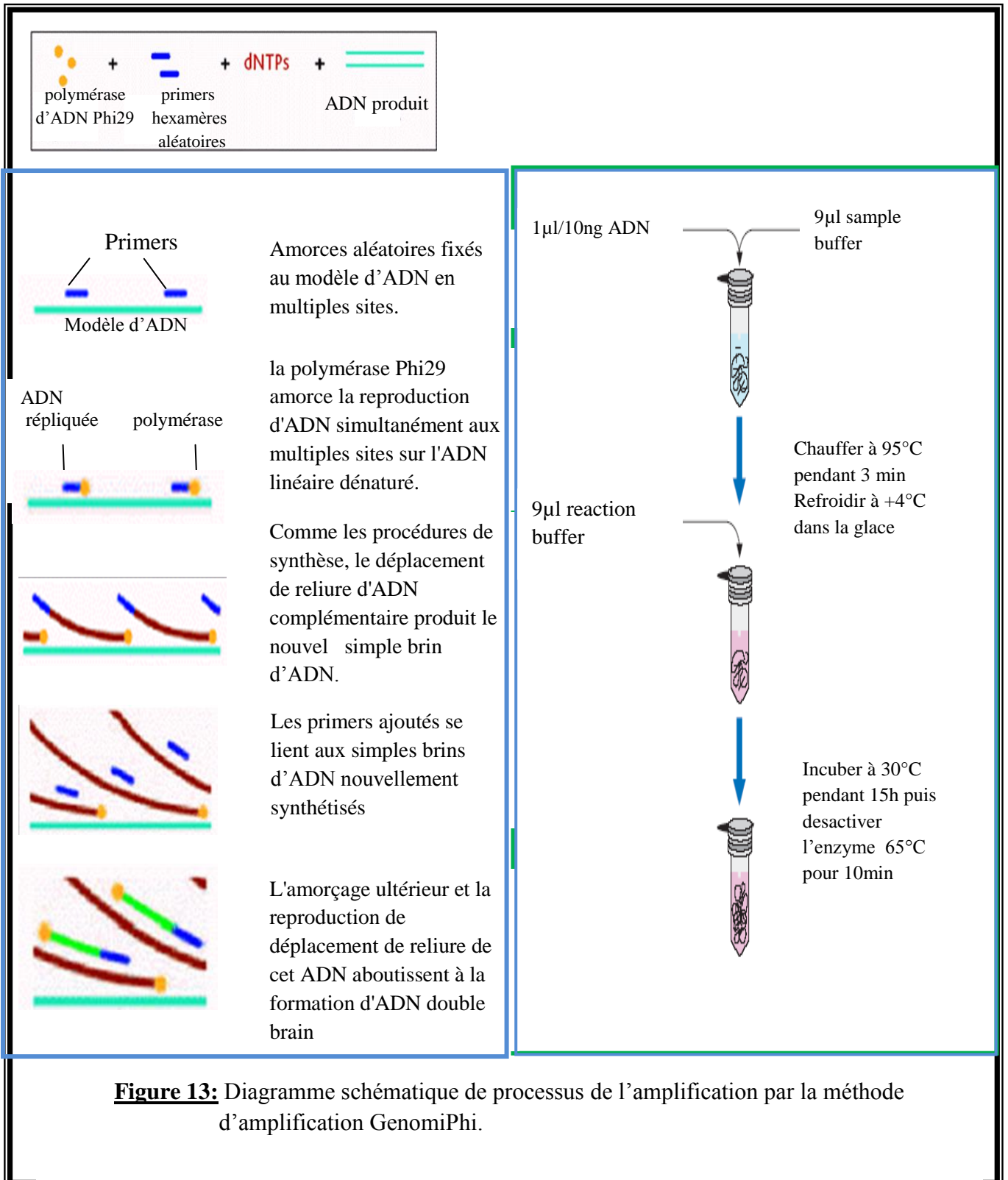
densifie le mélange pour empêcher l'ADN de s'échapper des puits du gel grâce au glycérol. La plaque est centrifugée 1 min à 1000 rpm puis 2 µl de mélange est déposé dans les puits de gel. Dans le premier puit du gel, il est déposé un marqueur de taille convenable à l'ADN génomique. Le marqueur utilisé dans le cadre de notre travail est le marqueur pUC19 commercialisée à une concentration initiale de 200 ng/ml et préparé à une dilution de 1/20 dans la solution de migration. La cuve d'électrophorèse est enfin soumise à un courant électrostatique de 80 V pendant 15 à 20 min. La molécule d'ADN se dirige vers le pôle positif (anode) dans un champ électrique puisque c'est une molécule acide qui se charge négativement dans le tampon TBE à pH 8.3. Après migration, l'ADN est visualisé sur un transilluminateur à lumière ultraviolette (320 nm) sous forme de bandes. Le système de visualisation utilisé dans le cadre de cette thèse est un transluminateurTM Fisher Bioblock Scientific connecté à un appareil de capture d'image Video Graphic UP895CE de Sony.

2. Amplification d'ADN par la technique GenomePhi:

Pour les échantillons d'ADN dont la concentration est insuffisante, une amplification de tout le génome est réalisée pour augmenter la quantité de l'ADN par la méthode d'amplification GenomePhi.

2.1. Principe de la technique GenomePhi:

La méthode GenomiPhi d'amplification de génome entier permet la formation des grandes quantités de plusieurs kilobase de l'ADN double brin. En utilisant cette procédure, les quantités de microgramme d'ADN de haut poids moléculaire sont obtenues à partir de peu d'ADN génomique (10 ng). Cette technique permet de réaliser un grand nombre de tests à partir de petites quantités de départ. La méthode de GenomiPhi utilise la polymérase des ADN des bactériophages Phi29, enzyme d'excellente activité, qui peut agir en association avec des amorces hexamères de séquences aléatoires pour amplifier l'ADN dans un processus isotherme (Figure 13).



2.2. Protocole de la technique GenomePhi:

Dans notre cas, pour les patients qui ont un nombre de globules blancs bas et par conséquent un rendement d'extraction d'ADN faible, nous avons entamé une amplification d'ADN par la technique GenomiPhi en utilisant le kit illustra™ GenomiPhi™ HY DNA Amplification (Applied Biosystems, USA) selon la procédure suivante:

Pour la dénaturalisation de l'ADN, 9µl de solution de dilution sont ajoutés à 1 µl d'ADN 10ng/ dans un tube eppendorff propre et incubé à une température de 95°C pendant 3 min puis refroidi dans la glace (+4°C) (Un temps d'incubation prolongé plus de 3 min risque d'altérer l'ADN). L'enzyme Master mix préparée dans la solution de réaction (1µl d'enzyme Mix/ 9µl de solution de réaction) est ajoutée au mélange maintenu et incubée à 30°C pendant 1h30 min et laissé inculé à 30°C pendant 15h. Le master mix contient toutes les composantes nécessaires à l'amplification de l'ADN. Le mélange réactionnel est chauffé par la suite à 65°C pendant 10 min pour inactiver l'enzyme *Phi29 DNA* polymérase puis refroidi dans la glace à +4°C. L'échauffement est nécessaire pour inactiver l'activité exonucléase de l'ADN qui peut, à basse température, commencer la dégradation des produits amplifiés. La qualité de produit de la réaction d'amplification par GenomePhi est vérifiée sur gel d'agarose à 0.8% puis les produits obtenus sont dilués dans l'eau pure et traités comme de l'ADN génomique.

3. Protocol de diagnostique de l'ADH:

Dans le cadre de cette thèse, et pour déterminer les mutations causantes de l'hypercholestérolémie autosomique dominante chez nos patients originaires du nord du Maroc cliniquement diagnostiqués ADH, nous avons utilisé la technique de séquençage direct automatique pour explorer la totalité du gène *LDLR*, les zones d'interaction avec le récepteur des LDL situées sur les exons 26 et 29 du gène *APOB* et la totalité du gène *PCSK9*. Nous l'avons utilisé aussi pour déterminer les isoformes du gène de l'apo E. La technique consiste en une succession d'une réaction d'amplification PCR et une réaction de séquençage. Ceci permet d'obtenir la séquence nucléotidique du fragment amplifié sans faire appel au sous clonage de ce dernier.

3.1. Analyse du gène *LDLR* :

3.1.1. Amplification de l'ADN par réaction de PCR :

La technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fut décrite en 1983 par Mullis. Elle permet d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Pour se faire, une série de réactions permettant la répllication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 18 à 30 nucléotides en général). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier et feront office d'amorces pour l'ADN polymérase.

- Le mélange réactionnel et les cycles de température (Figure 14)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, les amorces et les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) en excès suspendus dans la solution tampon. Le mélange réactionnel placé dans des microtubes ou dans les puits des plaques spécifiques (de 96 ou de 384 selon le nombre des échantillons et des exons amplifiés) est soumis à des cycles de températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, la microplaque 384 contenant le mélange réactionnel est placée dans un appareil programmable : Un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes de la microplaque à des températures choisies et pour des durées déterminées. Chaque cycle de la PCR comprend trois étapes. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures). Les thermocycleurs utilisés dans le cadre de notre travail sont : Applied Biosystems, GeneAmp® PCR System 9700, CA, USA et Applied Biosystems, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, CA, USA.

La dénaturation (1^{ère} phase de la PCR) : phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN. La température de la dénaturation est comprise entre 92°C et 95°C. A cette température, les liaisons hydrogènes se dissocient et les ADN double brins se séparent donnant ainsi des ADN simple-brins (ADN monocaténares). Cette phase s'effectue pendant 30 secondes à une minute.

L'hybridation (2^{ème} phase de la PCR): s'effectue à une température de 50°C à 70°C, dite température d'hybridation des amorces. Cette température d'hybridation est un paramètre important pour la réussite de la PCR et doit être calculée en fonction du Tm (Température de fusion ou Melting temperature) des deux amorces. Cette diminution de la température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire. La phase se réalise durant une période de 30 secondes à 1 minute.

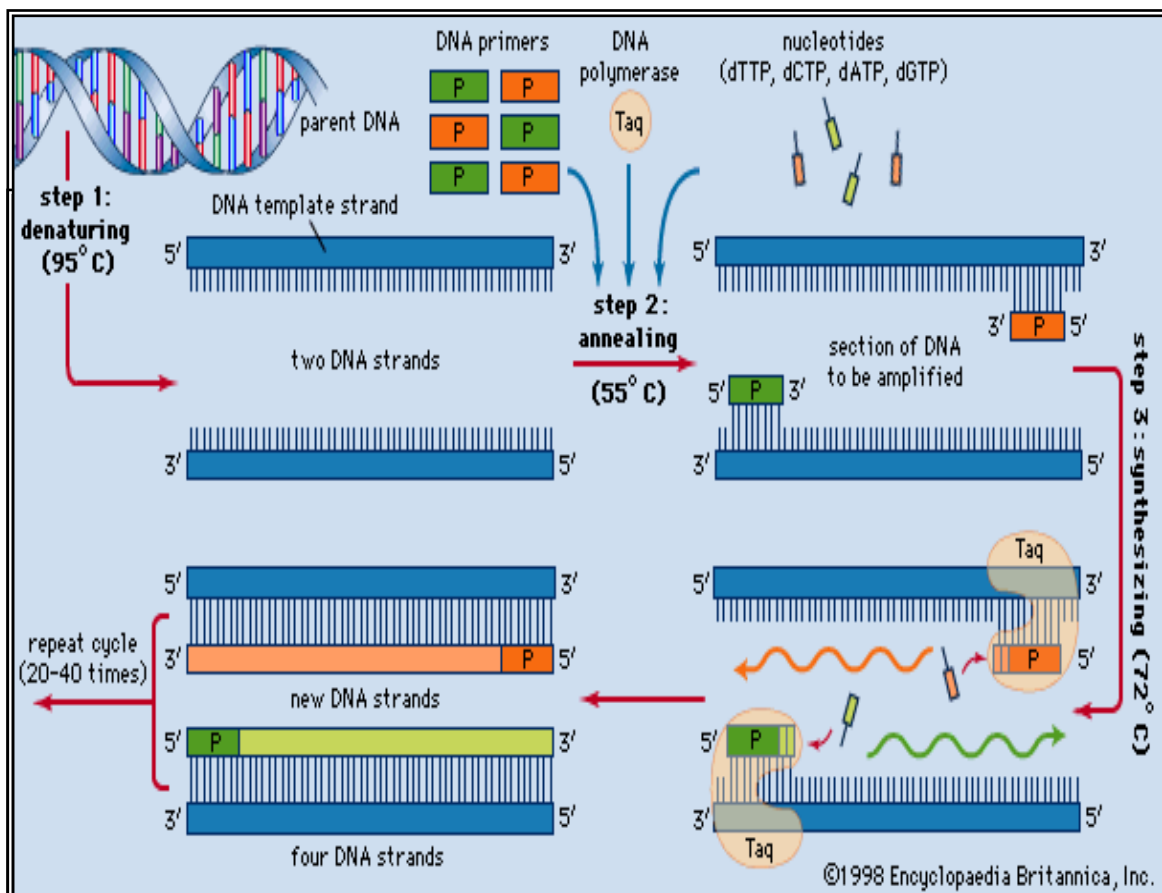


Figure 14: Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les amorces (primers) : ces oligonucléotides, qui vont servir d'amorces pour la réplication, sont synthétisés par voie chimique et doivent montrer la meilleure complémentarité possible avec les deux extrémités de la séquence d'intérêt que l'on souhaite amplifier. L'une des amorces est conçue pour reconnaître par complémentarité une séquence située en amont du brin 5' → 3' du fragment d'ADN d'intérêt ; l'autre pour reconnaître, toujours par complémentarité, une séquence située en amont du brin complémentaire (3' → 5') du même fragment d'ADN. La taille des amorces est généralement comprise entre 15 et 30 nucléotides afin de garantir une hybridation suffisamment spécifique sur les séquences d'intérêt de l'ADN matriciel. D'autres critères, importants mais secondaires par rapport aux précédents, doivent être pris en compte pour la conception et l'emploi des amorces. La séquence des amorces doit comporter la plus grande portion possible de guanines et de cytosines. En effet, la liaison entre guanines et cytosines est assurée par trois liaisons hydrogène au lieu de deux entre les adénines et les thymines, ce qui se traduit par une meilleure stabilité de la liaison au moment de l'hybridation des amorces. Plus les amorces sont riches en guanines et cytosines, plus leur température d'hybridation (T_m) peut être élevée et donc plus la spécificité de l'hybridation est grande. La température d'hybridation est en général comprise entre 40°C et 65°C, mais peut atteindre 70°C. A des températures d'hybridation basse, les amorces s'hybrident de façon beaucoup moins sélective ce qui peut se traduire par l'amplification de séquences d'ADN non souhaitées.

Les pourcentages en guanines et cytosines de chaque membre du couple d'amorces doivent être aussi proches que possible car la proportion de guanine et cytosine détermine la température d'hybridation. Si ces proportions diffèrent significativement d'une amorce à l'autre, il est très malaisé de définir une température d'hybridation convenable qui permet une hybridation équilibrée des amorces. D'autre part, les amorces ne doivent pas présenter une forte complémentarité de séquence pour qu'elles ne s'associent pas entre elles et n'effectuent pas correctement l'amorçage de la réplication.

Il faut encore noter que certaines modifications chimiques du milieu réactionnel permettent d'optimiser la spécificité d'hybridation des amorces. L'ajout de détergent ou de glycérol, par exemple, inhibe la formation des liaisons hydrogène, rend plus difficile l'hybridation des amorces et donc favorise sa spécificité.

L'élongation (3^{ème} phase de la PCR): Elle s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. A cette température, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaux amorcés et catalyse la réplication en utilisant les déoxyribonucléotides

triphosphates (dNTP) présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

Au cycle suivant, les fragments d'ADN synthétisés au cycle précédent servent à leur tour d'ADN matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0.1 µg). Chaque cycle va théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

Il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 72°C, notamment lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille (supérieure à 1 kilobase), à raison de 2 minutes par kilobase. Ceci permet d'achever l'élongation des fragments en cours de polymérisation et diminuer le nombre de fragments tronqués à cause d'un décrochage prématuré de la polymérase.

La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kilobases.

La Taq polymérase : l'ADN polymérase a pour rôle de répliquer dans la réaction. Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées (>100°C)), comme par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fidèles. Dans le cadre de cette thèse, toutes les réactions d'amplification réalisées ont été effectuées avec l'enzyme HotStart (HotStarTaq® Plus PCR; QIAGEN) dépourvue d'activité à température ambiante.

Les conditions réactionnelles : il existe une multitude de formules de milieux réactionnels. Il est toutefois possible de définir une formule standard qui convient à la plupart des réactions de polymérisation en chaîne. Cette formule a été choisie par la plupart des fabricants et fournisseurs qui délivrent une solution tampon prête à l'emploi avec la Taq polymérase. Concentrée 10 fois, sa formule est à peu près la suivante : 200 mM Tris-HCl, pH 8.4 et 500 mM KCl. Il est possible de rajouter des détergents ou du glycérol afin d'augmenter les conditions de stringence qui rendent plus difficile et donc plus sélective l'hybridation des amorces. Il est également possible de remplacer le KCl par le MgCl₂. En effet, certains couples d'amorces fonctionnent mieux avec des solutions enrichies en magnésium. D'autre part, lorsque de fortes concentrations en dNTP sont utilisées, il convient d'augmenter la concentration en magnésium à cause des interactions stœchiométriques entre le magnésium et

les dNTP qui réduisent la quantité de magnésium libre dans le milieu réactionnel. Les dNTP fournissent l'énergie et les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN lors de la polymérisation en chaîne. Ils sont incorporés au milieu réactionnel en excès, soit environ 200 μM . Selon le volume réactionnel, la concentration en amorces peut varier de 10 à 50 pmol par échantillon.

Pour garantir la réussite d'une PCR, il est nécessaire que l'ADN matriciel ne soit pas dégradé. Ce critère est évidemment d'autant plus crucial que la taille de la séquence d'intérêt est grande. Il est aussi important que l'extrait d'ADN ne soit pas contaminé par des inhibiteurs de la PCR (détergents, EDTA, phénol, protéines). La quantité d'ADN matriciel dans le milieu réactionnel, pour initier la réaction d'amplification, peut se réduire à une copie unique. La quantité maximale ne peut en aucun cas excéder 2 μg . En général, les quantités utilisées se situent dans une gamme comprise entre 10 et 500 ng d'ADN matriciel.

La quantité de la Taq polymérase par échantillon est généralement comprise entre 1 et 3 unités.

Le choix de la durée des cycles de température et du nombre de cycles dépend de la taille de la séquence d'intérêt ainsi que la taille et de la complémentarité des amorces. Il convient de réduire les durées au minimum non seulement pour un gain de temps mais pour prévenir le risque d'amplification non spécifique. Pour la dénaturation et l'hybridation des amorces, 30 secondes suffisent généralement. Pour l'élongation, il faut compter 1 minute par kilobase d'ADN d'intérêt et 2 minutes par kilobase pour le cycle final d'élongation. Le nombre de cycles, généralement compris entre 20 et 40 cycles, est inversement proportionnel à l'abondance en ADN matriciel.

Détection et analyse des produits de PCR : le produit d'une PCR est constitué d'un ou plusieurs fragments d'ADN. La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont visibles instantanément par transillumination aux ultraviolets (280 nm-320 nm). Des produits de très petite taille sont souvent visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles même. Selon les conditions réactionnelles, il arrive que des fragments non spécifiques d'ADN soient amplifiés en quantité plus ou moins abondante, formant des bandes nettes ou des trainées.

3.1.1.1. La technique de la PCR Hotstart :

3.1.1.1.1. Principe de la technique de la PCR HotStart :

La PCR "HotStart" est une modification de la PCR conventionnelle qui réduit l'amplification non spécifique durant l'ensemble des premières étapes de la PCR. Dans cette procédure, l'amplification ne peut avoir lieu que lorsque la température de la réaction dépasse celle de l'amplification non spécifique des amorces. Cette phase dans l'amplification est d'habitude accomplie en utilisant une polymérase d'ADN qui n'est active que lorsque des plus hautes températures sont atteintes. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé l'enzyme HotStart (HotStarTaq® Plus PCR; QIAGEN)

3.1.1.1.2. Enzyme Hotstart :

L'ADN polymérase a pour rôle de réplication dans la réaction de PCR. Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées (>100°C)), comme par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fiables. Un système d'enzyme spécialisée a été développé qui inhibe l'activité de polymérase à température ambiante, soit par combinaison à un anticorps (Sharkey et al, 1994) ou par la présence des liaisons covalentes inhibitrices qui se dissocient juste après haute température de la phase d'activation.

La HotStart Taq DNA Polymérase est désignée pour la PCR HotStart. La HotStart Taq DNA Polymérase a été modifiée chimiquement par l'addition de groupes de blocage de la chaleur propriétaire aux résidus d'acides aminés. A cause de cette modification, Hot Start Taq polymérase est inactive à température ambiante, évitant l'extension des amorces non spécifiquement amplifiés (produits de PCR non spécifiques) ou des dimères nucléotides et fourni une grande spécificité de l'amplification d'ADN. L'activité fonctionnelle de l'enzyme est restaurée durant une courte incubation (4 à 12 minutes) à 95°C. L'enzyme activée maintient la même fonctionnalité comme la Taq ADN polymérase : catalyse la synthèse 5' → 3' d'ADN, 3' → 5' n'est pas détectable corrigeant ainsi l'activité exonucléase, mais possède une faible activité 5' → 3' exonucléase. Elle montre une activité deoxynucléotidyl transférase, qui résulte fréquemment à l'addition d'extra adénines au 3' terminal de produits de PCR. Avant l'activation, les deux activités ne sont pas détectables.

3.1.1.1.3. La réaction d'amplification PCR HotStart:

Nous avons utilisé la technique de PCR Hot-Start pour amplifier la totalité du gène *LDLR* chez les 46 patients du nord du Maroc cliniquement diagnostiqués ADH.

- Séquences des amorces :

Les amorces sont désignées pour amplifier la région promotrice et les 18 exons incluant environ 50 pb des extrémités introniques du gène *LDLR*. Les séquences des amorces utilisées pour amplifier ce gène sont désignées par le logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) et sont synthétisées par Sigma. Toutes les amorces sont désignées avec une température de fusion T_m de 62°C. Le tableau 7 montre la liste des amorces utilisées et la taille des fragments amplifiés.

- Le mélange réactionnel :

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé avec un volume final de mélange réactionnel de 5 μ l.

La réaction d'amplification PCR HotStart, pour le promoteur et pour chaque exon, a été réalisée avec 50 ng d'ADN génomique dans un volume final de mélange réactionnel de 5 μ l. Les concentrations finales du mélange réactionnel sont comme suit: 1X tampon de la réaction du kit HotStarTaq Master Mix; Le chlorure de magnésium est contenu dans le tampon à une concentration réactionnelle finale de 1.5 mmol/l; 1X solutionQ du même kit ; 200 μ mol/l de chaque dNTP ; 0.5 μ mol/l de chaque amorce (Sigma) et 1U HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany).

Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène *LDLR*
(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_results_help.cgi - PRIMER_THREE)

Exons	Amorces	Taille du fragment amplifié (pb)
LDLR -P-5' LDLR -Ex1-3'	TCTATACACAATTCCTAGAAAGGAAAAGG GCCACGTCATTTACAGCAT	1680
LDLR -Ex1-5' LDLR -Ex1-3'	TCGAAACTCCTCCTCTTGCAG TCCATTACCCCAAGTCTC	152
LDLR -Ex2-5' LDLR -Ex2-3'	GTTCTGATCGGATGACATTTCTG CAGCGGATCACTTGAGACCAG	420
LDLR -Ex3-5' LDLR -Ex3-3'	ATTACAGGCGTGAGCCACTG GAGCAGGACCCCGTAGAGAC	460
LDLR -Ex4-5' LDLR -Ex4-3'	GGGCAGTGGTTCAGAGTCCAT ACTTTCTTGGCATGTTGTTGGAAA	660
LDLR -Ex5-5' LDLR -Ex5-3'	CTCCCAAAGTGCTGGGATTC AAGTCACTTGCCCACAGACG	370
LDLR -Ex6-5' LDLR -Ex6-3'	TGCATGCGTTCTTATGTGAATAAAC ACAGGGTGGGCAGAGTGG	329
LDLR -Ex7-5' LDLR -Ex7-3'	ATCACTTGAACCCGGGAGGT ATGGGGAAACTGAGGCATGA	330
LDLR -Ex8-5' LDLR -Ex8-3'	CTGTCTCCTGGCTGCCTTC TGAGTCTGTGCAAAGTTCAGAGG	341
LDLR -Ex9-5' LDLR -Ex9-3'	AGGATGACACAAGGGGATGG TGAGGCAGGAGGAGAGAAGG	350
LDLR -Ex10-5' LDLR -Ex10-3'	TGGTCTGACCTGTCCCAGAG TGCTTTGAGCCACCATGC	450

Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène *LDLR*
(suite)

Exons	Amorces	Taille du fragment amplifié (pb)
LDLR -Ex11-5' LDLR -Ex11-3'	AGCCTGGCTGTTTCTTCCAG CTTGTCCAGAGCCACCTG	310
LDLR -Ex12-5' LDLR -Ex12-3'	TGCCTCTCCAGGTGCTTTTC CAACCAGTTTTCTGCGTTCATC	390
LDLR -Ex13-5' LDLR -Ex13-3'	AGAGAGGGTGGCCTGTGTC TCCAGAACATTCCAGAGTTTCC	290
LDLR -Ex14-5' LDLR -Ex14-3'	ACCTCCTTGTGGAAACTCTGG TGAGTCCTTACAACGACCTTGAG	389
LDLR -Ex15-5' LDLR -Ex15-3'	GCCTCCCAAGGTCATTTGAG CACCTGGACTCCATCTCGTG	390
LDLR -Ex16-5' LDLR -Ex16-3'	AGATGTGCCAGGCGCTTT AGTGGGGCTGTTCCCTGTC	310
LDLR -Ex17-5' LDLR -Ex17-3'	CCAGGAGTCAAGGTTATGGTACG TTCACCTAATGCTGTCCTCGAT	421
* LDLR -Ex18-5' * LDLR -Ex18-3'	ATCCGGTACTCACCGTCTCC AACCAAATCCCAACCCAAG	382

* zone codante + annexes

- Les conditions d'amplification :

Les conditions thermocycliques d'amplification par PCR Hot Start adaptées lors de ce travail sont les suivantes:

Activation de l'enzyme Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymérase..	12 min à 95°C	} 40 cycles
Dénaturation	15s à 95°C	
Hybridation	15s à 62°C	
Elongation	30s et 40s à 72°C	
Elongation finale.....	3 min à 72°C.	

Deux types d'appareils (thermocycleur) ont été utilisés au cours de notre travail: Applied Biosystems, GeneAmp® PCR System 9700 et Applied Biosystems, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler.

3.1.2. Vérification de la qualité des produits de PCR double brin:

La vérification de la qualité des produits de PCR peut être rapidement réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose. Nous avons réalisé cette étape par migration d'une petite partie des produits de PCR (2 µl) sur gel d'agarose à 2% (0,8 g agarose D-1 Low EEO et 1,6 g d'agarose MS-8) dans le tampon TBE à 1%. Les produits de PCR sont révélés par une coloration au bromure d'éthidium. Ils sont visibles par transillumination aux ultra-violets (280 nm- 320 nm). Les produits de PCR de bonne qualité doivent donner des bandes claires après migration sur gel d'agarose à 2%. Des produits de très petites tailles sont visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles mêmes. Donc une purification de ces produits de PCR est nécessaire pour éliminer tout produit inutile.

3.1.3. Purification des produits de PCR double brin :

Les produits de PCR sont purifiés pour éliminer l'ADN génomique qui a servi de matrice, les amorces et les nucléotides résiduels, le tampon et d'éventuelles bandes parasites qui peuvent gêner la réaction de séquençage.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé, pour la purification des produits de PCR, la technique de purification des produits de PCR par les billes paramagnétiques. Les billes paramagnétiques que nous avons utilisées sont commercialisées sous forme du kit Aagencourt® AMPure® PCR Purification system (Beckman, Coulter, U.S.). Cette technique utilise une phase solide de billes paramagnétiques pour la haute purification de produits de PCR. Les billes paramagnétiques "AMPure" sont commercialisées sous forme du kit Aagencourt® AMPure® PCR Purification system (Beckman, Coulter, U.S.). Aagencourt AMPure utilise un amortisseur optimisé pour lier sélectivement les produits de PCR, 100 pb ou plus, aux billes paramagnétiques. L'excès des amorces, des dNTPs, des sels et des enzymes peut être enlevé utilisant une procédure simple de lavage (Figure 15). Le produit PCR purifié résultant est essentiellement sans polluants et peut être utilisé dans le séquençage d'ADN fluorescent, y compris l'électrophorèse capillaire.

Aux produits de PCR (5 µl) déposés dans les puits d'une plaque, sont ajoutés 1.8 µl de billes magnétiques "AMPure". La plaque est fermée à l'aide d'un film en plastique. Le mélange est agité par vortex puis centrifugé 1 min à 1000 rpm. La plaque est par la suite fixée sur un bloc magnétique pendant 3 à 5 min. Les produits de PCR sont fixés par les billes paramagnétiques "AMPure" et attirés vers les parois des puits par le bloc magnétique et donc séparés des contaminants. Le surnageant contenant les contaminants est jeté et éliminé au maximum à l'aide d'un papier buvard. La plaque est retirée du bloc magnétique, le lavage des produits de PCR est fait par 20 µl d'éthanol 70 %. Le mélange est vortexé puis centrifugé 1min à 1000 rpm. La plaque est fixée à nouveau sur le bloc magnétique pour éliminer le surnageant puis laissée sécher pendant 10 min. L'éluat des produits de PCR purifiés, est faite dans 6 à 10 µl d'eau ultrapure. L'éluat des produits de PCR purifiés est transféré dans une autre plaque.

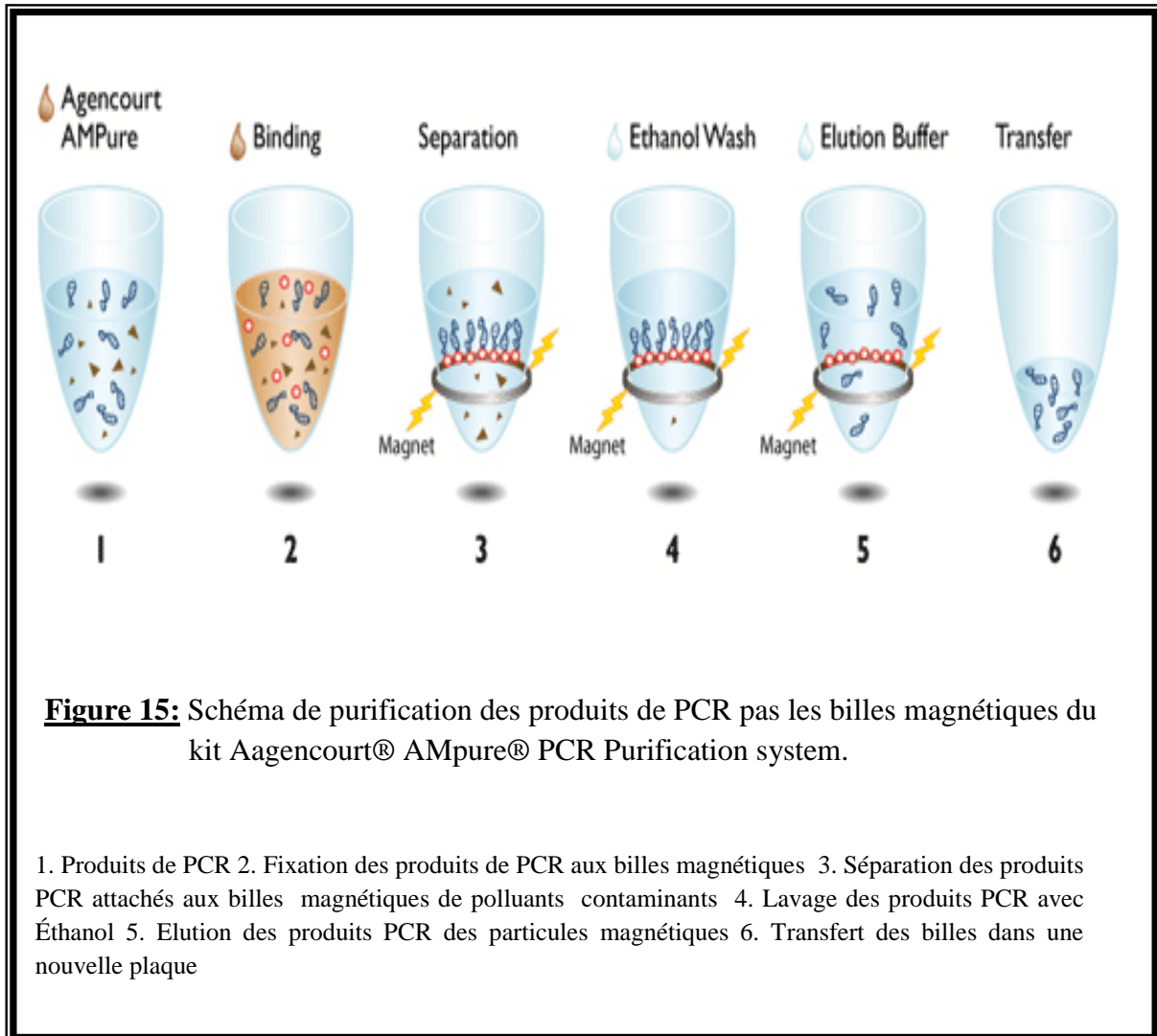


Figure 15: Schéma de purification des produits de PCR pas les billes magnétiques du kit Aagencourt® AMPure® PCR Purification system.

1. Produits de PCR 2. Fixation des produits de PCR aux billes magnétiques 3. Séparation des produits PCR attachés aux billes magnétiques de polluants contaminants 4. Lavage des produits PCR avec Éthanol 5. Elution des produits PCR des particules magnétiques 6. Transfert des billes dans une nouvelle plaque

3.1.4. Séquençage de l'ADN:

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Il a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger en Grande-Bretagne (Sanger et al, 1977 ; Staden, 1979). Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés : l'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective (Maxam et Gilbert, 1977).

Au cours des 25 dernières années, la méthode de Sanger a été largement développée grâce à plusieurs avancées technologiques importantes telles que le développement de la synthèse chimique automatisée des oligonucléotides qui sont utilisés comme amorces dans la synthèse, l'introduction de traceurs fluorescents à la place des marqueurs radioactifs utilisés initialement, l'adaptation de la technique PCR pour le séquençage et automatisation de la technique. La méthode de Maxam et Gilbert nécessite des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'analyser (< 250 nucléotides). Moins facile à robotiser, son usage est devenu aujourd'hui discret.

Le principe de la méthode de Sanger consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par le fragment de Klenow (une ADN polymérase I dépourvue d'activité exonucléase 5'→3') et maintenant par des ADN polymérases thermostables, celles qui sont utilisées pour la PCR. Ces didésoxynucléotides, agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents. Par exemple, dans la réaction où on a ajouté du ddGTP, la synthèse s'arrête au niveau des G. Le mélange réactionnel contenant, à la fois du dGTP et un peu de ddGTP, la terminaison se fait de manière statistique selon que l'ADN polymérase utilise l'un ou l'autre de ces nucléotides. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent tous au niveau d'un des G dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur

un gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de repérer la position des G dans la séquence. La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur dans l'ADN synthétisé. Initialement ce traceur était radioactif, aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents, attachés soit à l'oligonucléotide, soit au didésoxyribonucléotide.

Le séquençage est de plus en plus automatisé. Le principe reste le même mais le marquage et le mode de détection sont différents. Se sont les ddNTP qui sont marqués avec un fluorochrome. Chaque ddNTP porte un fluorochrome qui émet dans une gamme de longueur d'onde différente de celle des autres. Il est donc possible de repérer individuellement les quatre types de marquage dans un mélange, c'est comme si chacun était peint d'une couleur différente. Le mélange d'ADN matrice, d'amorces, des dNTP, de la polymérase et des quatre ddNTP marqués est soumis à une électrophorèse. Au fur et à mesure de la migration, quatre capteurs (un par longueur d'onde différente) enregistrent la lumière émise par les molécules terminées par un ddNTP. Ces 4 graphes sont superposés et un logiciel traduit ce pictogramme en séquence.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé la technique de séquençage automatique après la réaction PCR.

3.1.4.1. Réaction de séquençage:

Les réactions de séquençage ont été faites avec les réactifs du kit "Applied Biosystems BigDye® Terminator v3.1".

Deux mélanges réactionnels d'environ 5 µl de volume final chacun sont préparés pour amplifier séparément chaque amorce 3' et 5' du même exon. Chaque mélange réactionnel est composé de 1 µl de tampon de séquençage (1X), 0,4 µl de BigDye, 0,3 µl de DMSO et 0,3 µl d'eau pure pour avoir un volume final de 2,5 µl. Ensuite, 2,5 à 3 µl de produit de PCR purifiés sont utilisés dans chaque réaction. Les volumes des amorces, pour une concentration finale de 1 µM, ont été fixés à 0,5 µl de chaque fragment 3' et 5'.

Les mélanges réactionnels sont soumis à une dénaturation initiale de 10 min à 96°C suivies de 40 cycles d'amplification sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquençage. Un cycle correspond à une étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 30sec, une étape d'hybridation à 62°C pendant 4 min et une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 62°C pendant 15 sec.

3.1.4.2. Purification des produits de la réaction de séquence:

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier les produits de séquençage. Pour ce fait, nous avons utilisé la technique chimique à base de billes paramagnétiques dont le principe consiste à immobiliser des acides nucléiques sur des microparticules paramagnétiques dans des conditions spécifiques d'amortisseur. Les polluants sont ainsi enlevés facilement sans faire appel à la centrifugation ou à la filtration (même protocole que la purification des produits de PCR).

Pour la purification des produits de séquençage, nous avons utilisé les billes paramagnétique "CleanSeq" du kit "Agencourt® CleanSeq® Dye-Terminator Removal ABI Big Dye Terminator".

3.1.4.3. Analyse des séquences :

Nous avons utilisé l'analyseur génétique 3730® (ABI). L'appareil est composé de 96 capillaires remplis d'un polymère qui sert de tamis moléculaire, d'un système d'électrophorèse, d'un laser et d'une caméra CCD (*Charge-Coupled Device*).

Les produits purifiés sont introduits à une extrémité des capillaires par électro-injection dans lesquels ils seront soumis à une électrophorèse sous un très haut voltage (8500 volts) de façon à les séparer en fonction de leur longueur. Près de l'anode, un rayon laser traverse chaque capillaire afin d'exciter les ddNTP fluorescents incorporées à l'ADN au cours de la réaction de séquençage. La caméra CCD mesure l'émission de fluorescence au fur et à mesure que les copies d'ADN passent devant le laser. Les ddNTP fluorescents sont distingués les uns des autres selon la longueur d'onde émise. Les données brutes sont stockées sur la base Oracle de l'ordinateur. A la fin de cette collection, les séquences brutes sont automatiquement extraites et analysées par le logiciel "Data Analysis" au cours d'une étape appelée "Base calling" (assignation des bases).

Les géotypes du gène étudié sont lus en utilisant un logiciel de géotypage : SeqScan, version 3.1 fourni par la société ABI.

3.2. Analyse du gène *APOB* :

Il est connu que l'ensemble des mutations détectées jusqu'à nos jours sur le gène *APOB* sont situées sur les exons 26 et 29. Pour identifier les mutations possibles sur le gène *APOB* dans notre population nous avons appliqué la méthode de diagnostic génétique direct, comme pour le gène *LDLR*, en utilisant la technique de séquençage automatique direct. La réaction de PCR utilisée dans le cadre de notre travail est la PCR HotStart.

Les mutations sont restreintes à la zone d'union au récepteur des LDL. Pour ce fait, nous avons analysé les exons 26 et 29 comportant ces zones d'interaction avec le récepteur.

Les amorces sont désignées pour amplifier quatre zones de l'exon 26: la zone apoB26z2 qui code à partir du résidu 1560 jusqu'au résidu 1800, la zone apoB26z3 qui code à partir du résidu 1763 jusqu'au résidu 1990, la zone apoB3500 qui code à partir du résidu 3478 jusqu'au résidu 3554 et la zone apoB26z11 qui code à partir du résidu 3464 jusqu'au résidu 3575 et une zone de l'exon 29: apoB29z2 qui code à partir du résidu 4189 jusqu'au résidu 4413.

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier ce gène sont désignées par le logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) et sont synthétisées par Sigma. Toutes les amorces sont désignées avec une température de fusion T_m de 62°C. Le tableau 8 montre la liste des amorces utilisées et la taille des fragments amplifiés.

Le mélange réactionnel utilisé pour la réaction d'amplification PCR HotStart et les conditions thermocycliques sont identiques à ceux décrits précédemment. Après la réaction de PCR, nous avons procédé à une purification des produits de PCR par les billes magnétiques. Ces produits de PCR purifiés ont ensuite subi une réaction de séquençage dont le milieu réactionnel et les conditions d'amplification sont identiques à ceux décrits dans le cas précédent. L'analyse des séquences des zones étudiées des exons 26 et 29 du gène *APOB* est réalisée par l'analyseur génétique 3730[®] (ABI) et les génotypes du gène *APOB* sont lus en utilisant le logiciel de génotypage : SeqScan, version 3.1 fourni par la société ABI.

Tableau 8: Liste des amorces utilisées pour l'exploration des exons 26 et 29 du gène *APOB*.

Exons	Amorces	Taille du fragment amplifié (bp)
ApoB-Ex26z2-5' ApoB-Ex26z2-3'	CCCTAAAGTATGAGAACTACGAGCTG CCAGAGAATAGGGCTGTAGCTG	720
ApoB-Ex26z3-5' ApoB-Ex26z3-3'	TCACTGGACTTCTCTCAAACTTG TGAGTTTCCAGGTGCCTGTC	680
ApoB 3500-5' ApoB 3500-3'	ACAAATTAGAGGGCACCACAAGAT GCTTCTCCAGCAAATTTTCTTTT	600
ApoB-E26z11-5 ApoB-E26z11-3	TTCATCTTCATCTGTCATTGATGC TCGTA CTGTGCTCCCAGAGG	625
ApoB-Ex29z2-5' ApoB-Ex29z2-3'	GGGGAAACCTGGGATATACAC AGAATGGAAGTCCTTAAGAGCAAC	670

3.3. Analyse du gène *PCSK9* :

Le gène *PCSK9* est le troisième gène impliqué dans les hypercholestérolémies autosomiques dominantes. L'identification des mutations possibles sur ce gène est réalisée également par un séquençage direct automatique en analysant la région promotrice et les 12 exons incluant environ 50 à 60 pb des extrémités introniques.

Les amorces sont désignées pour amplifier la totalité du gène *PCSK9*. Elles sont désignées par le logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) et sont synthétisées par Sigma. Toutes les amorces sont désignées avec une température de fusion (T_m) de 62°C. Le tableau 9 montre la liste des amorces utilisées et la taille des fragments amplifiés.

Des réactions PCR HotStart ont été réalisées pour amplifier la totalité du gène *PCSK9* dans les mêmes conditions réactionnelles et thermocycliques décrites précédemment.

Les produits de PCR sont purifiés par la technique des billes magnétiques. Ces produits ont subi une réaction de séquençage dont le milieu réactionnel et les conditions d'amplification sont identiques à ceux décrits précédemment. L'analyse des séquences est réalisée par l'analyseur génétique 3730[®] (ABI) et les génotypes du gène *PCSK9* sont lus en utilisant le logiciel de génotypage : SeqScan, version 3.1 fourni par la société ABI.

Tableau 9: Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène PCSK9

Exons	Amorces	Taille du fragment amplifié (pb)
PCSK9-P-5 PCSK9-P-3	TGTAGGCTGGACATCAAAAGCAAG CTCACTCCTCCAGGCTCAGACC	635
PCSK9-PE1-5 PCSK9-PE1-3	TTAATCAGATAGGATCGTCCGATGG AAACTGAGGCCCGAGAGGAAAC	680
PCSK9-E2-5 PCSK9-E2-3	CTGTTGTGTCTCTTTTGTGTAATTTG ACATACTTGCTGTCCCCTTCTG	450
PCSK9-E3-5 PCSK9-E3-3	CTGGGATGTGGGGACAGG AGAAGTGGAACCACCAGCAG	360
PCSK9-E4-5 PCSK9-E4-3	GAATAGGATGTAGTGTGTGAGGATTTT AGGGAGGGGACAGTGACAG	480
PCSK9-E5-5 PCSK9-E5-3	CTGCCATATCCCCATCCT TTGGCACTCTGGTTCTCTGG	510
PCSK9-E6-5 PCSK9-E6-3	CCAAACATCAGGCCACAAAG TTCAAAGCCAGAAGGGTTC	480
PCSK9-E7-3 PCSK9-E7-3	TAGGAGGGGACATTTGAGTGG CAGGCCTACTTCATCTCTGGTC	440
PCSK9-E8-5 PCSK9-E8-3	TGTATGTGTGTGCGTGTGTGC GGTGGCGTCATCCTCCTTAC	400

Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour l'exploration de l'ensemble du gène PCSK9
(suite)

Exons	Amorces	Taille du fragment amplifié (pb)
PCSK-E9-5	TGTTCTTTAAGCCCTCCTCTCTCC	430
PCSK-E9-3	GCTTACAGAAGAGCTGGAGTCTGG	
PCSK9-E10-5	AACAGTCTTCCTTGGGCAGGAGT	420
PCSK9-E10-3	GAAGTGGCAGAACCAGAGTATGGA	
PCSK9-E11-5	TTCCTAGCTCTTGCCTCAGACC	450
PCSK9-E11-3	GTCCACACAATGGCGGAAG	
PCSK9-E12a-5	TCTGCACTTTGGCCTCACAG	610
PCSK9-E12a-3	GCTCGACCTGTTTGAATGGTG	
PCSK9-E12b-5	CTCACTCTGGGTGCCTCCTC	540
PCSK9-E12b-3	TGCCGAGTCAGTCCTAGGTG	
PCSK9-E12c-5	CTGCTCTATGCCAGGCTGTG	758
PCSK9-E12c-3	AACTATTCAACAACTTACCCAGTTCC	

4. Détermination des génotypes de l'apolipoprotéine E :

Les trois sites polymorphes du gène de l'apoE sont très bien décrits dans la littérature. Un diagnostic génétique direct permet de les identifier dans la population étudiée. La technique de séquençage automatique permet l'identification des allèles du polymorphisme de l'apoE chez les 46 probands hypercholestérolémiques intégrés dans notre étude. Les trois sites polymorphes sont situés sur l'exon 4 du gène de l'apoE. La paire d'amorces utilisée pour amplifier l'exon 4 du gène de l'apoE est désignée par le logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) avec une température de fusion T_m de 62°C et sont synthétisées par Sigma. La taille de fragment amplifiée est de 600 pb. Cette paire d'amorce est la suivante:

apoE E4 5' : TAAGCT TGGCACGGCTGTCCAAGGA

apoE E4 3' : ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACTACTGCC

Une réaction PCR HotStart a été réalisée pour amplifier l'exon 4 du gène de l'apoE dans les mêmes conditions réactionnelles et thermocycliques décrites précédemment.

Les produits de PCR purifiés par la technique des billes magnétiques ont subi une réaction de séquençage dans un milieu réactionnel et des conditions d'amplification identiques à ceux décrits précédemment. L'analyse des séquences est réalisée par l'analyseur génétique 3730[®] (ABI) et les génotypes du gène de l'apoE sont lus en utilisant le logiciel de génotypage : SeqScan, version 3.1 fourni par la société ABI.

D. Analyse statistique:

Les moyennes et les écartypes ont été calculés par calcul direct sur Excel (office 2007). Le programme ANOVA du logiciel STATISTICA version 8 a été utilisé pour évaluer les différences de paramètres cliniques et biologiques entre les groupes de patients et témoins, et entre les différents groupes de patients.

Résultats

A. Phénotype clinique et biologique de l'ADH chez les patients du Nord du Maroc :

Les principales caractéristiques de diagnostic clinique et biochimique de l'ADH sont : un taux élevé de cholestérol sérique (plasmatique), la présence de xanthomes tendineux chez le patient ou un de ses parents de premier degré et les antécédents familiaux en hypercholestérolémie ou en maladie coronarienne. Les outils de diagnostic que nous avons utilisés pour identifier les patients du nord du Maroc qui présentent un phénotype clinique et biochimique de l'ADH, sont ceux développés par les trois programmes reconnus par l'organisation mondiale de la santé (OMS) : le Programme "MEDPED" aux Etats Unis, le "Simon Broome Register Group" au Royaume Uni, et le "Dutch Lipid Clinic Network":

1. Selon le programme MEDPED (Make Early Diagnosis-Prevent Early Death):

Les premiers outils que nous avons utilisés pour sélectionner nos patients sont les critères du programme MEDPED qui utilisent des valeurs seuils du taux de cholestérol total spécifiques à l'âge de l'individu et ces antécédents familiaux. Ces valeurs seuils sont fixées pour l'adulte à un taux de cholestérol total >250 mg/dl et à un taux de LDLc >190 mg/ dl. Le taux de cholestérol sérique (ou plasmatique) est en grande partie modulé par différents facteurs environnementaux comme l'âge, le sexe, le statut hormonal, quelques maladies aiguës et l'origine ethnique de la population. Pour cette raison, quatre mesures élevées de cholestérol sérique ont été exigées avant de sélectionner nos patients pour un diagnostic de l'hypercholestérolémie.

Les taux de cholestérol total et de cholestérol LDL caractéristiques de l'ADH chevauchent avec ceux de l'hypercholestérolémie mixte, ce qui rend le taux de cholestérol seul insuffisant pour confirmer le diagnostic de l'ADH (Goldstein et Brown, 1989 ; Marks et al, 2003; Williams et al, 1993; Nora et al, 1985 ; Varret et al, 2008). Ceci fait appel à d'autres approches complémentaires de diagnostic de l'ADH.

2. Selon Simon Broome Register Group Criteria:

A côté des taux de cholestérol, les signes cliniques et les antécédents familiaux sont devenus des critères largement utilisés pour le diagnostic clinique de l'ADH. L'approche de Simon Broome Register Group Criteria tient compte, en plus des taux élevés de CT et de LDLc, de la présence de xanthomes tendineux chez le patient ou un de ses parents de premier

degré et les antécédents familiaux d'infarctus du myocarde avant l'âge de 50 ans et/ou l'augmentation de taux de cholestérol chez un parent du premier ou de second degré.

3. Selon le Dutch lipid Clinic Network Criteria

Grâce aux données cliniques et biochimiques, cette approche permet de proposer un classement des patients dans des catégories de diagnostique (certain, probable et possible) en leur attribuant un score appelé score FH.

Suivant les directives de ces trois programmes nous avons pu identifier un groupe de patients formé de 46 probands dont 27 femmes et 19 hommes d'âges moyens 57 ± 9 ans et 57 ± 7 ans respectivement. Tous les patients sont originaires de la région nord du Maroc : Tanger, Assilah, Tétouan, Sebta, Larache, Chefchaouen et El Hoceima. Les caractéristiques cliniques et biologiques de base de ces patients sont représentées dans le tableau 10. Grâce à ces caractéristiques, nous avons pu proposer un classement des patients dans des catégories de diagnostique en leur attribuant un score FH selon le programme "Dutch lipid Clinic Network". Le tableau 11 montre les propositions de classement des patients dans chaque catégorie. Les résultats ont montré que 19 patients (41%) présentent un score FH supérieur ou égale à 8 (Score FH >8). Ils sont diagnostiqués comme "certains" pour l'ADH. Treize patients (28%) présentent un score FH entre 6 et 8 points. Ils sont diagnostiqués "probable" et 14 patients (30%) présentent un score FH entre 3 et 5 points sont proposés comme "possible" pour l'ADH selon le "Dutch lipid Clinic Network criteria". L'absence des antécédents familiaux en hypercholestérolémie et en maladies cardiovasculaires peut influencer la classification des patients entre les différentes catégories. Par conséquent, nous avons intégré dans notre étude génétique les patients qui sont considérés "possible" ADH selon le Dutch lipid Clinic Network.

L'analyse des paramètres biochimiques des patients a montré une valeur moyenne de taux du cholestérol total de 300 ± 39 mg/dl chez les sujets étudiés. Les résultats ont montré une élévation significative de taux de cholestérol total chez les hommes par rapport aux femmes. Les valeurs moyennes du LDLc et du HDLc présentées par nos patients sont respectivement de 218 ± 31 mg/dl et de 46 ± 13 mg/dl. La comparaison des taux du LDLc entre les hommes et les femmes n'a pas montré de différence significative (hommes : LDLc = 219 ± 34 , femmes : LDLc = 221 ± 46). Les concentrations moyennes de HDLc ont été significativement élevés

Tableau 10: Caractéristiques cliniques et biologiques de base des 46 patients sélectionnés selon les deux approches de diagnostic de l'ADH (MEDPED et Simon Broome Register Group Criteria)

Caractéristiques	Femmes	Hommes	Total
Nombre	27	19	46
Age (ans)	57±9	57±7	57±10
BMI (kg/m²)	28±4	27±3	28±4
CT (mg/dl)	294±45*	301±24*	300±39
LDLc (mg/dl)	221±46	219±34	218±31
HDLc (mg/dl)	49±12*	42±14*	46±13
Apo B (mg/dl)	158±43	144±32	152±39
MCV (n, %)	7 (26)	4 (21)	11 (24)
MCVP (n, %)	4 (15)	2 (11)	6 (13)
AVC (n, %)	2 (7%)	0	2 (4%)
TA (mmHg)	14±2	14±2	14±2
Tabac (n, %)	0	5 (28)	5 (11)
t.Xt (n, %)	3 (11)	1 (5)	4 (9)
s.Xt (n, %)	8 (30)	7 (37)	15 (33)
AC (n, %)	3 (11)	1 (5)	4 (9)
AF (n, %)	13 (48)	10 (53)	23 (50)

*P<0.001

CT: cholestérol total; LDLc: cholestérol LDL; MCV: maladie cardiovasculaire; MCVP: maladie cardiovasculaire prématurée; AVC: attaque cérébrovasculaire; TA: tension artérielle; t.Xt: Xanthomes tendineux; s.Xt: xanthomes cutanés; AC: arc cornéen; AF: antécédents familiaux.

Tableau 11: Proposition de classement des patients basée sur le score FH selon le "Dutch lipid Clinic Network criteria"

Scores	Catégorie	Nombre (%)
> 8 points	Certain	19 (41%)
6 - 8 points	Probable	13 (28%)
3 - 5 points	Possible	14 (30%)

chez les femmes par rapport aux hommes (hommes : HDLc= 42±14, femmes: HDLc= 49±12; $p < 0,0008$). La comparaison des concentrations des triglycérides et de l'apolipoprotéine B entre les hommes et les femmes n'a pas montré de différence significative (TG: 148±68mg/dl pour les hommes et 141±58 mg/dl pour les femmes; apo B : 144±32 mg/dl pour les hommes et 158±43 mg/dl pour les femmes).

En plus des paramètres biochimiques, les caractéristiques cliniques forment une base de données importantes pour le diagnostic clinique de l'ADH. Nos résultats ont montré une fréquence élevée de MCV (24% de l'ensemble des patients étudiés). Cette fréquence est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (26% et 21% respectivement). Les maladies cardiovasculaires prématurées sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (15% et 11% respectivement). La maladie cérébrovasculaire (AVC) n'a été présente que chez 7% des femmes et elle est absente chez les hommes. Les facteurs de risque des maladies cardiaques (maladies cardiovasculaires et les maladies cérébrovasculaires) déterminés chez nos patients hypercholestérolémiques sont l'indice de masse corporelle (BMI), la tension artérielle (TA) et le tabagisme. L'étude comparative de ces facteurs effectuée entre le groupe des femmes et le groupe des hommes a montré que le BMI reste comparable entre les deux groupes. Les deux groupes ont présentés une tension artérielle élevée (14 mm Hg). Les antécédents familiaux en maladies cardiaques et en hypercholestérolémie ne sont obtenus que pour 50% des patients dont 22% des hommes et 28% des femmes. Le tabagisme est le facteur de risque qui est relevé seulement chez le sexe masculin dans la population étudiée. La présence des xanthomes tendineux et/ou cutanés et

de l'arc cornéen est un autre critère de sélection des patients ADH selon "Simon Broome Register group". Un résultat important de notre étude est la fréquence remarquablement élevée des xanthomes chez notre population avec un pourcentage de 9% de xanthomes tendineux, portés par 11% des femmes et 5% des hommes et 33% pour les xanthomes cutanés présents chez 30 % des femmes et 37% des hommes. En outre, 50 % des patients qui présentent la maladie cardiovasculaire prématurée portent des xanthomes tendineux. L'arc cornéen a été présent chez 11% des femmes et 5% des hommes avec une fréquence totale de 9%.

En parallèle, un groupe de témoins a été formé de 89 sujets volontaires normocholestérolémiques indépendants, d'âge et de sexe comparables à ceux des patients et originaires de la même région. La comparaison des caractéristiques biologiques : les valeurs moyennes des BMI, des taux de cholestérol total, du cholestérol LDL, des triglycérides et de l'apoB a montré une différence significative ($p < 0.0001$) entre les deux groupes patients et témoins. Aucune différence significative n'a été montrée entre les deux groupes concernant les taux moyens de cholestérol HDL (Tableau 12 ; Figure 16).

Même en utilisant ces trois approches, le diagnostic de l'ADH n'est pas toujours clair et il est parfois difficile de différencier l'ADH des autres types d'hypercholestérolémies comme l'hypercholestérolémie familial mixte ou l'hypercholestérolémie polygéniques (Goldstein et al, 1973 ; Varret et al, 2008). En plus, Il n'existe pas de caractéristiques spécifiques pour le diagnostic individuel de l'HF, la FDB ou l'hypercholestérolémie associée aux mutations du gène *PCSK9*. Par conséquent, l'approche génétique est nécessaire pour diagnostiquer toutes les formes d'ADH.

Tableau 12: Caractéristiques biologiques des 46 patients et des témoins

	Patients	Témoins	V. limites
Nombre	46	89	
Age (ans)	57±10	52±9	
BMI	28±4	25 + 3*	<30
CT	300±39	167 ± 25*	<250
LDLc	218±31	105 ± 28*	<200
TG	144±67	100 ± 34*	<160
HDLc	46±13	45 ± 12	>45
ApoB	152±39	120±26*	<100

*p <0.0001

Toutes les unités sont en mg/dl, sauf pour le BMI (kg/m²).

CT: cholestérol total; LDLc: cholestérol LDL; HDLc : cholestérol HDL ; TG : triglycérides ; BMI : indice de masse corporelle ; apo B : apolipoprotéine B ; V. limites: valeurs limites.

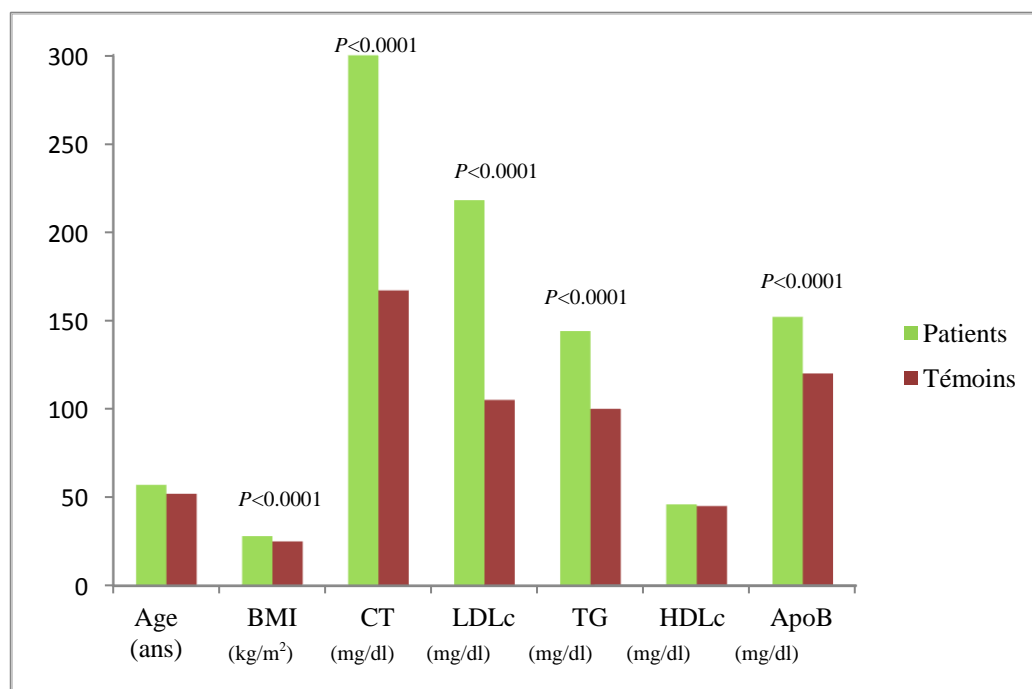


Figure 16 : Comparaison des caractéristiques biologiques entre les patients et des témoins

B. Spectre génétique de l'hypercholestérolémie a transmission autosomique dominante (ADH) au Nord du Maroc :

À ce jour, l'hypercholestérolémie familiale à transmission autosomique dominante (ADH) est due à des défauts moléculaires au niveau de trois gènes majeurs: le gène *LDLR*, le gène *APOB* et le gène *PCSK9*.

1. Gène de récepteur des LDL (*LDLR*):

Actuellement, 1700 mutations touchant le gène *LDLR* ont été rapportées dans le monde entier (Akl et Georges, 2011). Ces mutations sont représentées dans la base de données de l'université de London (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>). Ces mutations sont répertoriées le long du gène *LDLR*.

1.1. L'Hypercholestérolémie Familiale au nord du Maroc

Nous avons utilisé la technique de séquençage direct automatique pour identifier les mutations ponctuelles et les réarrangements mineurs, chez 46 probands cliniquement diagnostiqués ADH. Nous avons analysé la totalité du gène *LDLR* : La région promotrice et les 18 exons y compris les 50 pb des extrémités introniques du gène *LDLR*. Au total, nous avons identifié quatre mutations ponctuelles causantes de l'HF chez la population du nord du Maroc (Tableau 13). Celles-ci incluent une mutation non sens (*p.C146X*) dans l'exon 4 et trois mutations faux sens (*p.R57H* dans l'exon 3, *p.W789L* et *p.V806F* dans l'exon 17). La mutation non sens (*p.C146X*) est décrite pour la première fois dans la population marocaine mais elle a été décrite précédemment dans d'autres populations du monde (Lombardi et al, 1995; Bodamer et al, 2002 ; Souverein et al, 2007). Les mutations faux sens (*p.R57H*, *p.W789L* et *p.V806F*) sont nouvelles et n'ont jamais été identifiées auparavant. Les mutations ont été nommées selon Yamamoto et al, 1984. Les quatre mutations ont été identifiées à l'état hétérozygote chez cinq patients indépendants sans aucun lien familial et réparties sur différentes villes de la région du nord du Maroc. Ceci a révélée une forte hétérogénéité des mutations du gène *LDLR* dans la population du nord du Maroc. Aucune de ces mutations n'a été identifiée chez les 89 sujets contrôles normocholestérolémiques originaires de la même région.

Tableau 13: Les 4 nouvelles mutations du gène *LDLR* identifiées chez cinq patients hétérozygotes HF du nord du Maroc

Exon	Nom de Mutation ^a	Changement de Nucléotide ^b	Confirmation	Nombre de patients portant la mutation	Référence
Mutation non sens					
4	<i>p.C146X</i>	c.501C>A	Deuxième séquençage	1 hétérozygote	Monde 1 ^{ère} fois au Maroc
Mutations faux sens					
3	<i>p.R57H</i>	c.233G>A	Deuxième séquençage	1 hétérozygote	Ce présent travail
17	<i>p.W789L</i>	c.2429G>T	Deuxième séquençage	1 hétérozygote	Ce présent travail
17	<i>p.V806F</i>	c.2479G>T	Deuxième séquençage	2 hétérozygotes	Ce présent travail

^a Nomenclature selon Yamamoto et al, 1984.

^b Nomenclature au niveau de l'ADN en accord avec la nomenclature internationale (Villeger et al, 2002).

Au niveau du même gène *LDLR*, nous avons identifié onze polymorphismes qui n'ont aucune influence sur la cholestérolémie (Tableau 14). Il s'agit des variations *p.C6C* dans l'exon 2, de *c.1060+7 T>A* et *c.1060 G>C* dans l'intron 7, *p.A370T* dans l'exon 8, *p.R450R* dans l'exon 10, *c.1706-10 G>A* dans l'intron 11, *p.P518P* dans l'exon 11, *p.L554L* et *p.N570N* dans l'exon 12, *p.V632V* dans l'exon 13, et *p.R732R* dans l'exon 15. Ces polymorphismes ont été identifiés chez les patients hétérozygotes HF et les sujets qui n'ont pas présenté de mutations dans le gène *LDLR* à des fréquences variables. Les polymorphismes *p.P518P*, *c.1060+7 T>A* et *c.1060 G>C* et *c.1706-10 G>A* ont été identifiés pour la première fois dans la population marocaine mais ils ont été détectés auparavant dans d'autres populations du monde. Les autres polymorphismes (*p.C6C*, *p.R450R*, *p.L554L*, *p.N570N*, *p.V632V*, *p.R732R* et *p.A370T*) ont été identifiés auparavant dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 ; Chater et al, 2006) et les autres populations du monde (Kotze et al, 1993 ; Gudnason et al, 1995; Weiss et al, 1998; Wang et al, 2001; Tatishcheva et al, 2001; Amsellem et al, 2002; Frikke-Schmid et al, 2004 ; Brusgaard et al, 2006 ; Zakharova et al, 2005 et 2007; Guardamagna et al, 2009 ; Al-Khateeb et al, 2011).

1.1.1. Les mutations causantes de l'HF chez la population du Nord du Maroc

1.1.1.1. La mutation non sens (*p.C146X*) :

Il s'agit d'une substitution de la cytosine (C) par l'adénine (A) au niveau du nucléotide 501 de l'exon 4 (*c. 501 C>A*). Ceci provoque le changement du codon TGC codant pour la cystéine en codon stop (TGA terminal) en position 146 du gène *LDLR*. La mutation non sens *p.C146X* provoque un arrêt prématuré de la protéine à la cystéine 146 donnant naissance à un récepteur LDL tronqué.

La mutation non sens *p.C146X* a été identifiée chez une patiente originaire du rural de la ville de Tanger au nord du Maroc. Il s'agit d'une femme âgée de 55 ans, qui a été adressé au médecin interniste pour le diagnostic et le traitement des xanthomes tendineux extensifs au niveau des extenseurs des doigts et des tendons d'Achille. Elle a été diagnostiquée à l'âge de 45 ans comme ayant une maladie cardiovasculaire prématurée. Elle est obèse avec un BMI de 33 kg/m² et a une hypertension artérielle de 13 mmHg. La patiente a été soumise à un traitement hypolipémiant régulier de 3 mois. Le bilan lipidique de la patiente a montré des taux très élevés de cholestérol total (430 mg/dl) et de cholestérol LDL (382 mg/dl).

Tableau 14 : Polymorphismes du gène *LDLR* identifiés dans la population du nord du Maroc

Polymorphisme	Changement nucléotide	Localisation	Nombre de probands N(%)
<i>p.C6C</i>	<i>c.81 T/C</i>	Exon 2	4 (8%)
<i>c.1060 +7 T>C*</i>	<i>c.1060 +7 T>C</i>	Intron7	35 (76%)
<i>c.1060 +10 G>C*</i>	<i>c.1060 +10 G>C</i>	Intron 7	31 (67%)
<i>p.A370T</i>	<i>c.1171 G>A</i>	Exon 8	40 (87%)
<i>p.R450R</i>	<i>c.1413 A/G</i>	Exon 10	46 (100%)
<i>c.1706-10 G>A*</i>	<i>c.1706-10 G>A</i>	Intron 11	46 (100%)
<i>p.P518P*</i>	<i>c.1617 C>T</i>	Exon 11	46 (100%)
<i>p.L554L</i>	<i>c.1725 C>T</i>	Exon 12	40 (87%)
<i>p.N570N</i>	<i>c.1773 C>T</i>	Exon 12	46 (100%)
<i>p.V632V</i>	<i>c.1959 T>C</i>	Exon 13	46 (100%)
<i>p.R723R</i>	<i>c.2231 A>G</i>	Exon 15	46 (100%) dont 2 homozygotes (4%)

*nouveau polymorphisme dans la population du nord du Maroc

Les antécédents familiaux de cette patiente ont montré que sa sœur est morte à cause d'infarctus de myocarde à l'âge de 25 ans. Cette dernière présentait des xanthomes tendineux et des taux élevés de cholestérol total (520 mg/dl) et de cholestérol LDL (490 mg/dl). La mère de la patiente était morte à l'âge de 42 ans par l'infarctus de myocarde. Elle aussi présentait des xanthomes tendineux extensifs. Les données cliniques et biologiques disponibles pour la patiente ainsi que celles de sa sœur et de sa mère sont représentées sur le tableau 15.

Tableau 15: Données cliniques et biologiques de la patiente porteuse de la mutation *p.C146X* et les membres de sa famille.

Sujet	Age (ans)	CT	LDLc	HDLc	TG	ApoB	BMI	TA	MCVP	t.Xt
proband	55	430	382	34	71	100	33	13	+	+
Sœur	25*	520	490	35	182	ND	ND	ND	+	+
Mère	42*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
V. limites		<250	<200	>40	<160	<135				

TC: total cholestérol; HDL-C : HDL cholestérol; TG : triglycérides; LDL-C : LDL cholestérol; apoB: apolipoprotéine B; BMI: indice de masse corporelle; TA: tension artérielle; MCVP : maladies cardiovasculaires prématurées ; t.Xt : xanthomes tendineux ; ND, non déterminé ; + : présence ; * : âge de décès des sujets ; V. limites: valeurs limites.

Tous les paramètres sont mesurés en mg/dl sauf la TA en mm Hg et le BMI en kg/m².

Le séquençage de l'exon 4 du gène *LDLR*, de la position - 95 pb du côté 5' jusqu'à la position 637 pb du côté 3', a montré que la patiente est hétérozygote pour la mutation non sens *p.C146X* (Figure 17). Nous n'avons pas pu analyser l'ADN des membres de la famille de la patiente. Mais selon les valeurs de CT, de LDLc et les données cliniques montrées par les membres de sa famille, la sœur était considérée comme si elle avait une forme clinique homozygote de l'HF.

Pour confirmer la présence de la mutation *p.C146X* chez la patiente, nous avons ré-amplifié puis reséquencé la totalité de l'exon 4 incluant 50 pb des extrémités introniques du gène *LDLR*. La substitution de C en A au niveau du nucléotide 501 a été confirmée pour la patiente par ce deuxième séquençage.

Cette mutation n'a jamais été décrite auparavant dans la population marocaine mais elle a été identifiée dans d'autres populations du monde (hollandaise et anglaise) (Lombardi et al, 1995; Karen et al, 2001; Bodamer et al, 2002 ; Souverein et al, 2007).

1.1.1.2. Les mutations faux sens :

- La mutation *p.R57H* :

Il s'agit d'une nouvelle substitution de la guanine (G) par l'adénine (A) au niveau du nucléotide 233 de l'exon 3 (*c.233G>A*). Ceci provoque le changement du codon CGT codant pour l'arginine en position 57 en codon CAT codant pour l'histidine (*p.R57H*).

La mutation faux sens *p.R57H* a été identifiée chez une patiente originaire de la ville de Tétouan au nord du Maroc. Il s'agit d'une femme âgée de 51 ans qui a été adressée, par un médecin interniste à un laboratoire de biologie médicale de sa ville pour effectuer des bilans lipidiques de contrôle. L'examen clinique a montré que la patiente avait des xanthomes cutanés autour des yeux. Le bilan lipidique a montré une hypercholestérolémie modérée avec des taux de 269 mg/dl de cholestérol total et de 200 mg/dl de cholestérol LDL. Les antécédents familiaux ont montré que son père était hypercholestérolémique et souffrait d'une maladie cardiovasculaire. Les données cliniques et biologiques de cette patiente sont représentées dans le tableau 16.

Le séquençage de l'exon 3 du gène *LDLR* de la position - 46 pb du côté 5' jusqu'à la position 395 pb du côté 3' a montré que la patiente est hétérozygote pour la mutation faux sens *p.R57H* (Figure 18).

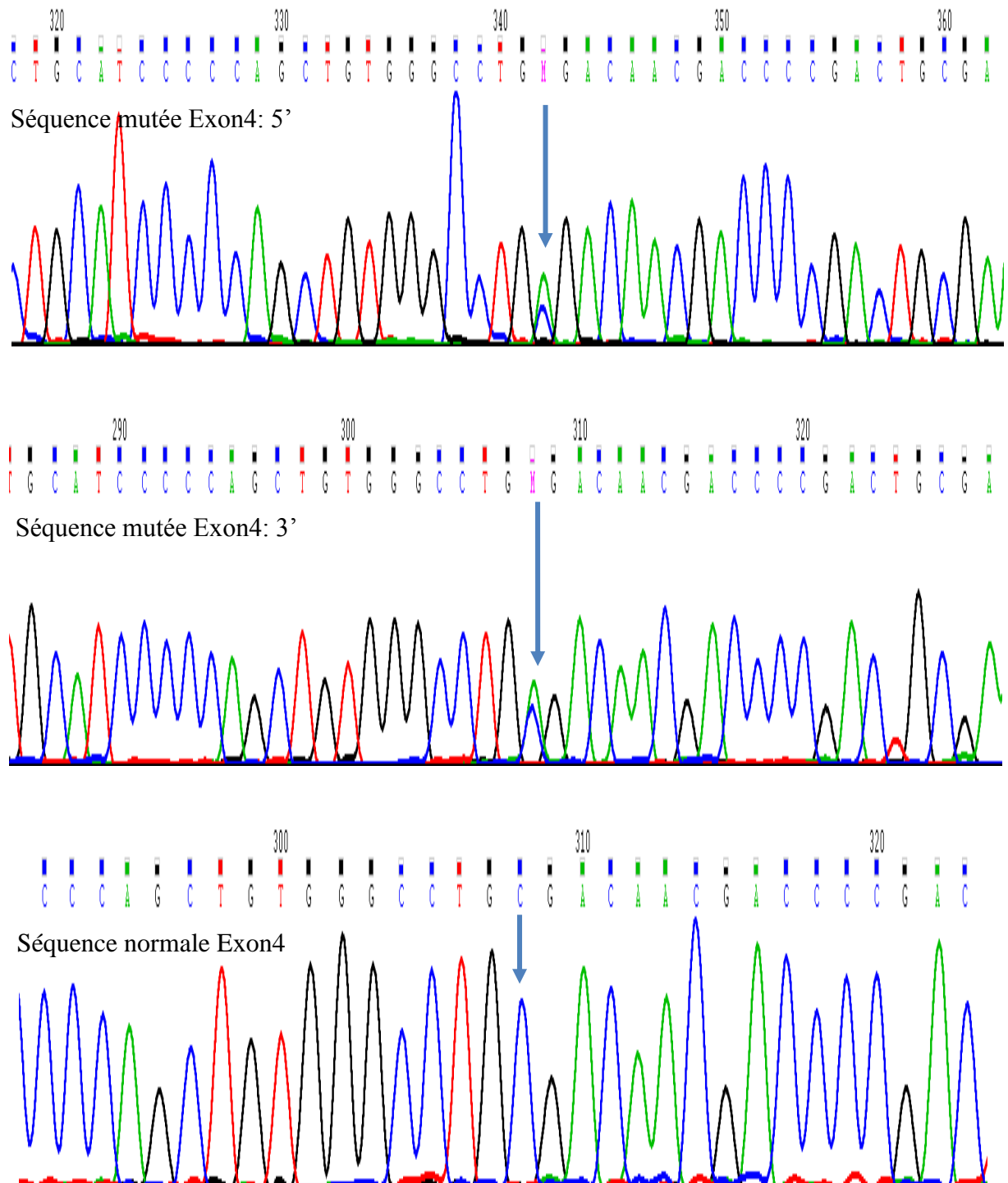


Figure 17: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 4 du gène *LDLR* de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation *p.C146X* généré par séquençage automatique.

Tableau 16: Données cliniques et biologiques présentées par les patients porteurs des mutations *p.R57H*, *p.W789L* et *p.V806F*

Exon	Nom de mutation ^a	Changement de nucleotide	Age (ans)	Sexe	CT	LDLc	t.Xt	s.Xt	MCVP	TA	BMI	AF
3	<i>p.R57H</i>	c.233G>A	51	F	269	200	Ab	+	Ab	14	33	Père
17	<i>p.W789L</i>	c.2429G>T	62	H	310	250	Ab	+	+	15	29	Sœur
17	<i>p.V806F</i>	c.2479G>T	46	F	250	210	Ab	+	+	15	31	Mère
			57	H	298	265	Ab	+	Ab	14	29	Ab

CT: cholestérol total; LDL-c: cholestérol LDL; TA : tension artérielle; BMI: indice de masse corporelle; MCVP : maladies cardiovasculaires prématurées ; AF : antécédents familiaux; V.limite : valeurs limites ; t.Xt : xanthomes tendineux ; s.Xt : xanthomes cutanés; Ab: absence; +: présence.

Tous les paramètres sont mesurés en mg/dl ; TA en mm Hg

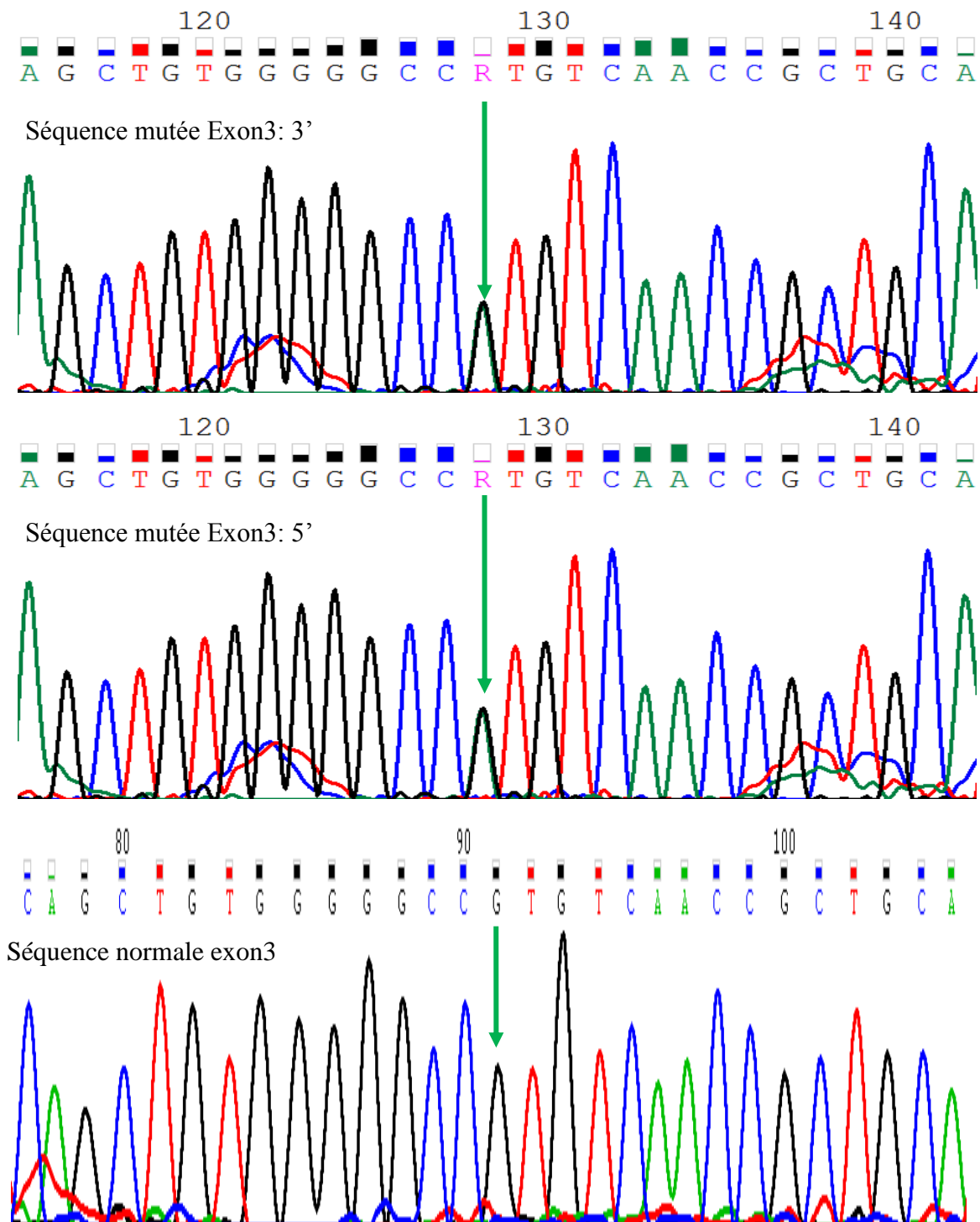


Figure 18: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 3 du gène *LDLR* de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation *p.R57H* généré par séquençage automatique.

La mutation *p.R57H* n'a jamais été décrite dans la littérature jusqu'à présent. Afin de vérifier qu'il s'agit d'une mutation et non pas d'un simple polymorphisme, nous avons amplifié puis séquencé la totalité de l'exon 3, incluant 50 pb des extrémités introniques du gène *LDLR*, sur un nouveau aliquot d'ADN génomique de la patiente et sur l'ADN génomique de 89 sujets indépendants normocholestérolémiques. La substitution de G en A au niveau du nucléotide 233 a été confirmée pour la patiente par un deuxième séquençage mais elle a été absente chez la totalité des sujets normocholestérolémiques.

- **La mutation *p.W789L* :**

Il s'agit d'une nouvelle substitution de la guanine (G) par thymine (T) au niveau du nucléotide 2429 de l'exon 17 (*c.2429G > T*). Ceci provoque un changement du codon TGG codant pour le tryptophane en codon TTG codant pour la leucine en position 789 (*p.W789L*).

La mutation faux sens (*p.W789L*) a été identifiée chez un patient originaire de la ville de Larache au nord du Maroc. C'est un homme âgé de 62 ans qui a été diagnostiqué à l'âge de 56 ans comme ayant une maladie cardiovasculaire prématurée. L'examen clinique a montré que le patient avait des xanthomes tendineux. Le bilan lipidique du patient a montré des taux élevés de cholestérol total (310 mg/dl) et de cholestérol LDL (250 mg/dl). Les antécédents familiaux de ce patient ont montré que sa sœur est hypercholestérolémique sans aucun autre signe clinique caractéristique de l'ADH. Les données cliniques et biologiques de ce patient sont représentées dans le tableau 16.

Le séquençage de l'exon 17 du gène *LDLR* de la position 1 pb du côté 5' jusqu'à la position 343 pb du côté 3' a montré que la patiente est hétérozygote pour la mutation faux sens *p.W789L* (Figure 19).

La mutation *p.W789L* n'a jamais été décrite dans la littérature jusqu'à présent. Pour vérifier qu'il s'agit d'une mutation et non pas d'un simple polymorphisme, nous avons procédé de la même façon décrite précédemment. La substitution de G en T au niveau du nucléotide 2429 a été confirmée pour la patiente par un deuxième séquençage mais elle a été absente chez la totalité des sujets normocholestérolémiques.

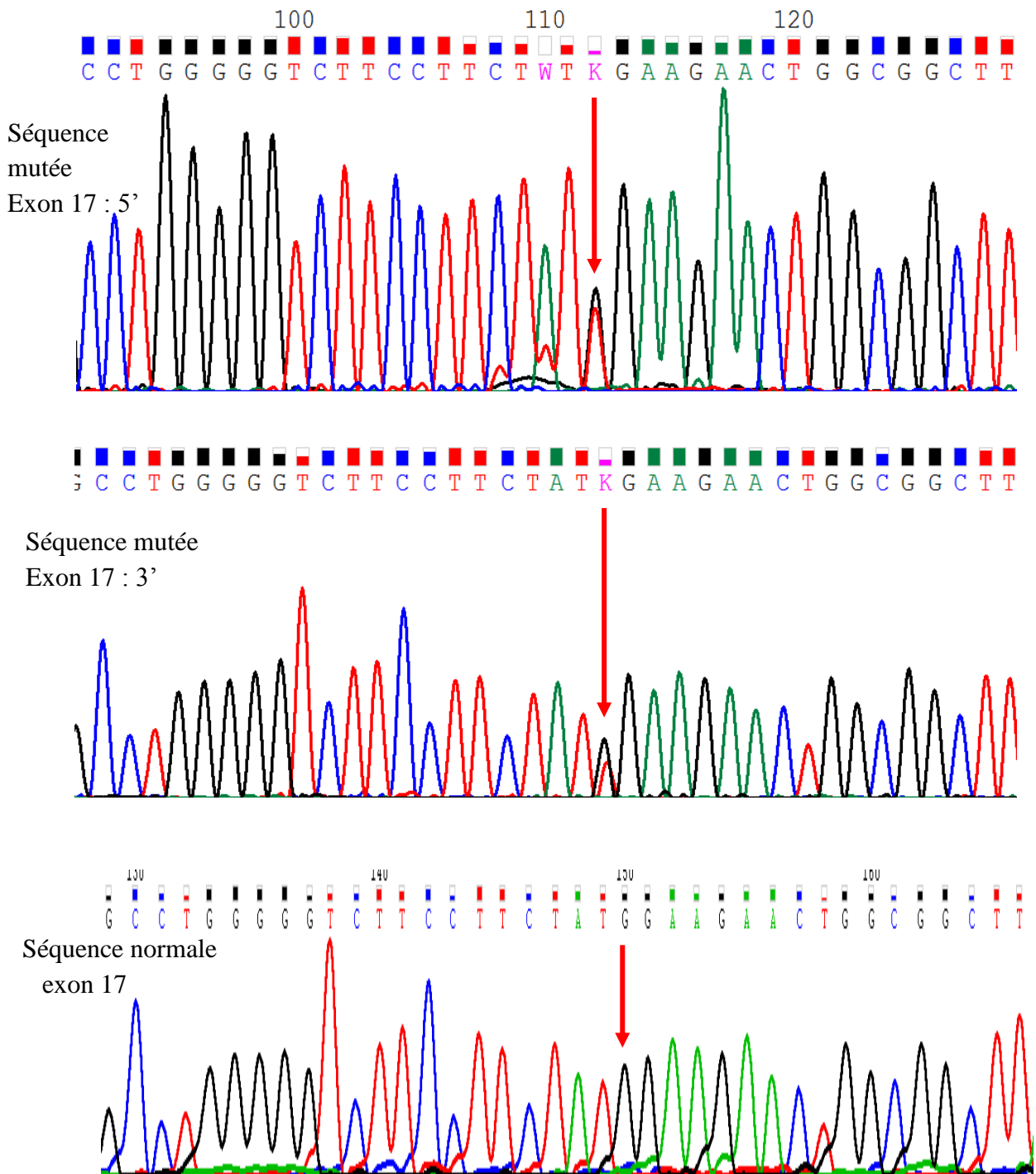


Figure 19: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 17 du gène *LDLR* de l'ADN génomique d'un sujet normal et du patient hétérozygote pour la mutation *p.W789L* généré par séquençage automatique.

- **La mutation *p.V806F* :**

Il s'agit d'une substitution de la guanine (G) par thymine (T) au niveau du nucléotide 2479 de l'exon 17 (c.2479G> T). Ceci provoque le changement du codon GTTC codant pour la Valine en codon TTTC codant pour la phénylalanine en position 806 (*p.V806F*).

La mutation faux sens (*p.V806F*) a été identifiée chez deux patients indépendants originaires de deux villes différentes du nord du Maroc. Il s'agit de :

- une femme âgée de 46 ans originaire de la ville de Tanger. Elle a été diagnostiquée à l'âge de 45 ans comme ayant une maladie cardiovasculaire prématurée. Elle est obèse avec un BMI de 31 kg/m² ayant une hypertension artérielle (15 mm Hg). La patiente a été soumise à un traitement hypolipémiant régulier. Le bilan lipidique de la patiente a montré des taux modérés de cholestérol total (250 mg/dl) et de cholestérol LDL (210 mg/dl). Les antécédents familiaux de cette patiente ont montré que sa mère est hypercholestérolémique sans signes cliniques caractéristiques de l'ADH.

- un homme âgé de 57 ans originaire de la ville de Sebta qui a présenté des xanthomes cutanés. Il est soumis à un traitement hypolipémiant régulier. Le bilan lipidique du patient a montré des taux élevés de cholestérol total (298 mg/dl) et de cholestérol LDL (265 mg/dl). Les parents du patient sont morts à un âge précoce et nous n'avons pas pu obtenir les informations concernant leur état de santé.

Les données cliniques et biologiques des deux patients porteurs de la mutation *p.V806F* sont représentées dans le tableau 16.

Le séquençage de l'exon 17 du gène *LDLR* de la position 1 pb du côté 5' jusqu'à la position 343 pb du côté 3' a montré que les deux patients sont hétérozygotes pour la mutation faux sens *p.V806F* (Figure 20).

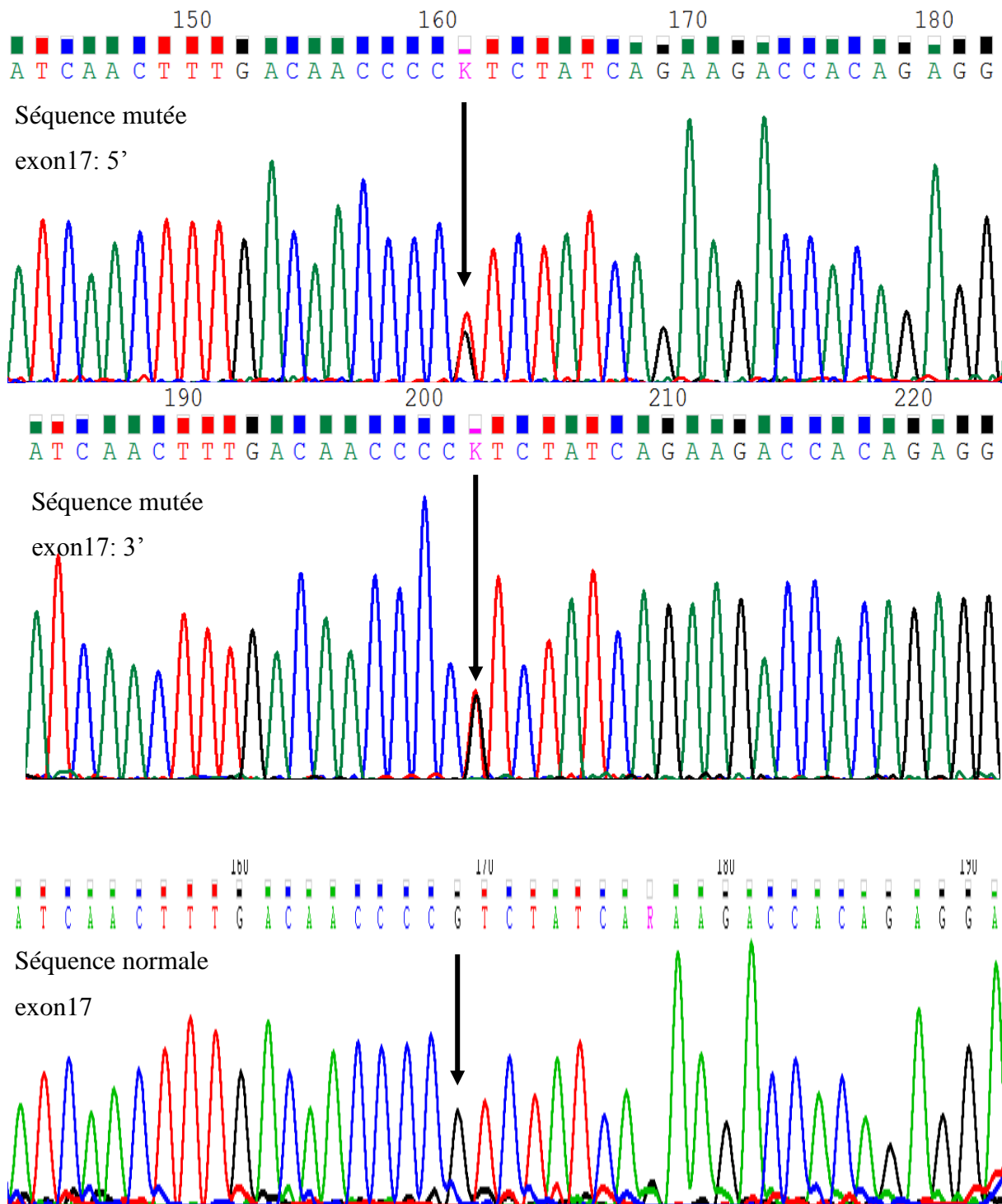


Figure 20: Electrophoregramme des séquences sens et anti sens de l'exon 17 du gène *LDLR* de l'ADN génomique d'un sujet normal et un patient hétérozygote pour la mutation *p.V806F* généré par séquençage automatique.

La mutation *p.V806F* n'a jamais été décrite dans la littérature jusqu'à présent. Pour vérifier qu'il s'agit d'une mutation et non pas d'un simple polymorphisme, nous avons procédé de la même façon décrite précédemment. La substitution de G en T au niveau du nucléotide 2479 a été confirmée pour la patiente par un deuxième séquençage mais elle a été absente chez la totalité des sujets normocholestérolémiques.

1.1.2. Polymorphismes du gène *LDLR* dans la population du Nord du Maroc :

1.1.2.1. Nouveaux polymorphismes (Tableau 14):

L'analyse de la totalité du gène *LDLR* a révélé quatre nouveaux polymorphismes différents, majoritaires dans la population du Nord du Maroc. Ces polymorphismes sont tous associés aux différentes mutations identifiées chez les cinq patients hétérozygotes HF. Ces polymorphismes n'ont aucune influence sur la cholestérolémie.

- *p.P518P* :

Il s'agit d'une substitution de la cytosine (C) par la thymine (T) au niveau du nucléotide 1617 de l'exon 11 (*c.1617 C>T*). Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon CCC est changé en CCT qui codent pour le même acide aminé : la proline. Le polymorphisme *p.P518P* a été identifié chez l'ensemble des sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %. Il n'a pas été détecté auparavant dans la population marocaine.

- *c.1060 +7 T>C* :

Il s'agit d'une substitution du septième nucléotide de l'intron 7, la thymine (T) par la cytosine (C) (*c.1060 +7 T>C*). Ce polymorphisme a été identifié chez 31 sujets étudiés avec une fréquence de 67 %.

- *c.1060 +10 G>C* :

Il s'agit d'une substitution du dixième nucléotide de l'intron 7, la guanine (G) par la cytosine (C). Le polymorphisme *c.1060 +10 G>C* a été identifié chez 35 sujets étudiés avec une fréquence de 76 %.

- ***c.1706-10 G>A*** :

C'est une substitution de la dixième base de l'intron 11 du côté 5' de l'exon 12, la guanine (G) par l'adénine (A). Le polymorphisme *c.1706-10 G>A* a été identifié chez tous les sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %.

1.1.2.2. Autres polymorphismes (Tableau 14):

En plus des quatre nouveaux polymorphismes identifiés dans notre population, nous avons révélé sept autres polymorphismes connus aussi bien dans la population marocaine que dans d'autres populations du monde. Ces polymorphismes n'ont aucune influence sur la cholestérolémie. Il s'agit de :

- ***p.C6C*** :

Il s'agit de la substitution de la thymine (T) par la cytosine (C) au niveau du nucléotide 81 de l'exon 2 (*c.81 T/C*). Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon TGT est changé en TGC qui codent pour le même acide aminé : la cystéine. Le polymorphisme *p.C6C* a été identifié chez quatre probands soit 8 % de l'ensemble des patients étudiés. Il n'a été détecté chez aucun des patients porteurs des mutations dans le gène *LDLR*.

- ***p.A370T*** :

Il s'agit d'une substitution de la guanine (G) par l'adénine (A) au niveau du nucléotide 1171 de l'exon 8 (*c.1171 G/A*). Cette substitution provoque le changement du codon GCC codant pour l'alanine en ACC codant pour la thréonine en position 370 (*p.A370T*). Le polymorphisme a été identifié chez 40 sujets étudiés avec une fréquence de 87 %. Il n'a été détecté chez aucun des patients porteurs des mutations dans le gène *LDLR*.

- ***p.R450R*** :

Il s'agit de la substitution de l'adénine (A) par la guanine (G) au niveau du nucléotide 1413 de l'exon 10 (*c.1413 A/G*). Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon AGA est changé en AGG qui codent pour le même acide aminé : l'arginine. Le polymorphisme *p.R450R* a été identifié chez l'ensemble des sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %.

- ***p.L554L*** :

Il s'agit de la substitution de la cytosine (C) par la thymine (T) au niveau du nucléotide 1625 de l'exon 12 (*c.1725 C>T*). Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon CTC est changé en CTT qui codent pour le même acide aminé : la leucine. Le polymorphisme *p.L554L* a été identifié chez 40 probands, soit 87 % de l'ensemble des sujets étudiés.

- ***p.N570N*** :

C'est une substitution de la cytosine (C) par la thymine (T) au niveau du nucléotide 1773 de l'exon 12 (*c.1773 C/T*). Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon AAC est changé en AAT qui codent pour le même acide aminé : l'Asparagine. Le polymorphisme *p.N570N* a été identifié chez les 46 sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %.

- ***p.V632V***:

Il s'agit de la substitution de la thymine (T) par la cytosine (C) au niveau du nucléotide 1959 de l'exon 13 (*c.1959 T/C*). La substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon GTT est changé en GTC qui codent pour le même acide aminé : la valine. Le polymorphisme *p.V632V* a été identifié chez les 46 sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %.

- ***p.R723R*** :

C'est la substitution de l'adénine (A) par la guanine (G) au niveau du nucléotide 2231 de l'exon 15 (*c.2231 A/G*). La substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon CGA est changé en CGG qui codent pour le même acide aminé : l'arginine. Le polymorphisme *p.R723R* a été identifié chez les 46 sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %.

2. Gène de l'apolipoprotéine B (APOB) :

Malgré la grande taille de la protéine ApoB100, les mutations décrites responsables de l'hypercholestérolémie se limitent à la zone d'union au récepteur des LDL. Ainsi, nous avons analysé seulement les zones des exons 26 et 29 du gène *APOB*, qui interviennent dans l'interaction avec le récepteur LDL.

Pour identifier les mutations ponctuelles probables du gène *APOB*, dans notre population, nous avons appliqué la méthode de diagnostic génétique direct en utilisant la technique de séquençage automatique. Cette technique nous a permis d'analyser :

- quatre zones de l'exon 26: la zone apoB 26z2 qui code du résidu 1560 jusqu'au résidu 1800, la zone apoB26z3 qui code du résidu 1763 jusqu'au résidu 1990, la zone apoB3500 qui code du résidu 3478 jusqu'au résidu 3554 et la zone apoB26z11 qui code du résidu 3464 jusqu'au résidu 3575.
- une zone de l'exon 29: apoB29z2 qui code du résidu 4189 jusqu'au résidu 4413.

2.1. Variations du gène *APOB* dans la population du nord du Maroc:

L'analyse des résultats de séquençage des zones analysées des exons 26 et 29 n'a révélée aucune mutation responsable de la FDB dans la population du nord du Maroc. Cependant, elle a montré la présence de quatre polymorphismes dans le gène *APOB* dont deux sont identifiées dans l'exon 26 et deux dans l'exon 29 (Tableau 17). Ces polymorphismes sont nouveaux dans la population marocaine et n'ont jamais été identifiés auparavant.

2.1.1. Polymorphisme de l'exon 26:

- *p.T3567T* :

Il s'agit d'une substitution de la guanine (G) par l'adénine (A) au niveau du nucléotide 10701 (*c.10701G>A*) de la zone apoB26z11 de l'exon 26 qui code du résidu 3464 jusqu'au résidu 3575. Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon ACC est changé en ACA qui codent pour le même acide aminé : la thréonine. Le polymorphisme *p.T3567* a été identifié chez 22 probands soit 48% de l'ensemble des patients étudiés.

Tableau 17: Polymorphismes du gène *APOB* caractéristiques de la population du nord du Maroc

Polymorphisme	Changement de nucléotides	Localisation	Nombre de proband N (%)
<i>p.T3567T</i>	<i>c.10701G>A</i>	Exon 26	22 (48%)
<i>p.N3579N</i>	<i>c.10737C>A</i>	Exon 26	40 (87%)
<i>p.S4311N</i>	<i>c.13013G>A</i>	Exon 29	46 (100%)
<i>p.V4238A</i>	<i>c.12794T>C</i>	Exon 29	3 (7%)

- *p.N3579N* :

Il s'agit d'une substitution de la cytosine (C) par la thymine (T) au niveau du nucléotide 10737 (*c.10737C>T*) de la zone apoB26z11 de l'exon 26 du gène *APOB* qui code du résidu 3464 jusqu'au résidu 3557. Cette substitution ne provoque pas de changement d'acide aminé, le codon AAC est changé en AAT qui codent pour le même acide aminé : l'asparagine. Le polymorphisme *p.N3579N* a été identifié chez 40 probands. Il est majoritaire avec une fréquence de 87 % de l'ensemble des patients étudiés.

2.1.2. Polymorphisme de l'exon 29:

- *p.S4211N* :

C'est une substitution de la guanine (G) par l'adénine (A) au niveau du nucléotide 13013 (*c.13013G>A*) de la zone apoB29z2 de l'exon 29 du gène *APOB* qui code du résidu 4189 jusqu'au résidu 4413. Ceci provoque un changement du codon AGC codant pour la sérine en codon AAC codant pour l'asparagine (*p.S4211N*). Ce polymorphisme a été identifié chez les 46 sujets étudiés. Il est le plus fréquent du gène *APOB* chez la population du nord du Maroc avec une fréquence maximale de 100%.

- *p.V4238A* :

Il s'agit d'une transition de T en C au niveau du nucléotide 12794 (*c.12794T>C*) de la zone apoB29z2 de l'exon 29 du gène *APOB* qui code du résidu 4189 jusqu'au résidu 4413. Cette substitution a provoqué le changement du codon GTA codant pour la valine en codon GCA codant pour l'alanine (*p.V4238A*). Ce polymorphisme a été identifié chez seulement 3 sujets soit 7 % de l'ensemble des sujets étudiés. Il est associé à une légère augmentation de taux des TG chez les trois sujets qui le portent. Le profil lipidique des sujets porteurs de ce polymorphisme est présenté dans le tableau 18.

Le séquençage de la zone apoB29z2 de l'exon 29 du gène *APOB* qui code du résidu 4189 jusqu'au résidu 4413 a montré que les trois patients sont hétérozygotes pour le polymorphisme *p.V4238A* (Figure 21).

Tableau 18: Profil lipidique des trois patients porteurs du polymorphisme *p.V4238A*.

Probands	Age (ans)	CT	LDLc	HDLc	TG	apoB
1	69	287	300	0.36	228	127
2	70	269	200	0.81	225	128
3	65	310	250	0.75	219	131
V.limites		<250	<200	>40	<160	<135

CT: cholestérol Total; HDLc: cholestérol HDL; TG: Triglycérides; LDLc: cholestérol LDL; ApoB: Apolipoprotéine B; V. limites: valeurs limites

Toutes les unités sont en mg/dl



Figure 21: Electrophorégramme des séquences sens et anti sens de l'exon 29z2 du gène *APOB* de l'ADN génomique d'un sujet normal et d'un patient hétérozygote pour la mutation *p.V4238A* généré par séquençage automatique.

3. Gène *PCSK9* :

Pour rechercher les variations possibles du gène *PCSK9*, chez les 46 probands adultes du nord du Maroc cliniquement diagnostiqués ADH selon les critères standards, nous avons utilisé la technique de séquençage direct automatique pour analyser la totalité de ce gène : la région promotrice et les 12 exons incluant 50 pb des extrémités introniques. Aucune variation n'a été révélée au niveau de ce gène chez la totalité des patients étudiés.

C. Corrélation entre le phénotype et le génotype de l'ADH chez les patients hétérozygotes HF de la population du Nord du Maroc :

Parmi les 46 probands sélectionnés selon les critères standards cinq cas seulement ont révélé la présence, à l'état hétérozygote, des mutations causantes de l'HF dans le gène *LDLR*. Les cinq patients hétérozygotes HF ont présenté un phénotype clinique et biochimique sévère et sont diagnostiqués "certain" ADH selon le "Dutch lipid Clinic Network criteria". Ces patients n'ont pas montré de mutations sur les autres gènes (le gène *APOB* et le gène *PCSK9*) impliqués dans l'ADH.

Le tableau 19 et la figure 22 montrent les caractéristiques des patients avec et sans mutations sur le gène *LDLR*. L'analyse statistique de ces caractéristiques a montré une association significative entre les mutations du gène *LDLR* et le taux de cholestérol LDL (246 ± 79 mg/dl, $p < 0.05$), le score HF (12 ± 2 , $p < 0.01$), les xanthomes tendineux (40%, $p < 0.01$) et la maladie cardiovasculaire prématurée ($p < 0.01$).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que les mutations identifiées dans le gène *LDLR* influencent d'une manière variable les phénotypes cliniques et biochimiques (Tableau 20). La mutation non sens *p.C146X* est associée à un phénotype sévère avec des taux très élevés de CT et de LDLc, à la présence de xanthomes tendineux excessifs et à la maladie cardiovasculaire prématurée. La mutation faux sens *p.R57H* est associée à un profil lipidique modéré avec absence de la maladie cardiovasculaire prématurée. La mutation faux sens *p.W789L* est associée à des taux élevés de CT et de LDLc avec présence de la maladie cardiovasculaire prématurée mais absence des xanthomes. La mutation faux sens *p.V806F* a été identifiée chez deux patients indépendants avec des phénotypes différents. Chez la femme originaire de la ville de Tanger elle est associée à des taux modérés de CT et de LDLc avec présence de la maladie cardiaque prématurée et absence de xanthome. Par contre, chez

l'homme originaire de la ville de Sebta elle est associée à des taux élevés de CT et de LDLc avec présence de xanthomes cutanés et absence de maladie cardiovasculaire prématurée

Tableau 19: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients hétérozygotes HF et des patients sans mutations dans le gène *LDLR*.

Variables	avec mutations N = 5	sans mutations 41	Valeur de <i>P</i>
Age (ans)	54±6	57±9	NS
BMI(kg/m ²)	30±2	27±4	NS
FH score	12±2	8±3	<0.01
CT	312±63	282±34	NS
LDLc	246±79	212±29	<0.05
TA	14±1	14±2	NS
MCVP	4(80%)	3(7%)	<0.01
AF	4 (80%)	25 (61%)	NS
t.Xt	2(40%)	1(2%)	<0.01
s.Xt	3(60%)	12 (29)	NS

BMI : indice de masse corporelle ; CT : cholestérol total ; LDLc : cholestérol LDL ; t.Xt : xanthomes tendineux ; s.Xt: xanthomes cutanés ; AF : antécédents familiaux ; TA : tension artérielle ; MCVP : maladie cardiovasculaire prématurée.

Toutes les unités sont en mg/dl ; le BMI en kg/m²

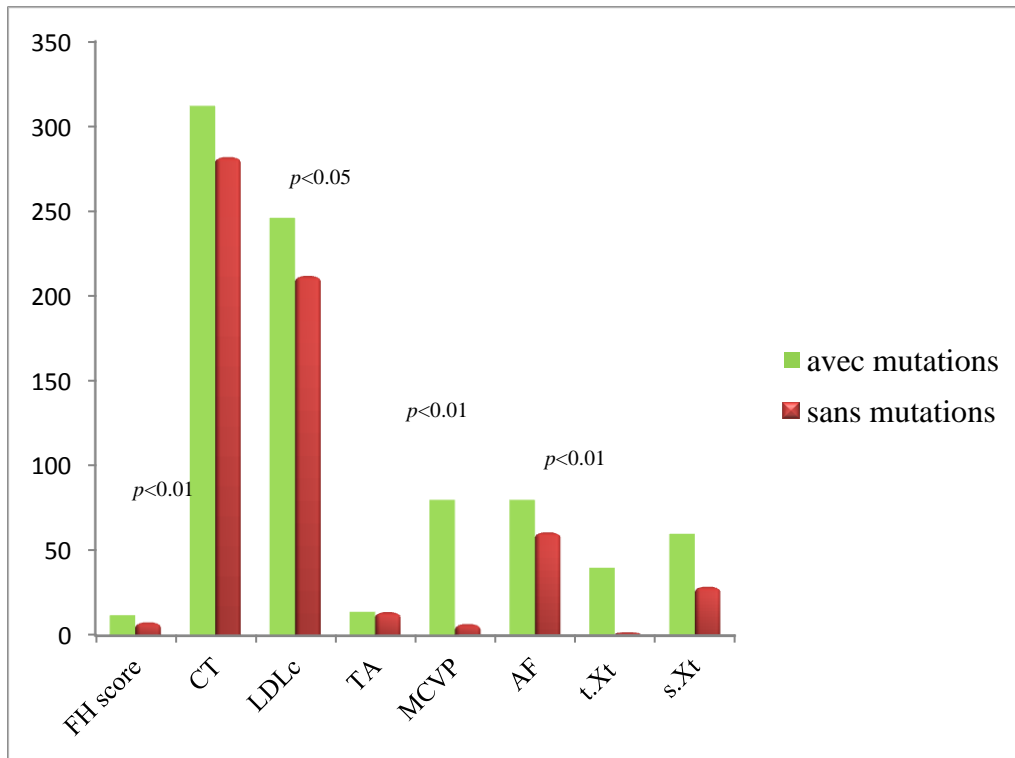


Figure 22 : comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques entre des patients hétérozygotes HF et des patients sans mutations dans le gène *LDLR*.

BMI : indice de masse corporelle ; CT : cholestérol total ; LDLc : cholestérol LDL ; t.Xt : xanthomes tendineux ; s.Xt: xanthomes cutanés ; AF : antécédents familiaux ; TA : tension artérielle ; MCVP : maladie cardiovasculaire prématuroe.
 CT et LDLc sont en mg/dl ; le BMI en kg/m^2 ; TA en mmHg ; MCVP, t.Xt, s.Xt sont en %

Tableau 20: Caractéristiques cliniques et biologiques des cinq patients hétérozygotes HF.

Exon	Nom de mutation ^a	Changement de nucléotide	Age (ans)	Sexe	CT	LDLc	t.Xt	s.Xt	MCVP	TA	BMI	AF
4	p.C146X	c.501C>A	55	F	430	382	+++	Ab	+	13	33	Mère et sœur
3	p.R57H	c.233G>A	51	F	269	200	Ab	+	Ab	14	33	Père
17	p.W789L	c.2429G>T	62	H	310	250	+	Ab	+	15	29	Sœur
17	p.V806F	c.2479G>T	46	F	250	210	Ab	+	+	15	31	Mère
			57	H	298	265	Ab	+	Ab	14	29	Ab

CT: cholestérol total; LDL-c: cholestérol LDL; TA : tension artérielle; V. limites, valeurs limites ; t.Xt : xanthomes tendineux ; s.Xt : xanthomes cutanés ; BMI : : indice de masse corporelle ; AF :antécédents familiaux ; MCVP : maladie cardiovasculaire prématurée ; Ab : absent

Tous les paramètres sont mesurés en mg/dl ; TA en mm Hg

ND, non déterminé

+, présence

D. Génotype de l'apolipoprotéine E :

L'apoE est une composante majeure participant dans le processus général d'homéostasie du cholestérol. Son rôle dans le métabolisme lipidique a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche qui ont révélé la capacité que possède l'apoE pour diriger la destinée métabolique des lipoprotéines.

Le polymorphisme de l'apo E explique 12 % des variations de l'apo B et 8 % de celles du cholestérol total. Ce polymorphisme intervient aussi dans la variation de la prévalence des maladies cardiovasculaires (Siest et al, 1995), en participant à la clairance du cholestérol médiée par des récepteurs (Davignon et al, 1988) et en influençant la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (Bergeron et Havel, 1996). Le risque des maladies cardiovasculaires est plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle epsilon4 (Wilson et al, 1994). Ce dernier est associé à la forme précoce de la maladie d'Alzheimer (Tsai et al, 1994). Les bases moléculaires de ce polymorphisme sont des substitutions dans les codons 112 et 158 de l'exon 4 du gène de l'apo E. Trois isoformes majeures résultent de ce polymorphisme : E2, E3 et E4 (Rall et al, 1981).

L'effet de génotype de l'apo E sur les concentrations lipidiques (Vuorio et al, 1997; Carmena-Ramon et al, 2000; Bertolini et al, 2000 ; Lambert et al, 2001) et le risque coronaire (Vuorio et al, 1997; Eto et al, 1988; De Knijff et al, 1990; Gylling et al, 1991, Ferrieres et al, 1994 ; Bertolini et al, 2000) chez les sujets dislipidémiques a été précédemment étudié et les résultats obtenus sont variables (Mozas et al, 2003). A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée au nord du Maroc pour déterminer la fréquence des allèles de l'apoE et leur influence sur le profil lipidique de cette population. Les études menées dans les autres populations du Maroc (Rabat et régions) ont porté sur des sujets sains (Valveny et al, 1997 ; Lahlali et al, 2002; Harich et al, 2002 ; They-They et al, 2010). Pour clarifier la contribution des génotypes de l'apoE, dans le profil lipidique et la maladie cardiovasculaire chez des patients dislipémiques, nous avons analysé le génotype de l'apo E chez les 46 probands du nord du Maroc cliniquement diagnostiqués ADH.

Les trois sites polymorphes du gène de l'apoE sont très bien décrits dans la littérature. Un diagnostic génétique direct permet de les identifier dans la population étudiée. La technique de séquençage automatique nous a permis d'identifier les allèles du polymorphisme de l'apoE chez les 46 probands hypercholestérolémiques intégrés dans notre étude.

1. Distribution et fréquences des allèles du gène de l'apoE dans la population du Nord du Maroc :

La distribution et la fréquence des allèles du gène de l'apoE selon le sexe dans la population du Nord du Maroc sont représentées dans le tableau 21. Aucun patient ne porte les génotypes E2/E2 et E2/E4, un seul patient porte le génotype E2/E3 (2.2%), 8 patients sont hétérozygotes pour le génotype E3/E4 (17.3%) et un seul patient homozygote pour le génotype E4/E4 (2.2%). Les fréquences des allèles $\epsilon 2$ (E2/E3), $\epsilon 3$ (E3/E3), et $\epsilon 4$ (E4/E4 et E3/E4) dans notre population sont de 2.2%, 78.3% et 19.5% respectivement (Figure 23). Nos résultats montrent que l'allèle $\epsilon 4$ est lié au sexe masculin chez le groupe de patients étudiés.

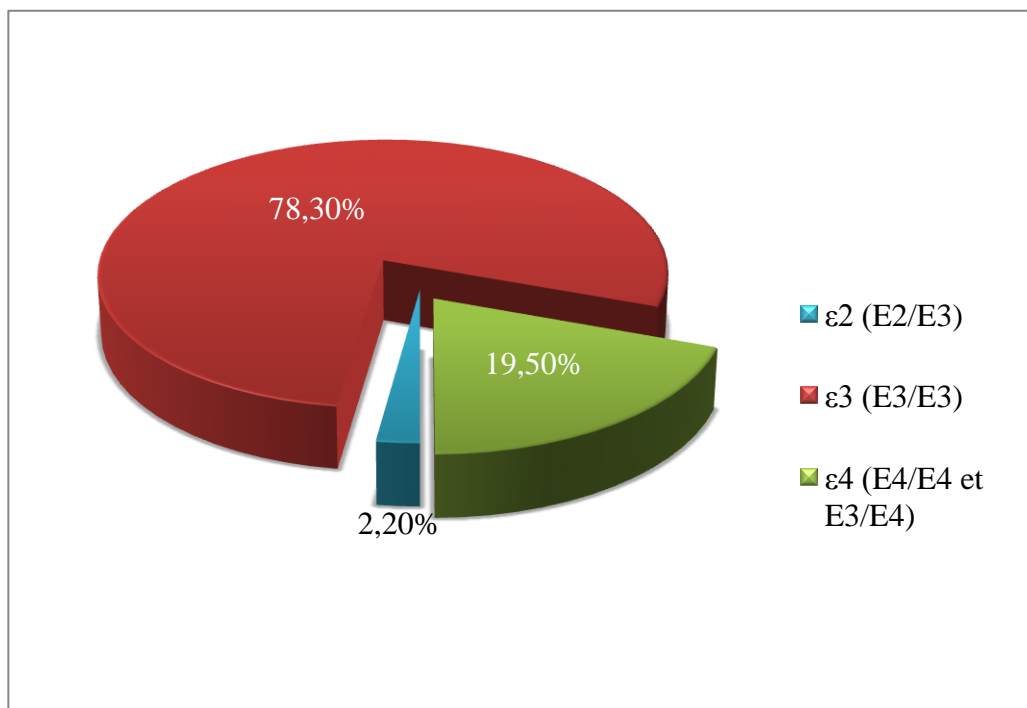


Figure 23 : Fréquences des allèles $\epsilon 2$ (E2/E3), $\epsilon 3$ (E3/E3), et $\epsilon 4$ (E4/E4 et E3/E4) dans la population du Nord du Maroc

Tableau 21: Distribution et fréquence des allèles du gène de l'apoE selon le sexe chez la population du Nord du Maroc

Génotypes	Total	Femmes	Hommes
	n (%)	n (%)	n (%)
E2/E2	0	0	0
E2/E3	1(2.2)	1 (3.7)	0
E3/E3	36 (78.3)	26 (96.3)	10 (52.6)
E3/E4	8 (17.3)	0	8 (42.1)
E4/E4	1(2.2)	0	1 (5.3)
E2/E4	0	0	0
Fréquences des allèles			
ε2	1(2.2)	1 (3.7)	0
ε3	36(78.3)	26 (96.3)	10 (52.6)
ε4	9(19.5)	0	9 (19.5)

ε4 comprend les génotypes E3/E4 et E4/E4 ; ε2 comprend le génotype E2/E3,
ε3 comprend le génotype E3/E3

2. Influence de génotypes de l'apoE sur les caractéristiques cliniques et lipidiques chez la population hypercholestérolémique du nord du Maroc :

La contribution de génotype de l'apoE dans le métabolisme des lipides et le risque des maladies cardiovasculaire est clairement établi (Bertolini et al, 2000 ; Lambert et al, 2001). L'analyse des génotypes de l'apoE a montré que les cinq patients génétiquement diagnostiqués hétérozygotes HF, sont homozygotes pour l'allèle $\epsilon 3$. Les 41 patients restant ne portent aucune mutation ni sur le gène *LDLR* ni sur le gène *APOB* ni sur le gène *PCSK9*. Nous avons analysé le génotype de l'apo E de ces patients sans mutations afin de vérifier son influence sur leur profil clinique (maladies cardiovasculaires et xanthomes) et lipidique. Ces patients ont été regroupés en 3 groupes: sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 2$, sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 3$ et sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$. En raison du faible nombre de l'allèle $\epsilon 2$ (1 seul patient) nous avons comparé les données biologiques de nos patients en fonction des allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ (E4/E4 et E4/E3) (Tableau 22) (Figure 24). Aucune différence significative n'a été observée entre ces 2 allèles de l'apoE pour l'âge, la tension artérielle (TA), le cholestérol total, le cholestérol LDL. Cependant, le taux des TG augmente significativement avec l'allèle $\epsilon 4$ (génotypes E4/E4 et E4/E3).

Les taux des TG et de l'apoB sont significativement augmentés chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ en comparaison avec les porteurs de l'allèle $\epsilon 3$ ($p < 0.01$). La fréquence des maladies cardiovasculaires (MCV) ne diffère pas entre les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ et ceux porteurs de l'allèle $\epsilon 3$. Contrairement à l'étude marocaine précédente (Lahlali-Kacemi et al, 2002), nos résultats ont montré une association entre le génotype de l'Apo E et le BMI.

Tableau 22: Influence des allèles de l'apoE sur les données cliniques et biologiques des sujets sans mutations.

Paramètres	ε3 (E3/E3)	ε4 (E4/E3+ E4/E4)
Nombre de sujets	31	9
Age (ans)	58±7	59±7
BMI (kg/m ²)	26±5*	30±2*
TA (mm Hg)	15±3	14±3
CT (mg/dl)	278	300±15
LDLc (mg/dl)	219± 27	230±25
T G (mg/dl)	120±12*	210±18*
Apo B (g/l)	135±15*	148±20*
t.Xt (%)	17	20
MCV (%)	18	20

**P*<0.05

CT: cholestérol total; LDL-c: cholestérol LDL; TG : triglycérides ; apoB : apolipoprotéine B ; TA : tension artérielle; t.Xt : xanthes tendineux; BMI : indice de masse corporelle; MCV : maladie cardiovasculaire.

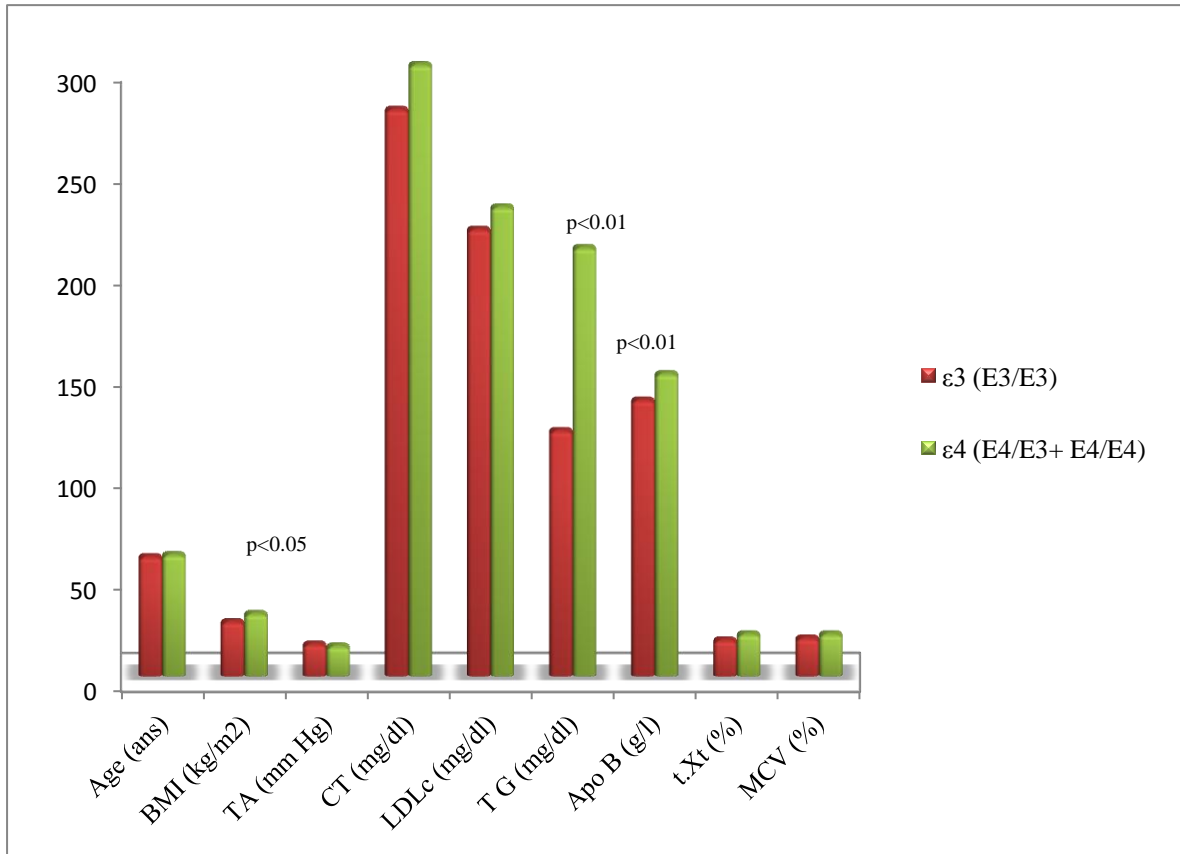


Figure 24: Comparaison des données biologiques des patients en fonction des allèles ε3 et ε4 (E4/E4 et E4/E3)

Comme mentionné précédemment, aucune femme de groupe de patients étudiés ne porte l'allèle ε4. La comparaison des données biologiques entre des femmes et des hommes porteurs de l'allèle ε3 avec celles des hommes porteurs de l'allèle ε4 (E4/E4 et E4/E3) a montré que les femmes porteuses de l'allèle ε3 ont un BMI (28kg/m²) plus élevé que les hommes porteurs du même allèle (25 kg/m²) ($p < 0.05$) mais ne montre pas de différence significative avec le BMI des hommes porteurs de l'allèle ε4 (30 kg/m²). Les hommes porteurs de l'allèle ε4 ont des concentrations de triglycérides significativement plus élevées que les hommes et les femmes porteurs de l'allèle ε3 ($p < 0,05$). Les hommes porteurs de l'allèle ε4 ont des taux élevés de l'apolipoprotéine B (apoB) en comparaison avec ceux des hommes et des femmes porteurs de l'allèle ε3 mais cette élévation n'est pas significative (Tableau 23).

Tableau 23: Influence des allèles de l'apoE sur les données biologiques des sujets sans mutations selon le sexe.

Allèle	hommes ε 3	femmes ε3	Hommes ε4
N	8	23	9
Age (années)	58	57	59
BMI (kg/m ²)	25*	28	30*
CT(mg/dl)	300	300	300
LDLc (mg/dl)	202	216	213
TG (mg/dl)	120*	129*	200*
Apo B (mg/dl)	134	135	147

* $p < 0.05$

CT: cholestérol total; LDL-c: cholestérol LDL; TG : triglycérides ; apoB : apolipoprotéine B ; BMI : indice de masse corporelle;

Discussion

A. Variations phénotypiques des patients hétérozygotes HF du Nord du Maroc:

De nos jours, les variations phénotypiques des patients hétérozygotes HF (mutations dans le gène *LDLR*) sont bien établies dans la plupart des populations à travers le monde. Actuellement, plus de 40 pays dont l'Arabie Saoudite (seul pays arabe) collaborent dans le programme MEDPED pour identifier, diagnostiquer les patients et aider à la formation des médecins pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale. Jusqu'à présent, aucune donnée sur la population marocaine n'est disponible concernant le profil clinique des patients hétérozygotes HF. Les études réalisées sur la population marocaine ont porté essentiellement sur des patients homozygotes HF (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006). Par conséquent, les études précédentes restent insuffisantes pour décrire le phénotype de l'HF dans notre pays. Dans ce contexte notre étude a été menée pour identifier des patients ADH dans la population du Nord du Maroc. L'application des trois approches de diagnostic de l'ADH : le programme MEDPED, le Simon Broome Register Group Criteria et le Dutch lipid Clinic Network Criteria, nous a permis de sélectionner 46 patients indépendants originaires du nord du Maroc, ayant un profil clinique et biologique d'ADH. Ces patients présentent un profil lipidique significativement élevé par rapport à la population normale. La majorité de nos patients ne sont diagnostiqués hypercholestérolémiques qu'après avoir eu des maladies cardiovasculaires ou maladies cérébrovasculaires. Ceci peut expliquer le taux élevé des maladies cardiovasculaires (24 %) observé chez cette population. La fréquence des maladies cardiovasculaires est significativement élevée chez les femmes que chez les hommes dans notre population. Les maladies cérébrovasculaires sont absentes chez les hommes mais sont observées chez 7% des femmes. En effet, l'âge moyen des femmes étudiées est de 57 ± 9 ans dont la majorité sont ménopausées. La sédentarité est notée chez la totalité de ces femmes, ce qui augmente le risque de leur atteinte par les maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires. Ceci peut être également expliqué par le nombre important des femmes étudiées en comparaison avec celui des hommes.

Un autre résultat important de notre étude est la fréquence remarquablement élevée des xanthes chez la population du nord du Maroc cliniquement diagnostiquée ADH selon les critères standards. Cette fréquence apparaît évidente chez nos patients d'âge moyen de 57 ± 10 ans. Des études précédentes ont montré une relation claire entre l'âge des patients hypercholestérolémiques et la fréquence des Xanthes. En effet, les xanthes apparaissent après la quatrième décennie chez les patients hypercholestérolémiques et leur fréquence

augmente de 10 % tout au long de la vie, pendant chaque décennie pour les deux sexes (Civeira et al, 2005). Par ailleurs, l'apparition de xanthomes excessifs dans notre population pourrait être contrôlée par un second gène différent du gène *LDLR* (Vergopoulos et al, 1997 ; Varret et al, 2008).

Un profil d'hyperlipidémie ou de maladies cardiovasculaires ne confirme pas une cause génétique ou un modèle monogénique héréditaire (varret et al, 2008) et les xanthomes ne sont pas utiles pour le diagnostic systématique (Goldstein et Brown, 1989). Par conséquent, une étude génétique est indispensable pour identifier le ou les gènes responsables de l'ADH et vérifier la corrélation entre le génotype déterminé et le phénotype clinique et biologique présenté par les patients.

B. Spectre génétique de l'ADH dans la population du Nord du Maroc:

Jusqu'à présent, peu d'études d'ADH ont été effectuées dans la population marocaine. Une importante limitation de ces études, reconnue même par les auteurs, a été la petite taille des échantillons étudiés (12 sujets) qui ne peut représenter toute la population marocaine (Chater et al, 2006 ; Ait Chihab et al, 2007). En plus, la population marocaine est composée de différents groupes ethniques qui ne sont pas uniformément distribués. La population du Nord du Maroc pourrait être différente de celle des autres régions du pays. Par conséquent, les études précédentes restent insuffisantes pour décrire le spectre génétique complet de l'ADH dans notre pays. Il est donc intéressant de déterminer les bases moléculaires de cette maladie dans la population du Nord du Maroc.

Nous avons réussi à caractériser quatre mutations dans le gène *LDLR* probablement responsables du phénotype de l'HF. Ces mutations ont été identifiées à l'état hétérozygote chez cinq patients indépendants originaires de différentes villes de la région du nord du Maroc. A notre connaissance, trois de ces quatre mutations sont identifiées pour la première fois et s'ajoutent aux 1700 lésions moléculaires déjà répertoriées, identifiées dans les différentes populations mondiales. Il s'agit de la mutation *p. R57H* localisée dans l'exon 3 et des mutations *p. W789L* et *p.V806F* localisées dans l'exon 17. La quatrième mutation (*p.C146X*) a été rapportée précédemment par d'autres équipes dans d'autres populations du monde (Lombardi et al, 1995; Bodamer et al, 2002 ; Souverein et al, 2007). Aucune mutation, dans le gène *APOB* et le gène *PCSK9*, n'a été identifiée dans la population du Nord du Maroc.

1. Gène *LDLR* :

Le gène du récepteur des lipoprotéines de faible densité (*LDLR*) code pour une glycoprotéine de surface cellulaire qui joue un rôle critique dans le contrôle du cholestérol plasmatique en effectuant la clairance des lipoprotéines riches en cholestérol de la circulation (Brown et Goldstein, 1986). En effet, l'hypercholestérolémie familiale (HF), qui est l'une des erreurs les plus communes de métabolisme hérité, est causée par des mutations du gène codant le *LDLR* (Jeon et Blacklow, 2005). Le nombre de mutations qui touchent le gène *LDLR* augmente continuellement depuis sa découverte. Actuellement, la base de données de l'Université de London comprend plus de 1700 mutations qui affectent le gène *LDLR* (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>) (Leigh et al, 2008; Akl CF et Georges MN, 2011).

L'analyse du gène *LDLR* par séquençage direct automatique nous a permis de décrire le premier rapport de mutations géniques du gène *LDLR* chez des patients hétérozygotes HF du Nord du Maroc. Ainsi, nous avons identifié quatre mutations probablement responsable de l'hypercholestérolémie familiale chez la population du Nord du Maroc et onze polymorphismes qui n'ont aucune influence sur la cholestérolémie.

1.1. Mutations causantes de l'HF dans la population du Nord du Maroc :

1.1.1. La mutation non sens (*p. C 146X*) :

Nous avons caractérisé la mutation codon stop *p.C146X* à l'état hétérozygote, dans l'exon 4 du gène *LDLR*, chez une patiente de 55 ans qui a présenté un phénotype clinique et biologique très sévère.

La Mutation non sens (*p. C 146X*) est une mutation nulle de classe 1. (Hobbs et al, 1992 ; Lombardi et al, 1995; Gaudet et al, 1999). Elle provoque un arrêt prématuré de la protéine immunoprécipitable (Goldstein et al, 2000 ; Austin et al, 2004b ; Olga et al, 2007). Les cellules porteuses de ce type de mutations démontrent une activité du *LDLR* inférieure à 2% de l'activité normale. En plus, la mutation *p.C146X* est localisée dans l'exon 4 qui code pour la cinquième répétition du domaine de liaison du récepteur LDL, (Goldstein et al, 2001). La répétition est nécessaire à la fois, pour lier les LDL par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine B et les VLDL par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine E. Par conséquent, les mutations dans cette région et les mutations nulles sont associées à un phénotype plus sévère que celui

associé à d'autres mutations localisées dans d'autres régions du gène *LDLR* (Gudnason et Humphries, 1994 ; Melissa et al, 2004).

1.1.2. Les mutations faux sens :

Les mutations faux sens du gène *LDLR* responsables de l'HF sont associées à des phénotypes cliniques et des taux des lipides variés. Les mutations faux sens affectant le domaine de liaison du récepteur des LDL à l'apolipoprotéine sont corrélées à un phénotype sévère en comparaison avec les autres mutations faux sens affectant les autres domaines (Real et al, 2003). En outre, on ne peut exclure, dans la population avec hypercholestérolémie familiale, la variabilité des phénotypes lipidiques due à l'influence environnementale et d'autres facteurs génétiques (Carmena-Ramon et al, 1998, Real et al, 2003).

- la mutation *p.R57H* :

Cette mutation est produite dans l'exon 3 du gène *LDLR*. Ce nucléotide changé lors de cette mutation est conservée chez 11 mammifères, y compris 3 Hominidae (l'orang-outan, le chimpanzé et l'Homme) suggérant que la mutation *p.R57H* est survenue sur un résidu qui a été conservé au cours de l'évolution (Mehta et al, 1991). En plus, les exons 2–6 codent pour le domaine de liaison du récepteur au ligand. Puisque cette région est essentielle pour lier l'apolipoprotéine B-100 (apo B-100) et l'apolipoprotéine E (apo E) au récepteur, la mutation *p.R57H* sera probablement responsable d'une liaison défectueuse ou un transport d'allèle défectueux (Hobbs, 1992).

La Mutation faux sens *p.R57H* est probablement responsable du phénotype de l'HF chez la patiente qui la porte, puisqu'aucune autre mutation causante de la maladie n'a été identifiées ni dans le gène *LDLR* ni dans les gènes *APOB* et *PCSK9*. Une autre mutation produite au niveau de cette position, *p.R57C*, a été décrite précédemment dans la population indienne d'Afrique du Sud et a été considérée comme responsable de l'hypercholestérolémie familiale (HF) (Callis et al, 1998).

La patiente qui porte cette mutation présente un phénotype clinique et biochimique modéré contrairement au patient de la population indienne d'Afrique de sud qui porte la mutation *p.R57C*. Cette différence peut être expliquée par la différence d'origine ethnique des deux populations ainsi que par le mode de vie économique de chaque population.

La mutation *p.R57H* a été absente dans les 178 chromosomes de contrôle examinés.

- **La mutation *p.W789L*:**

La Mutation faux sens *p.W789L* a été identifiée à l'état hétérozygote chez un patient de 62 ans qui a présenté un phénotype clinique et biochimique sévère. En effet, la mutation *p.W789L* est produite sur l'exon 17 codant pour le domaine cytoplasmique du *LDLR*, qui est important pour la localisation des récepteurs des LDL dans des puits couverts de clathrine à la surface cellulaire (Goldstein et al, 2001). C'est une mutation de classe 4 qui va probablement empêcher les récepteurs des LDL de se localiser dans les puits couverts de clathrine après avoir lié le ligand évitant ainsi l'internalisation du complexe *LDLR* /ligand à la membrane cellulaire et le recyclage du récepteur LDL (Goldstein et al, 2000).

La mutation *p.W789L* est probablement responsable du phénotype de l'HF chez le patient qui la porte, puisqu'aucune autre mutation causante de la maladie n'a été identifiée ni dans le gène *LDLR* ni dans le gène *APOB* et le gène *PCSK9*. La mutation *p.W789L* a été absente dans les 178 chromosomes de contrôle examinés.

- **La mutation *p.V806F* :**

La mutation *p.V806F* est produite sur l'exon 17 codant pour le domaine cytoplasmique du *LDLR*, qui est important pour la localisation des récepteurs des LDL dans des puits couverts de clathrine à la surface cellulaire (Goldstein et al, 2001). C'est une mutation de classe 4 qui va probablement provoquer les mêmes effets décrits dans le cas de la mutation *p.W789L*. En plus, la mutation *p.V806F* peut être comparée à la mutation *p.V806I*, connue sous le nom FH New York-5, impliquant le même codon 806 qui a été considérée comme responsable de l'hypercholestérolémie familiale (HF) (Zakharova et al, 2005).

Cette mutation a été identifiée, à l'état hétérozygote, chez deux patients indépendants présentant un phénotype clinique et biochimique sévère en comparaison avec le phénotype modéré présenté par le patient porteur de la mutation *p.W789L*.

La mutation *p.V806F* est probablement responsable du phénotype de l'HF chez les deux patients qui la portent, puisqu'aucune autre mutation causante de la maladie n'a été identifiées ni dans le gène *LDLR* ni dans les gènes *APOB* et *PCSK9*. La mutation *p.V806F* a été absente dans les 178 chromosomes de contrôle examinés.

Les mutations du gène *LDLR* causantes de l'HF identifiées dans la population du Nord du Maroc présentent une forte hétérogénéité. En effet, les quatre mutations identifiées dans le gène *LDLR* sont portées par cinq patients indépendants originaires de différentes villes de la région Nord du Maroc avec une moyenne d'environ une mutation par sujet. Notre étude confirme donc, la variabilité des mutations du gène *LDLR* chez la population marocaine suggérée par les autres groupes de recherche marocains qui ont identifié 11 mutations dans le gène *LDLR* chez 12 patients indépendants (El Messal, M., 2003 ; Chater, R., 2006 ; Ait Chihab, 2007). La contribution de ces mutations dans l'HF dans la population du Nord du Maroc est d'environ 11%. Cette contribution est très faible en comparaison avec celle estimée dans la population des autres régions du Maroc (Rabat et Casablanca) qui est d'environ 90%. Cette différence relevée entre les deux populations est probablement due à la petite taille des échantillons étudiés par les autres groupes. Ainsi, la petite taille de l'échantillon présente une limitation importante de ces deux études, reconnue même par les auteurs des travaux précédents (El Messal, M., 2003 ; Chater, R., 2006). Par ailleurs, ces deux études ont porté sur des patients homozygotes HF dont le phénotype clinique est bien connu ce qui favorise la présence des mutations dans le gène *LDLR* de ces patients (Varret et al, 2008). Cette différence pourrait être également expliquée par l'origine ethnique différente des populations analysées (Rabat et Casablanca et le Nord du Maroc) et les habitudes de vie remarquablement différentes entre les deux régions.

1.2. Polymorphismes du gène *LDLR* dans la population du Nord du Maroc :

En plus des mutations causantes de l'HF dans la population du Nord du Maroc, nous avons détecté onze polymorphismes dans le gène *LDLR* dont quatre sont nouveaux dans la population marocaine. Ces polymorphismes n'ont aucune influence sur la cholestérolémie. On les trouve chez les sujets avec et sans mutations causantes de l'HF.

1.2.1. Nouveaux polymorphismes dans la population marocaine :

- ***p.P518P*** : Ce polymorphisme est majoritaire dans la population du Nord du Maroc. Il a été identifié, à l'état hétérozygote, chez l'ensemble des sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %. Ce polymorphisme est identifié pour la première fois dans la population marocaine. Il a été rapporté uniquement dans la population russe, avec une fréquence de 2%, comme variation neutre qui n'a aucune influence sur la cholestérolémie (Zakharova et al, 2005 et 2007).

- **c.1706-10 G>A** : Ce polymorphisme est majoritaire dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence maximale de 100 %. Il n'a pas été identifié auparavant dans la population marocaine mais il a été détecté dans la population italienne comme variation qui n'a aucune influence sur la cholestérolémie (Guardamagna et al, 2009).

- **c.1060 +7 T>C** : Ce polymorphisme est présent dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 67%. Il a été identifié chez les cinq patients hétérozygotes HF. Il est identifié pour la première fois dans la population marocaine mais il a été rapporté auparavant dans la population Malaisienne avec une fréquence de 11.7% (Al-Khateeb et al, 2011).

- **c.1060 +10 G>C** : Ce polymorphisme a été identifié dans notre population avec une fréquence de 76 %. Il a été identifié chez les cinq patients hétérozygotes HF. Il est identifié pour la première fois dans la population marocaine mais il a été rapporté auparavant dans la population française (Amsellem et al, 2002), dans la population grecque avec une très faible fréquence de 1% (George et al, 2004) et dans la population Malaisienne avec une fréquence de 3.2% (Al-Khateeb et al, 2011). Il n'a aucune influence sur la cholestérolémie.

1.2.2. Autres Polymorphismes:

Notre étude génétique nous a permis aussi d'identifier 7 polymorphismes qui ont été rapporté précédemment dans la population marocaine. Il s'agit de :

- **p.C6C** : Ce polymorphisme a été identifié à l'état hétérozygote chez 4 sujets. C'est le polymorphisme le plus rare dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 8 %. Il n'est associé à aucune mutation causante de l'HF identifiée dans le gène *LDLR* chez les cinq patients hétérozygotes HF. Il a été rapporté précédemment dans la population marocaine mais sa fréquence n'a pas été déterminée (Chater et al, 2006 ; El Messal et al, 2003). Il a été également rencontré dans la population russe comme variation qui n'a aucune influence sur la cholestérolémie (Tatishcheva et al, 2001 ; Zakharova et al, 2007).

- **p.A370T** : Ce polymorphisme a été identifié, à l'état hétérozygote, dans la population du nord du Maroc avec une fréquence de 65%. Il n'est associé à aucune mutation causante de l'HF identifiée dans le gène *LDLR* chez les cinq patients hétérozygotes HF. Il a été rapporté précédemment dans la population des autres régions du Maroc avec une fréquence de 33% (El Messal et al, 2003 ; Chater et al, 2006). Il a été initialement identifié dans la population Caucasienne de l'Afrique du sud (Kotze et al, 1993), puis dans la population Caucasienne de

l'Asie (Gudnason et al, 1995; Weiss et al, 1998), dans la population brésilienne avec une fréquence de 3% (Salazar et al, 2002), dans la population russe (Zakharova et al, 2001 et 2007), dans la population canadienne (Wang et al, 2001) et dans la population danoise avec une fréquence de 9.5% à l'état hétérozygote et de 0.3% à l'état homozygote (Frikke-Schmid et al, 2004 ; Brusgaard et al, 2006). Ce polymorphisme n'est pas associé à l'hypercholestérolémie familiale et il n'a pas d'effet sur les taux de cholestérol dans la population générale (Frikke-Schmidt et al, 2004).

- ***p.R450R*** : Ce polymorphisme est majoritaire dans la population du Nord du Maroc. Il a été identifié, à l'état hétérozygote, chez l'ensemble des sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %. Il a été également rapporté dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006) et dans les autres populations du monde comme variation qui n'a aucune influence sur le profil lipidique (Zakharova et al, 2005 et 2007).

- ***p.L554L***: Ce polymorphisme est aussi majoritaire dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 87 %. Il a été également rapporté dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006) et dans les autres populations du monde comme variation qui n'a aucune influence sur le profil lipidique (Zakharova et al, 2005 et 2007). Il a été identifié à l'état hétérozygote chez tous les patients porteurs de mutations dans le gène *LDLR* causantes de l'HF.

- ***p.N570N*** : Ce polymorphisme est aussi majoritaire dans la population du Nord du Maroc. Il a été identifié, à l'état hétérozygote, chez l'ensemble des sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %. Il a été également rapporté dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006) et dans les autres populations du monde comme variation qui n'a aucune influence sur le profil lipidique (Zakharova et al, 2005 et 2007).

- ***p.V632V***: Ce polymorphisme est également majoritaire dans la population du Nord du Maroc. Il a été identifié, à l'état hétérozygote, chez les 46 sujets étudiés avec une fréquence maximale de 100 %. Il a été également rapporté dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006) et dans les autres populations du monde comme variation qui n'a aucune influence sur le profil lipidique (Zakharova et al, 2005 et 2007).

- ***p.R723R*** : Ce polymorphisme est aussi majoritaire dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 100%. Il a été identifié, à l'état hétérozygote chez 44 sujets

(96%) et à l'état homozygote chez 2 sujets (4%). Il a été rapporté dans la population marocaine (El Messal et al, 2003 et Chater et al, 2006) et dans les autres populations du monde comme variation qui n'a aucune influence sur le profil lipidique (Zakharova et al, 2005 et 2007).

Ces quatre derniers polymorphismes (*p.L554L*, *p.N570N*, *p.V632V* et *p.R723R*) ont été identifiés initialement dans la population marocaine (El Messal et al en 2003) mais leur fréquence n'a pas été déterminée. Ces polymorphismes ont été ensuite rapportés dans la population russe (Zakharova et al, 2005 et 2007).

2. Gène *APOB* :

L'interaction entre les LDL et les récepteurs des LDL est fondamentale pour la régulation du cholestérol plasmatique humain (Goldstein et al, 1985). La seule protéine composante de LDL est l'apoB-100 qui constitue le lien majeur pour le récepteur des LDL (Kane et Havel, 1995). L'apoB-100 est l'intermédiaire qui lie les LDL aux récepteurs des LDLs. Le domaine de l'apoB-100 qui interagit avec le récepteur des LDL a été défini par plusieurs approches. Au début, le modèle proposé de ce domaine de liaison pour le LDLR comprend les deux groupes d'acides aminés [A (3147–3157) et B (3359–3367)] (Knott et al, 1986 ; Law et Scott, 1990). Suite à la découverte de la mutation causante de la FDB au niveau du résidu 3500 (Innerarity et al, 1987 ; Soria et al, 1989) le domaine a inclus les résidus 3130–3630 importants pour la liaison de l'apoB-100 au récepteur des LDLs (Dunning et al, 1991). Ultérieurement, les études d'immuno-microscopie électronique, ont montré que 89% de l'apoB forment une ceinture qui entoure les particules de LDL et que les 11% constitués par le COOH terminal forme un nœud traversant le long de la ceinture, portant les résidus 4154–4189 et 4507–4513 près de l'acide aminé 3500 (Chatterton et al, 1995). Plus précisément, il a été rapporté que la liaison normale du récepteur nécessite une interaction entre l'arginine 3500 et le tryptophane 4369 dans le carboxy-terminal de l'apoB-100 (Boren et al, 2001). Il a été rapporté également que le nœud de COOH-terminal fonctionne comme un modulateur négatif de la liaison du récepteur et inhibe la liaison des LDLs aux récepteurs LDL par l'apoB-100 (Boren et al, 1998 ; Varret et al, 2008).

A nos jours, le spectre de mutations du gène *APOB* est incomplet (Akl CF et Georges MN, 2011). Dix mutations causantes la FDB ont été décrites dans des différentes populations

(Leigh et al, 2008; Varret et al, 2008). La mutation la plus fréquente et la mieux caractérisée est la mutation faux-sens R3500Q (Varret et al, 2008; Ejarque et al, 2008; Jelassi et al, 2009).

Notre étude n'a révélé aucune mutation dans le gène *APOB* causante de la FDB au nord du Maroc. L'analyse, par séquençage direct automatique, de quatre zones de l'exon 26 et d'une zone de l'exon 29 du gène *APOB*, nous a permis d'identifier quatre polymorphismes du gène *APOB* dans la population du nord du Maroc dont deux sont identifiées dans l'exon 26 et les deux autres dans l'exon 29. Ces polymorphismes n'ont pas été identifiés auparavant dans la population marocaine mais ils ont été rapportés précédemment dans les populations du monde comme variations qui n'influencent pas le profil lipidique.

2.1. Polymorphismes du gène *APOB* dans la population du nord du Maroc:

2.1.1. Polymorphisme de l'exon 26:

- ***p.T3567T*** : Ce polymorphisme a été identifié, à l'état hétérozygote, dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 48 %. Il est identifié pour la première fois dans la population marocaine. Il a été récemment identifié dans la population caucasienne avec une fréquence de 80% chez des patients qui ont la maladie cardiovasculaire. Cependant, il n'est associé ni à l'hypercholestérolémie ni aux maladies cardiaques (Biesecker et al, 2009 ; Sudmant et al, 2010).

- ***p.N3579N*** : Ce polymorphisme a été identifié, à l'état hétérozygote, dans notre population avec une fréquence de 69%. Il est identifié pour la première fois dans la population marocaine. Il a été récemment détecté chez des patients ayant la maladie cardiovasculaire mais il n'est associé ni à l'hypercholestérolémie ni aux maladies cardiaques (Sudmant et al, 2010).

2.1.2. Polymorphisme de l'exon 29:

- ***p.S4211N*** : Ce polymorphisme est majoritaire dans notre population. Il a été identifié, à l'état hétérozygote, chez l'ensemble des patients étudiés avec une fréquence de 100%. Il n'a pas été identifié auparavant dans la population marocaine. Il a été récemment rapporté dans les autres populations chez des patients ayant la maladie cardiaque mais il n'est associé ni à l'hypercholestérolémie ni aux maladies cardiaques (Kondo et al 2009; Bessho et al, 2009 ; Sudmant et al, 2010).

- ***p.V4238A*** : Ce polymorphisme est le moins fréquent dans la population du Nord du Maroc avec une fréquence de 7%. Il a été décrit précédemment dans la population Norvégienne comme polymorphisme qui n'a aucune influence sur les concentrations des paramètres lipidiques (Leren et Berge, 2008). Dans notre travail, ce polymorphisme a été identifié chez trois patients qui ont présenté des taux légèrement élevés des triglycérides. Ces patients avaient un âge moyen de 65 ans. En effet, il a été montré que l'âge est positivement corrélé au cholestérol total et aux triglycérides et c'est le facteur qui a le plus d'influence sur les paramètres lipidiques (Lahlali- Kacemi et al, 2002). Cette approche ne peut exclure l'influence d'autres facteurs génétiques.

Aucun des trois variations (*p.T3567T* ; *p.N3579N*; *p.V4238A*) identifiés dans le gène *APOB* n'a été détectées chez les patients génétiquement diagnostiqués hétérozygotes HF de la population du Nord du Maroc.

3. Gène *PCSK9* :

L'analyse par séquençage automatique de la totalité du gène *PCSK9* n'a montrée aucune variation de ce gène chez les 46 probands adultes du nord du Maroc cliniquement diagnostiqués ADH selon les critères standards.

D'après ces résultats on peut noter clairement que seules les mutations identifiées dans le gène *LDLR* qui contribuent à l'ADH dans la population du Nord du Maroc. Cette contribution est de l'ordre de 11%. Des études utilisant les approches moléculaires ou génétiques ont évalué la contribution des mutations dans le gène *LDLR*, à l'HF, à des taux variant entre 37 et 82.1% (Varret et al; 2008). Ces données montrent une grande différence, dans la distribution des mutations du gène *LDLR*, entre la population mondiale et la population du Nord du Maroc. De telle différence montre que l'ADH dans le Nord du Maroc n'est pas principalement due aux mutations dans le gène *LDLR*, le gène *APOB* et le gène *PCSK9*. Il est intéressant de noter également le degré d'endogamie (mariages co-sanguins) élevé dans la population marocaine, favorisant la possibilité d'un effet fondateur d'une mutation dans un gène jusqu'à maintenant inconnu.

C. Corrélation entre le phénotype et le génotype chez les patients hétérozygotes HF du Nord du Maroc:

Les cinq patients porteurs des mutations dans le gène *LDLR* sont cliniquement diagnostiqués "certain" ADH selon les critères standards. Aucun des patients classés "probable" ou "possible" ne porte de mutations dans le gène *LDLR*. Ces patients ont eu des scores élevés par rapport aux patients sans mutations (12 ± 2 , $p < 0.01$). Ce résultat montre que la probabilité d'avoir une mutation dans le gène *LDLR*, dans la population du nord du Maroc, augmente lorsque le score HF est plus élevé.

L'analyse statistique des données cliniques et biologiques présentées par les patients génétiquement diagnostiqués hétérozygotes HF a montré une association significative entre les mutations du gène *LDLR* et le taux de cholestérol LDL, le score FH, les xanthomes tendineux et la maladie cardiovasculaire prématurée ($p < 0.01$). Les patients avec mutations dans le gène *LDLR* ont en général des scores HF élevés en comparaison avec les patients sans mutations (12 ± 2 , $p < 0.01$) ce qui est en accord avec les résultats des études précédentes (Fouchier et al, 2001 ; Punzalan Felix et al, 2005). Les patients avec mutations dans le gène *LDLR* ont aussi des taux élevés du cholestérol LDL en comparaison avec ceux sans mutations (246 ± 79 mg/dl, $p < 0.05$). Ce résultat est en accord avec les résultats précédemment rapportés chez différentes populations (Punzalan Felix et al, 2005 ; Khoo et al, 2000). Les fréquences des maladies cardiovasculaires prématurées sont aussi plus élevées chez les sujets porteurs de mutations dans le gène *LDLR* (80%, $p < 0.01$). Ceci pourrait être expliqué par la présence des antécédents familiaux en maladies cardiovasculaires chez 80% de ces patients hétérozygotes HF. De même, les fréquences des xanthomes tendineux sont plus élevées chez les sujets porteurs des mutations dans le gène *LDLR* (40%, $p < 0.01$) en comparaison avec les patients sans mutations. Ceci pourrait être expliqué par les taux élevés de cholestérol total et de cholestérol LDL que présentent ces sujets et qui sont favorables pour la formation des xanthomes (Civeira et al, 2005). Par ailleurs, en se basant sur nos données cliniques et biologiques, la fréquence des maladies cardiovasculaires prématurées est plus élevée (40 %) chez les patients avec mutations présentant les xanthomes tendineux. Ce résultat est confirmé par les résultats des études précédentes qui ont montré que 30 à 50% approximativement des patients génétiquement diagnostiqués hétérozygotes HF présentent des xanthomes tendineux (Ferrieres et al, 1995; Bertolini et al, 2000; Descamps et al, 2001) et que la présence des xanthomes a été associée aux maladies cardiovasculaires prématurées (MCVP) (Hopkins et al,

2001; Civeira et al, 2005). En effet, la présence des xanthomes augmente le risque des maladies cardiaques prématurées chez les patients hétérozygotes HF (Hirobe et al, 1982; Mabuchi et al, 1989 ; Hill et al, 1991 ; Kotze et al, 1993; Bertolini et al, 2000 ; Real et al, 2001 ; Alonso et al, 2002 ; Civeira, 2004).

Les patients hétérozygotes HF identifiés au cours de cette étude ont présenté des taux élevés du cholestérol total (312 ± 63 mg.dl) et des fréquences élevées de xanthomes, des maladies cardiaques prématurées et des antécédents familiaux en hypercholestérolémie et en maladies cardiovasculaires ainsi qu'un score HF élevé. Ces résultats appuient l'identification des cas potentiels de l'hypercholestérolémie familiale, basée sur l'examen physique et le profil lipidique parmi les patients ayant les caractéristiques cliniques de l'HF.

Nos résultats ont montré également que les mutations identifiées dans le gène *LDLR* influencent d'une manière variable les phénotypes cliniques et biochimiques. Ces résultats confirment les données rapportées précédemment par Real qui a lié cette variabilité de l'influence des mutations du gène *LDLR*, sur le phénotype de l'hypercholestérolémie familiale, aux types des mutations présentes au niveau de ce gène (Real et al, 2003).

La mutation non sens *p.C146X* est associée à un phénotype très sévère caractérisé par des taux très élevés de CT et de LDLc, malgré le traitement hypolipémiant régulier suivie par la patiente, la présence de xanthomes tendineux excessifs et la maladie cardiovasculaire prématurée. Cette mutation est considérée comme mutation nulle de classe 1. Ce résultat est en accord avec les résultats rapportés précédemment. Ainsi, Gudnasson et Humphries ont rapporté que les sujets HF portant les mutations nulles ont des taux très élevés de LDLc (Gudnasson et Humphries, 1994) et que les taux des lipides ne seront pas diminués de la même mesure que les porteurs d'autres types de mutations (Sun et al, 1998). Ce même résultat a été confirmé ensuite par Rael et al en 2003.

La mutation faux sens *p.R57H* est associée à un profil lipidique modéré avec absence de la maladie cardiovasculaire prématurée. Ce phénotype modéré pourrait être expliqué par l'origine ethnique des habitants de la ville de Tétouan qui est différent des autres villes du Maroc. Il pourrait être expliqué également par les habitudes de vie différentes et du régime alimentaire pauvre en matière grasse et basé principalement sur la consommation des poissons. Par ailleurs, le phénotype pourrait être modéré grâce au traitement hypolipémiant

qui permet une diminution des taux des lipides chez les porteurs de ce type de mutations (Sun et al, 1998).

La mutation faux sens *p. W789L* est associée à des taux élevés de CT et de LDLc avec présence de la maladie cardiovasculaire prématurée mais absence des xanthomes. La mutation *p.V806F* a été identifiée chez deux patients indépendants avec des phénotypes différents. Elle est associée à des taux modérés de CT et de LDLc avec présence de la maladie cardiaque prématurée et absence des xanthomes chez la femme originaire de la ville de Tanger. Par contre elle est associée à des taux élevés de CT et de LDLc avec présence de xanthomes cutanés chez l'homme originaire de la ville de Sebta. La différence de phénotype entre les deux patients portant la même mutation pourrait être expliquée par les facteurs environnementaux qui peuvent également influencer le phénotype des patients HF (Pimstone et al, 1998 ; Real et al, 2003). En effet, les habitudes de vie sont largement différentes entre la ville de Tanger et la ville de Sebta. Ceci peut expliquer, en partie, la différence des phénotypes présentés par chaque patient. Pimstone et al ont montré que les chinois hétérozygotes HF vivant au Canada montrent un phénotype similaire à celui des autres patients des pays occidentaux, et différent de celui des patients hétérozygotes HF vivant en chine (Pimstone et al, 1998).

D. Génotype de l'apolipoprotéine E (apoE) :

Il est clairement établi que la fréquence des allèles de l'apo E diffère selon l'origine ethnique des populations étudiées (Siest et al, 1995, Couderc et Bailleul, 1998; Lahlali-Kacemi et al, 2002). Plusieurs études ont montré l'hétérogénéité de la fréquence du génotype de l'apoE parmi les populations (Davignon et al, 1988 ; Couderc et Bailleul, 1998 ; Lahlali-Kacemi et al, 2002 et Jemaa et al, 2006). Cette hétérogénéité de la fréquence du génotype de l'apoE apparaît aussi parmi les populations des différentes régions marocaines. Des études marocaines menées précédemment dans des régions du Maroc (Rabat-Casablanca) autres que le nord du Maroc ont déterminé la fréquence des allèles de l'apoE (Valveny et al, 1997 ; Lahlali K N et al, 2002; Harich et al, 2002 ; They-They et al, 2010). Notre travail est le premier qui a déterminé la distribution des allèles de l'apoE dans la population du nord du Maroc et qui a étudié l'influence de génotype de l'apoE chez des sujets dislipémiques.

1. Distribution et fréquences des allèles du gène de l'apoE dans la population du Nord du Maroc :

La distribution des allèles ϵ_2 , ϵ_3 , et ϵ_4 de l'apo E dans notre série est de 2.2%, 78.3% et 19.5% respectivement. Cette distribution diffère de celle rapportée dans les autres populations marocaines: 11.3%, 78.6% et 10.2% pour les allèles ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4 respectivement (They-They et al, 2010), mais elle est conforme avec les distributions des allèles de l'apoE trouvées dans les populations mondiales (Bailleul et al, 1993, Siest et al, 1998 ; Adroer et al, 1995 ; Mozas et al, 2003 ; Liberopoulos et al, 2004 ; Mediene et al, 2004 ; Jemaa et al, 2006). En effet, l'allèle ϵ_3 est l'isoforme majoritaire dans toutes les populations, puisque sa fréquence est supérieure à 70 % alors que l'allèle ϵ_2 est le moins fréquent.

Un résultat important de notre étude est la fréquence remarquablement élevée de l'allèle ϵ_4 chez la population du nord du Maroc (Tableau 24). Cette fréquence se rapproche de celle de l'Europe du nord Suède (Eggertsen et al, 1993), de l'Irlande du nord (Sheehan et al, 2000) (Figure 25).

En revanche, des différences significatives existent entre nos résultats et ceux des autres populations marocaines (Valveny et al, 1997 ; Lahlali K N et al, 2002; Harich et al, 2002 ; They-They et al, 2010) , de la population maghrébine (Tunisie (Jemaa et al, 2006) et l'Algérie (Mediene et al, 2004) et des populations de l'Europe de sud (France (Bailleul et al, 1993, Siest et al, 1998), Espagne (Adroer et al, 1995 ; Mozas et al, 2003), Grèce (Liberopoulos et al, 2004)) (Tableau 24). Une étude Espagnole précédente a comparé les fréquences des allèles de l'apoE dans les populations de l'Afrique du nord et dans la population de la péninsule ibérique et a montré que la fréquence de l'allèle ϵ_4 augmente en se dirigeant du sud de l'Afrique vers le nord (Moral et al, 2003). Cette différence est probablement due à la différence de taille des échantillons étudiés. Nous avons réalisé cette étude sur 46 patients indépendants alors que les autres groupes ont analysés des échantillons de grande taille (100 sujets (Lahlali et al, 2002) et 140 sujets (Harich et al, 2002). Une autre explication c'est que nous avons travaillé sur des patients hypercholestérolémiques avec un profil clinique et biologique de l'ADH. Les autres auteurs ont étudié des sujets sains.

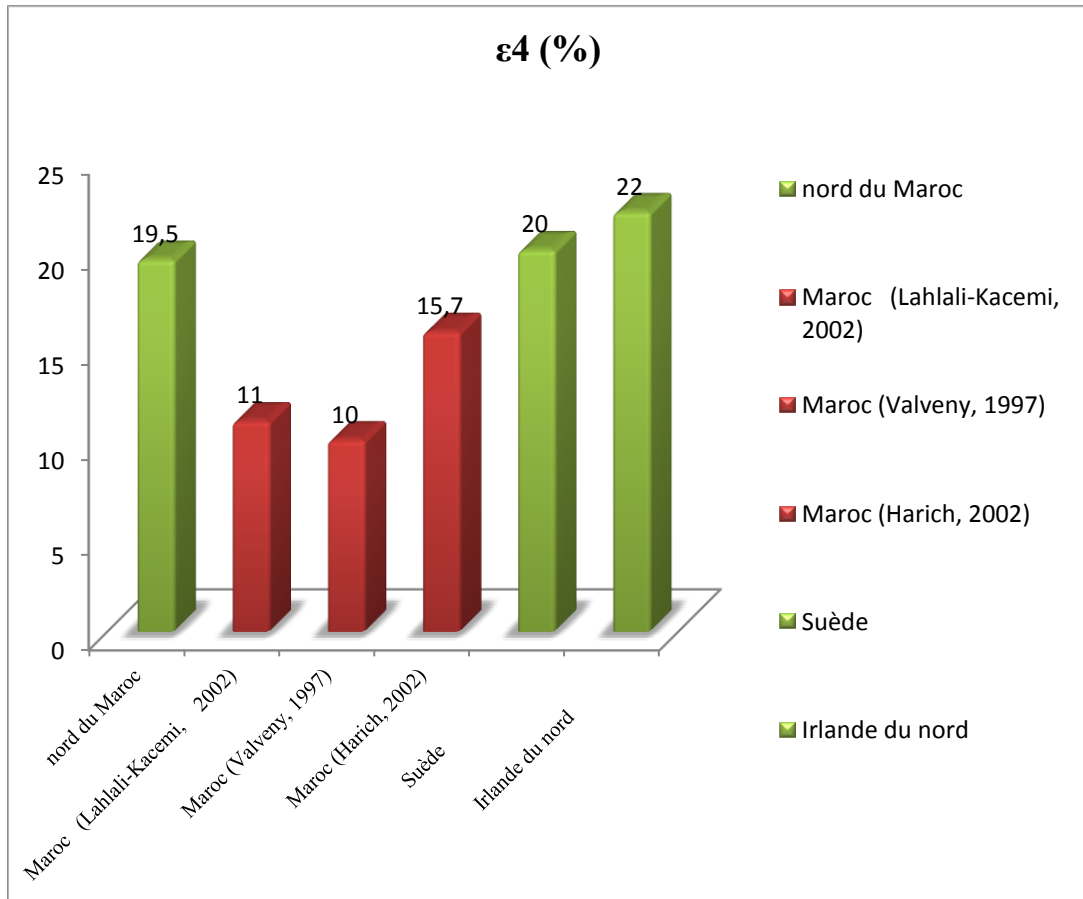


Figure 25: Fréquence de l'allèle ε4 chez la population du nord du Maroc et les populations des autres régions marocaine et les populations de l'Europe du Nord

Tableau 24: Comparaison des fréquences alléliques de l'apo E entre la population du Nord du Maroc et des populations d'autres origines ethniques

Population étudiée	ε4 (%)	ε3 (%)	ε2 (%)
Nord du Maroc *	19.5	78.3	2.2
Maroc (Lahlali-Kacemi, 2002)	11	84	5
(Valveny, 1997)	10	86	4
(Harich, 2002)	15.7	79.8	4.5
Tunisie (Jemaa, 2006)	8.1	84.6	7.3
Algérie (Mediene-Benchekor, 2004)	10	84	6
Espagne (Adroer, 1995)	10	86	4
(Mozas, 2003)	9	89	2
France (Bailleul, 1993)	12	80	8
(Siest, 1998)	8	79	13
Grèce (Liberopoulos, 2004)	15	76.9	8
Suède (Eggertsen, 1993)	20	72	8
Irlande du nord (Sheehan, 2000)	22	66	12

*Population étudiée

La différence entre les résultats de notre étude et ceux des études précédentes pourraient également être expliquée par l'origine ethnique différente des populations analysées. En effet, les études marocaines précédentes ont montré que la distribution des allèles de l'apoE diffère entre la population d'origine berbère (Harich et al, 2002) et la population de Rabat et les régions (Lahlali et al, 2002). Par ailleurs, le mode de vie économique peut influencer la distribution des allèles de l'apo E dans les populations. En effet, le mode de vie était jusqu'au passé récent difficile dans la région du nord du Maroc. Les résultats de l'étude de Corbo et Scacchi ont montré que la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE augmente chez les populations ayant un tel mode économique (Corbo et Scacchi, 1999).

2. Influence de génotypes de l'apoE sur les caractéristiques cliniques et lipidiques chez la population hypercholestérolémique du nord du Maroc :

L'apolipoprotéine E est un ligand du récepteur de LDL (low density lipoprotéine). Elle joue un rôle important dans le catabolisme des lipoprotéines riches en cholestérol et en triglycérides. La contribution de génotype de l'apoE dans le métabolisme des lipides et le risque des maladies cardiovasculaire a été étudié précédemment (Bertolini et al, 2000 ; Lambert et al, 2001).

Notre étude consiste à étudier la distribution des allèles de l'apo E dans le profil clinique et biochimique de la population hypercholestérolémique du Nord du Maroc. Elle a montré que les cinq patients hétérozygotes HF ont été homozygotes pour l'allèle $\epsilon 3$ de l'apoE. Le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ est le plus courant et le plus commun dans toutes les populations du monde (type sauvage). Ceci exclu l'influence des allèles de l'apo E chez les patients hétérozygotes HF de notre population. Par ailleurs, notre étude a montré, chez les 41 probands sans mutations, que les génotypes de l'apo E n'influencent pas les taux de cholestérol total et le cholestérol LDL mais ils influencent les concentrations des triglycérides et de l'apo B qui sont significativement élevées chez les sujets porteur de l'allèle $\epsilon 4$ en comparaison avec celles des sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 3$. D'après les données cliniques, ces sujets sont obèses avec une moyenne de BMI de 30 kg/m^2 . Ce résultat confirme le travail de Fumeron qui a rapporté une association remarquable de l'allèle $\epsilon 4$ avec l'hypertriglycéridémie chez la population obèse en France (Fumeron et al, 1988). Gueguen et al en 1989 a aussi montré que les individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ avaient une élévation importante de taux de triglycérides par rapport à ceux des sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 3$ (Eggertsen et al, 1993). Par ailleurs, d'autres

études confirment l'élévation des concentrations d'apo B chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (Schaefer et al, 1994; Hsueh et al, 2000; Sheehan et al, 2000 ; Lahlali-Kacemi et al, 2002).

La fréquence des maladies cardiovasculaires (MCV) ne diffère pas entre les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ et ceux porteur de l'allèle $\epsilon 3$. Il a été suggéré que le génotype de l'apoE ne contribue pas significativement dans le risque des MCV chez les sujets hypercholestérolémiques adultes (Mozas et al, 2003). En plus, l'âge moyen de groupe de patients concernés par notre étude est de 57 ans. Une étude comparative des paramètres lipidiques et d'infarction myocardique chez des sujets âgés de plus de 35 ans a montré que la variation de ces paramètres est due à l'influence de l'âge et non pas au génotype de l'apoE (Real et al, 2002 ; Vasilios, 2004).

*Conclusion
et
Perspectives*

Malgré la fréquence élevée de l'ADH à l'échelle mondiale, elle reste encore sous-diagnostiquée dans la population générale et partiellement élucidée sur le plan génétique. A nos jours, la découverte de nouvelles mutations dans le gène *LDLR* responsables de l'HF est continue et le nombre de ces mutations ne cesse d'augmenter depuis la découverte de ce gène. Le spectre de mutations du gène *APOB* est encore incomplet et le mécanisme d'action du gène *PCSK9* dans l'interaction avec le gène *LDLR* n'est pas connu. Au Maroc peu d'études ont été réalisées pour étudier l'ADH. Une grande limitation de ces études est la petite taille des échantillons qui ne peuvent représenter la population marocaine.

Notre étude est la première au Nord du Maroc qui a déterminé le spectre de mutations du gène *LDLR* causant l'HF chez des patients adultes cliniquement diagnostiqués ADH selon les programmes MEDPED, Simon Broome Register Group criteria et Dutch Lipid Clinic Network criteria. Elle nous a apporté des informations importantes sur les bases moléculaires de l'ADH dans cette population.

Au niveau du gène *LDLR*, nous avons caractérisé quatre nouvelles mutations à l'état hétérozygote responsables de l'HF dans la population du Nord du Maroc dont trois n'ont jamais été identifiées auparavant. Nous avons montré une forte hétérogénéité des mutations dans la population du Nord du Maroc et une grande variabilité de l'expression de la maladie selon les mutations. Nos résultats appuient l'identification des cas potentiels de l'HF dans notre population.

Au niveau du gène *APOB* et du gène *PCSK9*, nous n'avons identifié aucune mutation responsable de l'ADH dans la population du Nord du Maroc. Seules les mutations identifiées dans le gène *LDLR* qui contribuent à l'ADH avec une fréquence de l'ordre de 11%.

Nous avons montré que l'ADH dans le Nord du Maroc n'est pas principalement due aux mutations dans le gène *LDLR* ni dans le gène *APOB* ou le gène *PCSK9*.

Notre étude est la première à déterminer la fréquence des allèles du gène de l'apoE dans la population du Nord du Maroc et leur influence sur le profil lipidique des patients cliniquement diagnostiqués ADH. Nous avons montré une fréquence élevée de l'allèle $\epsilon 4$ (19.5%) dans la population du Nord du Maroc. Cet allèle est associé des taux élevés de l'apoB et à l'hypertriglycéridémie chez la population obèse.

Il est intéressant d'étudier des échantillons de grande taille composés de patients de différentes tranches d'âge pour identifier cliniquement et génétiquement des patients homozygotes et hétérozygotes de l'ADH dans la population du Nord du Maroc.

Il est indispensable d'élargir cette étude à l'échelle nationale et de lancer d'autres axes de recherche contribuant à l'étude de la possibilité d'un effet fondateur d'une mutation dans un gène jusqu'à maintenant inconnu.

Ceci va nous permettre de diagnostiquer et de traiter précocement l'ADH chez les enfants et les adultes et par conséquent diminuer le risque des maladies cardiovasculaires et l'incidence de mortalité de ces maladies dans la population marocaine.

Références bibliographiques

Abifadel M, Varret M, Rabes JP, *et al.* Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34 : 154-156.

Abifadel M, Rabès J-P, Boileau C, Varret M. PCSK9, du gène à la protéine. Un nouvel acteur dans l'homéostasie du cholestérol *Médecine/Sciences* 2006 ; 22 : 916-918.

Abifadel M, Rabes JP, Devillers M, *et al.* Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat* 2009; 30(4):520-529.

Adroer R, Santacruz P, Blesa R, Lopez-Pousa S, Ascaso C, Oliva R. Apolipoprotein E4 allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neurosci Lett* 1995 ; 189 : 182-186.

Ait Chihab K, Chater R, Cenarro A, Kettani A, Castillo S, Loutfi M, Ribalta J, Adlouni A, Pocovi M *et El Messal M.* Familial hypercholesterolemia associated with severe hypoalphalipoproteinemia in a Moroccan family. *J Genet* 2007; 86: 159-163.

Akl C Fahed and Georges M Nemer. Familial Hypercholesterolemia: The Lipids or the Genes? *Nutr Metab (Lond)*. 2011; 8: 23.

Albers-Schonberg G, Joshua H, Lopez MB, *et al.* Dihydromevinolin, a potent hypocholesterolemic metabolite produced by *Aspergillus terreus*. *J Antibiot.* 1981; 34(5):507-512.

Al-Khateeb A, Mohd K Zahri, Mohd S Mohamed, Teguh H Sasongko, Suhairi Ibrahim, Zurkurnai Yusof, Bin A Zilfalil. Analysis of sequence variations in low-density lipoprotein receptor gene among Malaysian patients with familial hypercholesterolemia. *BMC Medical Genetics* 2011 ; 12: 40

Allard D, Amsellem S, Abifadel M *et al.* Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 2005; 26:497.

Alonso R, Castillo S, Civeira F, Puzo J, La Cruz JJ, Pocovi M, *et al.* Heterozygous familial hypercholesterolemia in Spain. Description of 819 non related cases. *Med Clin.* 2002;118:487–492.

Amanda J, Whitfield P, Hugh R. Barrett FM, van Bockxmeer and Burnett JR. Lipid Disorders and Mutations in the *APOB* Gene. *Clinical Chemistry* 2004 ; 50:1725–1732.

- Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, Rabes JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik Y, Vialettes B, et al: Intronic mutations outside of Alu-repeat rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 2002, 111(6):501-510.
- Assouline L, Lambert M, Delvin EE et Lévy É. Régulation de l'expression génique du récepteur des LDL par les facteurs transcriptionnels. *médecine/sciences* 1998; 14: 729-735.
- Attie AD, Kastelein JP & Hayden MR . Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001; 42: 1717–1726.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL and Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* 2004a; 160: 407–420.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol* 2004b; 160(5):421-429.
- Bailleul S, Couderc R, Landais V, Lefevre G, Raichvarg D, Etienne J. Direct phenotyping of human apolipoprotein E in plasma : application to population frequency distribution in Paris (France). *Hum Hered* 1993; 43: 159-165.
- Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, Hennekans CH, Rader DJ & Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 160–167.
- Becker DJ, Gordon RY, Halbert SC, French B, Morris PB, Rader DJ. Red yeast rice for dyslipidemia in statin-intolerant patients, a randomized trial. *Ann Int Med* 2009;150: 830-839.
- Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* 2004; 279(47):48865-48875.
- Bergeron N, Havel RJ. Prolonged postprandial responses of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing an apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 65-72.

- Bertolini S, Cantafora A, Averna M, et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.
- Bessho H, Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A. Coding variant Met72Thr in the PEDF gene and risk of neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis* 2009;15: 1107-1114.
- Biesecker L, Mullikin JC, Facio F, et al. The ClinSeq Project: Piloting large-scale genome sequencing for research in genomic medicine. *Genome Res* 2009; 19(9):1665-1674.
- Blackburn GM and Gait MJ. Nucleic acids in Chemistry and Biology. IRL Press, New York, USA., 1990.
- Boland B, Chenu P, Descamps O, Hermans M, Selvais Ph, Prévost C, Jeanjean M et Brohet Ch. Les dyslipidémies en médecine générale : Détection, attitude et traitement. *Louvain Med* 2000 ; 119: 79-90.
- Boren J, Lee I, Zhu W et al. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 1998: 101 (5): 1084–1093.
- Boren J, Ekstrom U, Agren B et al. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001; 276: 9214–9218.
- Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis E A, Friedman P, Gillotre-Taylor K, Horkko S, Palinski W, Quehenberger O, Shaw P, Steinberg D, Terpstra V and Witztum JL. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947:214-222.
- Breslow JL, Mcpherson J, Nussbaum AL, Williams HW, Lofquist-Kahl F, karathanasis SK and Zannis VI. Identification and DNA sequence of a human apolipoprotein E cDNA clone. *J. Biol. Chem* 1982; 257, (24): 14639-14641
- Broedl UC, Maugeais C, Millar JS, Jin W, Moore RE, Fuki IV, Marchadier D, Glick JM and Rader DJ. Endothelial Lipase Promotes the Catabolism of ApoB-Containing Lipoproteins. *Circ.Res* 2004; 94:1554-1561.

Brown MS, Kovanen PT and Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212:628-635.

Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.

Brugger D, Schuster H, Zollner N. Familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100: comparison of the phenotypic expression in 116 cases. *Eur J Med Res* 1996; 1: 383–386.

Brusgaard K, Jordan P, Hansen H, Hansen AB, Hørdler M. Molecular genetic analysis of 1053 Danish individuals with clinical signs of familial hypercholesterolemia. *Clin Gene*. 2006; 69(3): 277-283.

Burnett JR, Shan J, Brooke A, Miskie BA, Whitfield AJ, Yuan J, Tran K, McKnight CJ, Hegele RA and Yao Z. A Novel Nontruncating *APOB* Gene Mutation, R463W, Causes Familial Hypobetalipoproteinemia. *The Journal Of Biological Chemistry* 2003; 278 (15): 13442–13452.

Callis M, Jansen SR, Thiart J, Nicol de Villiers P, Raal FJ, Kotze MJ Mutation analysis in familial hypercholesterolemia patients of different ancestries: identification of three novel LDLR gene mutations. *Molecular and Cellular Probes* 1998 ;12: 149–152

Cameron J, Holla OL, Ranheim T *et al*. Effect of mutations in the *PCSK9* gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* 2006 ; 15 : 1551-1558.

Carmena-Ramon R, Ascaso JF, Real JT, Ordova's JM, Carmena R: Genetic variation at the apo A IV gene locus and response to diet in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1266– 1274.

Carmena-Ramon R, Real JT, Ascaso JF, *et al*. Effect of apolipoprotein E genotype on lipid levels and response to diet in familial hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:7-13.

Chan JC, Piper DE, Cao Q, *et al*. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(24):9820-9825.

Charlton-Menys V and Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 2008; 93: 27-42.

Chater R., Aït Chihab K, Rabès JP, Varret M, Chabraoui L, El Jahiri Y, Adlouni A, Boileau C, Kettani A and El Messal M. Mutational heterogeneity in low-density lipoprotein receptor gene related to familial hypercholesterolemia in Morocco. *Clinica Chimica Acta* 2006; 373: 62-69.

Chatterton JE, Phillips ML, Curtiss LK et al. Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface. *J Lipid Res* 1995; 36 (9): 2027–2037.

Chen SH, Yang CY, Chen PF, Setzer D, Tanimura M, Li WH, et al. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* 1986; 261:12918–12921.

Chen S H, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee R, Wang SA, Silberman SR, Cai SJ, Deslypere JP, Rosseneu M, Gotto A M, Jr, Li WH and Chan L. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 1987; 238 (4825): 363–366.

Civeira F, Castillo S, Alonso R, Meriño-Ibarra E, Cenarro A, Artied M and the Spanish Familial Hypercholesterolemia Group. Tendon Xanthomas in Familial Hypercholesterolemia Are Associated With Cardiovascular Risk Independently of the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25; 1960-1965.

Civeira F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004; 173: 55–68

Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005; 37: 161–165.

Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 1999; 63(4):301-310.

Couderc R, Bailleul S. L'apolipoprotéine E et ses allèles chez le sujet sain et au cours de l'athérosclérose. *Annales de biologie clinique* 1998 ; 56(6): 651-659.

- Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, Millar JS, Ikewaki K, Siegelman ES, Gregg RE & Rader DJ. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2007; 356: 148–156.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jr., Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 2009; 5(5):474-488.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8 : 1-21.
- Davignon J, Dufour R. Primary Hyperlipidemias. Oxford: Clinical Publishing; 2007. 142 p.
- Davis CG, Goldstein, JL, Sudhof TC, Anderson RG, Russell DW and Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987; 326: 760-765.
- Davis LG., Dibner MD and Battey JF. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Press, New York. 1986; 44-46.
- De Knijff P, Stalenhoef AF, Mol MJ, et al. Influence of apo E polymorphism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atheroscler* 1990; 83:89-97.
- Defesche JC, Stephenson S, Kostner GM, et al. Second WHO consultation and report on familial hypercholesterolemia. Geneva: World Health Organisation. WHO/HGN/FH/CONS/99.2:http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_HGN_FH_CONS_99.2.pdf; 1999; 1-23, A1-A16.
- Defesche J. Familial hypercholesterolemia. In: DJ B, ed. Lipids and vascular disease. London: Martin Dunitz Ltd, 2000: 65–77.
- Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001; 157: 514 –518.
- Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *The FEBS journal* 2008; 275(13): 3480-3493.

DoNDP, familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO Consultation. Geneva: WHO, 1999.

Dunning AM, Houlston R, Frostegard J et al. Genetic evidence that the putative receptor binding domain of apolipoprotein B (residues 3130 to 3630) is not the only region of the protein involved in interaction with the low density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096 (3): 231–237.

Duriez P. Mechanisms of actions of statins and fibrates. *Thérapie* 2003; 58(1):5-14.

Durrington PN. Familial hypercholesterolaemia. In: Hyperlipidaemia, diagnosis and management. London: Wright, 1989: 93-113.

Durrington PN. Hyperlipidaemia. Diagnosis and Management. Hodder Arnold, London 2007.

Eggertsen G, Tegelman R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L. Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem* 1993 ; 39 : 2125-2129.

Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. London : *Arnold, Hodder Headline Group*, 1999; 71-85.

Ejarque I, Real JT, Martinez-Hervas S, Chaves JF, Blesa S and Garcia-Garcia AB *et al.*, Evaluation of clinical diagnosis criteria of familial ligand defective apoB100 and lipoprotein phenotype comparison between LDL receptor gene mutations affecting ligand-binding domain and the R3500Q mutation of the apoB gene in patients from a South European population, *Translational Res* 2008; 151: 162–167.

El Messal M, Ait Chihab K, Chater R, Vallve JC, Bennis F, Hafidi A, et al. Familial hypercholesterolemia in Morocco: first report of mutations in the LDL receptor gene. *J Hum Genet* 2003; 48:199–203.

Eto M, Watanabe K, Chonan N, et al. Familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E4. *Atheroscler* 1988;72:123-128.

Feltgen K. Le Cholestérol: Essai historique sur l'intérêt qu'il a suscité en médecine depuis sa découverte au milieu du XVIIIe jusqu'à l'aube du XXe siècle; Thèse Médecine; Rouen. 1993; 1758-1913.

Ferrieres J, Sing CF, Roy M, et al. Apolipoprotein E polymorphism and heterozygous familial hypercholesterolemia: sex-specific effects. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1553-1560.

Ferrieres J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation. *Circulation* 1995; 92: 290 –295.

Fisher E, Scharnagl H, Hoffmann MM et al. Mutations in the apolipoprotein (apo) B-100 receptor-binding region: detection of apo B-100 (Arg3500–.Trp) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (Glu3405–.Gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. *Clin Chem* 1999; 45: 1026–1038.

Fogge CH. General xanthelasma or vitiligoidea , *Trans Pathol Soc* 1872; 24 :242-243.

Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat* 2005;26:550-6.

Fouchier SW, Defesche JC, Umans-Eckenhausen MW, and Kastelein JP: The molecular of FH in the Netherlands. *Human Gent* 2001;109: 602-615,.

Fox TC. A case of xanthelasma multiplex. *Lancet* 1879; 2: 688-689.

Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(33):11915-11920.

Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967; 276: 215–225.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972 ; 18 : 499-502.

Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG., Schnohr P and Tybjærg-Hansen A. Single nucleotide polymorphism in the low-density lipoprotein receptor is associated with a threefold risk of stroke A case-control and prospective study. *Eur Heart J* 2004; 25 (11): 943-51.

- Fumeron F, Rigaud D, Bertiere MC, Bardon S, Dely C, Apfelbaum M. Association of apolipoprotein ε4 allele with hypertriglyceridemia in obesity. *Clin Genet* 1988; 34: 258–64.
- Gaffney D, Reid JM, Cameron IM et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1025–1029.
- Gaffney D, Pullinger CR, O'Reilly DS et al. Influence of an asparagine to lysine mutation at amino acid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 113–121.
- Gagné C and Gaudet D. Les dyslipoprotéïnémies : L'approche clinique. Québec : 1997 ; 157.
- Gagné C, Moorjani S, Brun D, Toussaint M, Lupien PJ. Heterozygous familial hypercholesterolemia. Relationship between plasma lipids, lipoproteins, clinical manifestations and ischaemic heart disease in men and women. *Atherosclerosis*. 1979; 34(1):13-24.
- Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, et al. The target of ezetimibe is Niemann- Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(23):8132-7.
- Gaudet DC, Gagne P, Perron P Couture and Tonstad S. Ethical issues in molecular screening for heterozygous familial hypercholesterolemia: the complexity of dealing with genetic susceptibility to coronary artery disease. *Community Genet* 1999. 2(1): 2-8.
- Genest J, Frohlich J, Fodor G and McPherson R. Recommendations for the management of dyslipidemia and the prevention of cardiovascular disease: summary of the 2003 update. *CMAJ* 2003; 169: 921-924.
- George VZ, Dedoussis JG, Bettina B, Christos P, John S, Prassa M, Sodnomtsogt L, Pavlos T, Anja V, Ursula K, Hans-P T, and Hartmut S. Molecular Characterization of Familial Hypercholesterolemia in German and Greek Patients. *Human Mutation* 2004, 23(3):285-286.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52: 1544–1568.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985; 1: 1–39.

Goldstein J, Brown M. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*. New York: McGraw-Hill, 1989: 1215–1250.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990 ; 343 : 425-430.

Goldstein JL, Hobbs HH and Brown MS. *Familial Hypercholesterolemia*. New York, NY : McGraw-Hill Publishing Co., 2000; 2863-2913.

Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. 2001;2863-913.

Graham CA, McIlhatton BP, Kirk CW et al. Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate. *Atherosclerosis* 2005; 182: 331–340.

Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST et al. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin kexin 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* 2007;48 (7):763–767.

Grech ED. Pathophysiology and investigation of coronary artery disease. *Bmj* 2003; 326: 1027-1030.

Grundey SM. Cholesterol and coronary heart disease. The 21st century. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1177–1184.

Guardamagna O, Restagno G, Rolfo E, Pederiva C, Martini S, Abello F, Baracco V, Pisciotto L, Pino E, Calandra S, Bertolini S. The Type of LDLR Gene Mutation Predicts Cardiovascular Risk in Children with Familial Hypercholesterolemia 2009 ; 155 (2): 199-204.

Gudnasson V, Humphries SE: Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscle Thromb* 1994; 14: 1717– 1722.

- Gudnason V, Patel D, Sun X-M et al. Effect of the StuI polymorphism in the LDL receptor gene (Ala 370 to Thr) on lipid levels in healthy individuals. *Clin Genet* 1995;47:68–74.
- Gueguen R, Visvikis S, Steinmetz J, Siest G, Boerwinkle E. An analysis of genotype effects and their interactions by using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 702–793.
- Gupta N, Fisker N, Asselin M-C, et al. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression *in vitro* and *in vivo*. PLoS ONE. 2010.
- Gylling H, Aalto-Setälä K, Kontula K, et al. Serum low density lipoprotein cholesterol level and cholesterol absorption efficiency are influenced by apolipoprotein B and E polymorphism and by the FH-Helsinki mutation of the low density lipoprotein receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1368-1375.
- Harich N, Esteban E, Lopez-Alomar A, Chafik A, Moral P. Apolipoprotein molecular variation in Moroccan berbers: Pentanucleotide (TTTTA)_n repeat in the LPA gene and APOE-C1-C2 gene cluster. *Clin Genet* 2002; 62 (3): 240-244
- Hill JS, Hayden MR, Frohlich J, et al. Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1991;11: 290-297.
- Hirobe K, Matsuzawa Y, Ishikawa K, et al. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1982; 44: 201–210.
- Hixson JE and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI, *Journal of Lipid Research* 1990; 31: 545-548.
- Hobbs HH, Leitersdorf E, Leffert CC, Cryer DR, Brown MS, Goldstein JL. Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors. *J Clin Invest* 1989; 84: 656–664.
- Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990; 24: 133- 170.

- Hobbs HH., Brown MS. & Goldstein, JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation* 1992; 1: 445–66.
- Hogue Jean-Charles. contribution de la protéine de transfert des esters de cholestérol à l'hétérogénéité des particules LDL dans l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote *Journal of Lipid Research* 2004; 45: 1077-1083.
- Homer VM, Marais DA, Charlton F, Laurie AD, Hurndel N and Scott R et al. Identification and characterization of two non-secreted *PCSK9* mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa, *Atherosclerosis* 2008; 196: 659–666
- Hopkins PN, Stephenson S, Wu LL, Riley WA, Xin Y, Hunt SC. Evaluation of coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2001; 87: 547–553.
- Hsueh W, Mitchell BD, Hixson JE, Rainwater DL. Effects of the ApoE polymorphism on plasma lipoproteins in Mexican Americans. *Ann Epidemiol* 2000; 10: 524-531.
- Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E Diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 2004; 23: 3.
- Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, *et al.* Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1089-1093.
- Hurtel Jean-Michel, Plantes médicinales et hypercholesterolemie. 2005. www.phytomania.com
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31: 1337–1349.
- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (19): 6919–6923.

- Jelassi A, Jguirim I, Najah M, Maatouk F, Ben Hamda K and Slimane MN. Familial hypercholesterolemia in Tunisia. *Pathologie Biologie* 2009; 57: 5 444-5 450.
- Jemaa R, Elasmi M, Naouali C, Feki M, Kallel A, Souissi M, Sanhaji H, Hadj Taïeb S, Souheil O, Kaabachi N. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: Frequency and effect on lipid parameters. *Clin Biochem* 2006 ; 39 : 816–820.
- Jeon H and Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 2005;74:535-562.
- John R. Burnett, Jing Shan, Brooke A. Miskie, Amanda J. Whitfield, Jane Yuan, Khai Tran, C. James McKnight, Robert A. Hegele, and Zemin Yao. A Novel Nontruncating *APOB* Gene Mutation, R463W, Causes Familial Hypobetalipoproteinemia. *The journal of biological chemistry* 2003; 278 (15): 13442–13452.
- Kane J, Havel R. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: Mc Graw-Hill, 1995: 1853–1886.
- Kastelein JJ, Wedel MK, Baker BF, et al. Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation* 2006 17;114 (16):1729-35.
- Khachadurian, AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 1964; 37: 402-407.
- Khoo KL, Van Acker P, Defesche JC, Tan H, van de Kerkhof L, Heijnen-van Eijik SJ, Kastelein JJ, and Deslypere JP. Low density lipoprotein receptor gene mutations in Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia. 2000; 58: 98-105.
- Knott TJ, Pease RJ, Powell LM et al. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 1986: 323 (6090): 734–738.
- Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M et al, Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol : A meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 999-1008.

- Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A. SOD2 gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopath. *Mol Vis* 2009 ;15:1819-1826.
- Kostrzewa G, Broda G, Kurjata P, Piotrowski W and Ploski R. Effect of protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 46L gene polymorphism on LDL cholesterol concentration in a Polish adult population. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 259-262.
- Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL and Cohen JC *et al.* A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol, *Am J Hum Genet* 2006; 78: 410–422.
- Kotze MJ, De Villiers WJS, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, et al. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1460–1468.
- Lagace TA, Curtis DE, Garuti R et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 2995–3005.
- Lahlali-Kacemi N, Bamou Y, Guedira A, Hassani M, Visvikis S, Siest G, Alami N, Kabbaj O, Lahrichi M. Polymorphisme de l'apolipoprotéine E dans une population marocaine : fréquence allélique et relation avec les paramètres lipidiques plasmatiques. *Annales de Biologie Clinique* 2002; 60 (1): 73-78.
- Lambert Gilles, *PCSK9: un nouveau gène impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale. Médecine Sciences* 2004; 20:1068-1070.
- Lambert M, Assouline L, Feoli-Fonseca JC, et al. Determinants of lipid level variability in French-Canadian children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* .2001; 21: 979-984.
- Lars. B. Nielsen, Meghan Sullivan, Teresa Vanni-Reyes, Ira J. Goldberg and Stephen G. Young. The DNA Sequences Required for Apolipoprotein B Expression in the Heart are Distinct from those Required for Expression in the Intestine. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31(4):695-703.
- Law A, Scott J. A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor. *J Lipid Res* 1990: 31 (6): 1109–1120.

- Law MR, Wald NJ & Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 326: 1423–1427.
- Lerham MA, Schneider WJ, Brown MS et al. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1987; 262: 401–410.
- Lehzen G. and Knauss K., Uber Xanthoma multiplex planum, tuberosum, mollusciforme. *Arch Pathol Anat Physiol* 1889; 116: 85-86.
- Leigh SE, Whittall RA, Hubbart CS and Humphries SE. Update and analysis of University College London low density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet* 2008; 72: 485–498.
- Leitersdorf E, Van der Westhuyzen DR, Coetzee GA and Hobbs HH. Two common low-density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest* 1989; 84: 954–961.
- Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J and Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest* 1990; 85: 1014–1023.
- Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004; 65: 419–422.
- Leren TP and Berge KE Identification of mutations in the apolipoprotein B-100 gene and in the PCSK9 gene as the cause of hypocholesterolemia. *Clinica Chimica Acta* 2008; 397(1-2): 92-95.
- Leren TP, Tora HF, Turid EM, Leiv O, Knut EB. Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia in General Practice Using Clinical Diagnostic Criteria or Genetic Testing as Part of Cascade Genetic Screening. *Community Genet* 2008; 11: 26–35.
- Liberopoulos E, Miltiadous G, Hatzivassiliou M, Ayrton N, Bairaktari E, Cariolou M, and Elisaf M. Apolipoprotein E Polymorphism in Northwestern Greece: Frequency and Effect on Lipid Parameters. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2004; 34 (3): 347-354.

- Lombardi P, Sijbrands EJ, van de Giessen K, Smelt AH, Kastelein JJ, Frants RR, et al. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. *J Lipid Res* 1995; 36:860–867.
- Mabuchi H, Koizumi J, Shimuzu M, Takeda R, Hokuriku FH, CHD Study Group. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1989;79:225–232.
- Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., 1989.
- Marks D, Thorogood M, Neil HA et al. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003; 168: 1–14.
- Maxam AM, Gilbert WA. New method for sequencing DNA.. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1977; 74; 560–564.
- Maxwell KN and Breslow JL, Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 7100–7105.
- Maxwell KN and Breslow JL. Proprotein convertase subtilisin kexin 9 : the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 167-172.
- Mediene-Benchekor S, Meroufel D, Brousseau T, Amouyel P, Benhamamouch S. Impact du polymorphisme apoe/hhai sur les lipides plasmatiques et liinfarctus du myocarde dans un échantillon de la population oranaise. *JAM* 2004; 4: 173-176.
- Mehta KD, Chen WJ, Goldstein JL & Brown MS. The low density lipoprotein receptor in *Xenopus laevis*. 1. Five domains that resemble the human receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:10406–10414.
- Melissa A. Austin, Carolyn M. Hutter, Ron L. Zimmern, and Steve E. Humphries. Genetic Causes of Monogenic Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A HuGE Prevalence Review. *Am J Epidemiol* 2004;160:407–420

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215..

Moral P, Valveny N, López-Alomar A, Calo C, Kandil M, Harich N et al. Variation at functional genes and the history of human populations--data on candidate genes for cardiovascular risk in the Mediterranean. *Coll Antropol.Molecular* 2003; 27(2):523-536.

Mozas P, Castillo S, Reyes G, et al: Spanish group FH. Apolipoprotein E genotype is not associated with cardiovascular disease in heterozygous subjects with familial hypercholesterolemia. *Am Heart J* 2003; 145(6): 999-1005.

Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, Kuller L, Duck-Joo L, Sherwin R, Shih J, Stamler J, Wentworth D. Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1490–1500.

Nissen H, Hansen PS, Faergeman O et al. Mutation screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41: 419–423.

Nora JJ, Lortscher RM, Spangler RD et al. Familial hypercholesterolemia with “normal” cholesterol in obligate heterozygotes. *Am J Med Genet* 1985; 22: 585–591.

Olaisen B, Teisberg P And Gedde-dahl T The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. *Human Genetics jr* 1982; 62.

Olofsson SO, Stillemark BP & Asp L. Intracellular assembly of VLDL. Two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 338–345.

Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomaldominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1448-1453.

Packard CJ and Shepherd J. Physiology of the lipoprotein transport system : an overview of lipoprotein metabolism. London : *Arnold, Hodder Headline Group* 1999; 17-30.

Pimstone SN, Sun XM, du Souich C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK: Phenotypic variation in hetrozygous familial hypercholesterolemia. A comparison of Chinese patients

with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 309– 315.

Pisciotta L, Oliva CP, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A and Fresa R *et al.* Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006; 186: 433–440

Pitas RE, Innerarity T.L and Mahley RW. Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *J Biol.Chem* 1980; 255: 5454-5460.

Polisecki E, Peter I, Robertson M, McMahon AD, Ford I and Packard C *et al.* Genetic variation at the PCSK9 locus moderately lowers low-density lipoprotein cholesterol levels, but does not significantly lower vascular disease risk in an elderly population, *Atherosclerosis* 2008; 200: 95-101.

Pownall H and Gotto AM. Jr. Structure and dynamics of human plasma lipoproteins. New York : Oxford University Press Inc. 1999; 3-15.

Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE *et al.* Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995 ; 95: 1225–1234.

Punzalan Felix ER, Sy Rody R, Santos Ronald S, Cutiongco EM, Goseiengflao S, Fadrigulian E, George P *et Andrew L.* Low density lipoprotein-receptor (LDL-R) gene mutations among Filipinos with Familial hypercholesterolemia. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2005; 12 (5): 276-283.

Rabes JP, Varret M, Devillers M *et al.* R3531C mutation in the apolipoprotein B gene is not sufficient to cause hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: E76–E82.

Rall SJ, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apoprotein E heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256 : 9077-9083.

Rashid S, Curtis DE, Garuti R *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 5374– 5379.

Real JT, Chaves FJ, Ascaso JF, Carmena R. Importance of HDL cholesterol levels and total to HDL cholesterol ratio as risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 2001; 22: 465–71.

Real JT, Ascaso JF, Chaves FJ, et al: Influence of plasma lipids, APOE genotype and type of LDL receptor gene mutations on myocardial infarction in subjects with familial hypercholesterolemia. *Med Clin* 2002; 118: 681-685.

Real JT, Chaves FJ, Ejarque I, Garcia-Garcia AB, Valldecabres C, Ascaso JF, Armengod M E and Carmena R. Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population. *European Journal of Human Genetics* 2003; 11, 959–965.

Redgrave TG, Chylomicrons. London : *Arnold, Hodder Headline Group* 1999; 31-54.

Rosenson RS. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2007; 99 (Suppl.): 96B–104B.

Rozen S et Skaletsky HJ. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz S.; Misener S., eds. Humana Press 2000; 365-386.

Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J. Biol. Chem* 1989; 264: 21682–21688.

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Nakandakare ER, Forti N, Diament J, Giannini SD, Bertolami MC, Hirata RD. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. *Hum Muta.* 2002;19(4):462-463.

Sanger F, Nicklen SL, Coulson AR. DANN sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302(2):93-109.

Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001; 42: 1346–1367.

Seidah NG, Benjanne S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB and Stifani S *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 928–933.

Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007;85(7):685-96.

Seidah NG. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. Expert opinion on therapeutic targets. 2009; 13(1):19-28.

Sharkey DJ, Scalice ER, Christy Jr. KG, Atwood SM and Daiss JL. "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology* 1994; 12; 506–509.

Sheehan D, Bennett T, Cashman K. Apolipoprotein E gene polymorphisms and serum cholesterol in healthy Irish adults: a proposed genetic marker for coronary artery disease risk. *Ir J Med Sci* 2000 ; 169: 50-54.

Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, et al. Apolipoprotein E : an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41: 1068-1086.

Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 35-42.

Slimane MN, Pousse H, Maatoug F, Hammami M and Ben Farhat MH. Phenotypic expression of familial hypercholesterolaemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis* 1993; 104: 153-158.

Smit M, Van Der Kooij-Meijis E, Frants RR., Havekes L and Klasen EC. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. *Human Genetics* 1988; 78.

Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in LDL receptor gene. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 2306-2310.

- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR et al. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86 (2): 587–591.
- Soufi M, Sattler AM, Maerz W et al. A new but frequent mutation of apoB-100 apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis* 2004; 174: 11–16.
- Soutar AK. Low-density lipoprotein receptors, Arnold, Hodder Headline Group, London (1999) p. 303–322.
- Soutar AK and Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature* 2007; 4: 214–225.
- Souverein OW, Defesche JC, Zwinderman AH., Kastelein JP, and Tanck Michael W.T.. Influence of LDL-receptor mutation type on age at first cardiovascular event in patients with familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal* 2007; 28: 299–304
- Sparrow CP, Parthasarathy S and Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol.Chem* 1989; 264: 2599-2604.
- Sposito AC and Chapman MJ. Statin therapy in acute coronary syndromes: mechanistic insight into clinical benefit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Oct 1; 22(10):1524-1534.
- Staden R. "A strategy of DNA sequencing employing computer programs." *Nucleic Acids Res* 1979; 6; 2601-2610
- Stadtman. TC, *Methods in Enzymology*. Vol III, Colowick, SP, and Caplan, NO, (Eds.), Academy Press, New York, NY, 1957, PP 392-394, 678-681.
- Steinberg D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretative history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res* 2006; 47: 1339–1351.
- Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, Alkan C, Malig M, Tsalenko A, Sampas N, Bruhn L, Shendure J; 1000 Genomes Project, Eichler EE. Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 2010; 330 (6004): 641-646.

Sun XM, Neuwirth C, Patel DD, Knight BL, Soutar AK, with the familial hypercholesterolemia regression study group: Influence of genotype at the low density lipoprotein receptor gene locus of the clinical phenotype and response to lipid lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998; 136: 175– 185.

Sun XM, Eden ER, Tosi I et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1161–1169.

Tall AR, Costet P and Wang N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* 2002; 110: 899-904.

Tatishcheva IuA, Mandel'shtam MIu, Golubkov VI, Lipovetskiï BM, Gaïtskhoki VS. Four new mutations and polymorphic variants of the low density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia in Saint Petersburg. *Genetika* 2001; 37(9):1290-1295.

Temel RE, Tang W, Ma Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J Clin Invest* 2007;117 (7):1968-1978.

They-They TP, Hamzi K, Moutawafik MT, Bellayou H, El Messal M, Nadifi S. Prevalence of angiotensin-converting enzyme, methylenetetrahydrofolate reductase, Factor V Leiden, prothrombin and apolipoprotein E gene polymorphisms in Morocco. *Ann Hum Biol* 2010; 37(6):767-777.

Timms KM, Wagner S, Samuels ME et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* 2004; 114: 349–353.

Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, et al. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994 ; 54 : 643-649.

University College London Low Density Lipoprotein Familial Hypercholesterolemia Database [<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>] *webcite* Accessed 15 January 2011)

Valveny N, Esteban E, Kandil M, Moral P. Apo E polymorphism in Spanish and Moroccan populations. *Clin Genet* 1997; 51: 354-356.

Varret M, Rabès JP, Boileau C. L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après. Défauts du récepteur des LDL. *médecine/sciences* 1997; 13: 1399-1408.

- Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1378–1387.
- Varret M, Abifadel M, Rabes JP, Boileau C. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2008; 73: 1–13.
- Vasilios GA. Familial Hypercholesterolaemia in Greece. *Hellenic J Cardiol* 2004; 45: 305–307.
- Vergopoulos A, Bajari T, Jouma M, Knoblauch H, Aydin A, Bahring S et al. A xanthomatosis-susceptibility gene may exist in a Syrian family with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 315–323.
- Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, et al. The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat* 2002; 20: 81–87.
- Vuorio AF, Turtola H, Piilhti KM, et al. Familial hypercholesterolemia in the Finnish north Karelia: a molecular, clinical, and genealogical study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3127-3138.
- Wang J, Huff E, Janecka L, Hegele RA. Low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in Canadian subjects with familial hypercholesterolemia, but not of French descent. *Hum Mutat*. 2001; 18(4):359.
- Weiss N, Binder G, Keller C. Heterozygosity for the missense mutation Ala370–Thr in exon 8 of the low density lipoprotein receptor gene does not cause hypercholesterolemia. *Eur J Med Res* 1998; 3: 20–24. 16.
- Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993; 72: 171–176.
- Wilson C, Wardell MR., Weisgraber KH., Mahley RW and Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptorbinding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; 252: 1817–1822.

Wilson PF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994 ; 272 : 1666-1671.

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Scheider WJ, Casey ML and Goldstein JL. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA, *Cell* 1984; 39; 27–38.

Zakharova FM, Golubkov, Mandel'shtam MIu, Lipovetskiï BM, Gaïtskhoki VS. Identification of novel missense mutation G571E, novel silent mutation H229H, nonsense mutation C74X, and four single nucleotide polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia from St. Petersburg. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 2001, vol. 27, no. 5, pp. 349–351.

Zakharova FM, Damgaard D, Mandelshtam MY, Golubkov VI, Nissen PH, Nilsen GG, Stenderup A, Lipovetsky BM, Konstantinov VO, Denisenko AD, Vasilyev VB, Faergeman O. Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med Genet* 2005.

Zakharova FM, Tatishcheva Yu. A, Golubkov VI, Lipovetsky BM, Konstantino VO, Denisenko AD, Faergeman O, Vasilyev VB, and Mandelshtam MY. Familial Hypercholesterolemia in St. Petersburg: Diversity of Mutations Argues against a Strong Founder Effect. *Russian Journal of Genetics*. 2007 ; 43(9) : 1046–1052.

Annexes

QUESTIONNAIRE DU DIAGNOSTIC			
IDENTIFICATION			
Nom :.....		Date et lieu de naissance:...../...../.....à.....	
Prénom :.....		Adresse:.....	
		Tel:.....	
Taille.....m			
Poids.....kg			
BMI.....kg/m ²			
HISTOIRE PERSONNELLE			
Insuffisance coronaire prématurée		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non (2points)
		Age:.....	
Artériopathie oblitérante des membres inférieurs ou cérébrale prématurée		<input type="checkbox"/> OUI	(1point)
		<input type="checkbox"/> Non	
HISTOIRE FAMILIALE			
Parent du 1er degré avec insuffisance coronaire prématurée ou cardiovasculaire prématurée (H<55ans ; F<65ans)			
Parent du 1er degré avec des xanthomes et/ou un arc cornéen		(2points)	
Parent du 1er degré avec un taux de LDL cholestérol > 2,00g/l		(2points)	
Enfant avec un taux de LDL cholestérol >1,60g/l		(2points)	
Parent du 1er degré avec un taux de cholestérol total > 3,0g/l		(2points)	
AUTRES FACTEURS DE RISQUE			
Diabète <input type="checkbox"/>		hypertension <input type="checkbox"/>	Tabac <input type="checkbox"/>
EXAMEN CLINIQUE			
Xanthomes tendineux ou cutanés		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non (6point)
Arc cornéen (<40 ans)		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non (4point)
Traitement hypolipémiant		<input type="checkbox"/> Non	
		<input type="checkbox"/> OUI	Depuis
			Nom du médicament:.....
			Posologie:.....
Pour femmes :			
Ménopausée		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non
Hystérectomie		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non
Traitement hormonal substitutif		<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> Non
DONNEES BIOLOGIQUES			
CT:	C-LDL : >3,30g/l	(8points)	C-HDL :
	2,50 – 3,30g/l	(5points)	TG :
	2,00 – 2,49g/l	(3points)	
	1,55 – 1,99g/l	(1point)	
Date du bilan :...../...../.....			
DIAGNOSTIC (Total des points)			
Certain > 8 points		<input type="checkbox"/>	
Probable 6- 8 points		<input type="checkbox"/>	
Possible 3 – 5 point		<input type="checkbox"/>	

Annexe 2**Feuille d'information de patient à l'étude génétique**

L'étude pour laquelle nous sollicitons votre participation est une étude publique basée sur les caractéristiques cliniques, biochimiques, anthropométriques, etc. et des variations génétiques de votre ADN. Ces études seront toujours orientées pour améliorer la connaissance sur les bases génétiques des maladies humaines (principalement multifactorielles), améliorer avec cette connaissance la santé et prévenir le risque de ces maladies dans la population.

L'ADN est un élément qui est présent dans toutes vos cellules et qui a été hérité des ascendants. Cette molécule a l'information qui détermine les caractéristiques de chaque personne. Les différences dans l'ADN et entre quelques personnes et les autres peuvent nous aider à expliquer pourquoi certaines personnes développent certaines maladies et les autres non, ou pourquoi certaines personnes répondent à un traitement donné (par exemple, un régime ou un médicament, pour descendre le cholestérol sanguin) avec une grande efficacité et les autres ont une réponse minimale.

Par conséquent, l'étude de l'ADN de la population résulte d'un grand intérêt pour connaître quelques gènes impliqués dans le développement d'une maladie, la réponse au traitement, etc. Pour cela, votre consentement est demandé pour que nous puissions utiliser votre sang dans différentes études génétiques par l'analyse de variantes de votre ADN en relation avec différentes maladies de notre population.

Pour pouvoir utiliser votre échantillon d'ADN et autres données biochimiques, anthropométriques, cliniques et personnels:

Vous devez confirmer votre consentement informé par écrit, en indiquant que vous acceptez de faire part de l'étude génétique et en signant ce document, avant l'obtention de l'ADN.

Si vous changez d'opinion après avoir donné le sang pour l'étude génétique vous pouvez demander d'annuler votre échantillon de sang et votre ADN.

Quand la population s'est analysée par des études génétiques, les résultats qui sont obtenus ne seront pas communiqués à vous et à votre médecin et on vous garantit la confidentialité absolue des données génétiques obtenues de l'étude.

Les résultats de l'étude pourront être communiqués aux réunions scientifiques, des Congrès Médicaux ou des publications scientifiques, en assurant une confidentialité stricte sur l'identité des patients.

Si Vous avez besoin d'une plus grande information sur cette étude on peut contacter le Directeur du Groupe d'Investigation, le Pr.

_____ de
_____ -

Consentement par écrit pour l'étude génétique

Titre de l'étude : Hypercholestérolémie familiale : aspect clinique, biologique et génétique.

Enquêteur responsable de l'étude :

1. Je... ..
... .., avec DNI n°déclare sous ma responsabilité
que j'ai lu la feuille d'Information sur les études qui veulent être réalisées par mes échantillons
et données.

2. On m'a remis une copie de la feuille d'Information au patient. On m'a expliqué les
caractéristiques et le but des études génétiques à réaliser et les gains possibles et les risques
que je peux attendre.

3. Je sais que mon identité se maintiendra en secret et que mon sang et mes échantillons
d'ADN seront identifiés avec un même numéro unique.

4. Je suis libre de me retirer de l'étude génétique dans n'importe quel moment de l'étude par
n'importe quelle raison et sans qu'il n'ait pas d'effet sur mon traitement médical futur.

5. Je ne m'entends pas que l'on remet à moi et à mon médecin des résultats.

Je DONNE / JE NE DONNE PAS mon consentement volontairement pour que l'on
puisse réaliser avec mon ADN les études génétiques et mes données cliniques, biochimiques et
anthropométriques qui peuvent aider aux améliorations de la santé de la population.

Date

Signature du participant

Date

Signature du chercheur