



Dysrégulations de la production et de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides

Oriane Marmontel

► To cite this version:

Oriane Marmontel. Dysrégulations de la production et de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides. Santé. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1220 . tel-02006172

HAL Id: tel-02006172

<https://theses.hal.science/tel-02006172>

Submitted on 4 Feb 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1220

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1
Ecole Doctorale N°205
EDISS - ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-
SANTE

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Biologie, médecine et santé

Soutenue publiquement le 06/11/2018, par :

Oriane Marmontel

**Dysrégulations de la production et de la clairance
des lipoprotéines riches en triglycérides**

-

**Apports des nouvelles stratégies de séquençage au diagnostic des
dyslipidémies monogéniques**

Devant le jury composé de :

BONNEFONT-ROUSSELOT, Dominique, PU-PH, Université Paris Descartes, Rapporteure
BRUCKERT, Eric, PU-PH, Université de la Sorbonne Paris, Examineur
DI FILIPPO, Mathilde, PH, Hospices Civils de Lyon, Examinatrice
DUVILLARD, Laurence, PU-PH, Université de Bourgogne, Rapporteure
FERRARO-PEYRET, Carole, MCU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Présidente du jury, Examinatrice
MOULIN, Philippe, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Au Professeur Philippe Moulin,

Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail et d'avoir permis sa réalisation. Je vous suis reconnaissante de m'avoir accordé votre temps et de m'avoir transmis votre intérêt pour la recherche en lipidologie ainsi que votre rigueur scientifique. Au-delà de ce travail, je vous remercie sincèrement pour votre bienveillance et pour la qualité extraordinaire des relations clinico-biologiques que nos services entretiennent.

Au Docteur Mathilde Di Filippo,

Je te remercie pour TOUT, tout simplement. Merci de m'avoir accompagné dans ce travail, de m'avoir guidé contre vents et marées dans l'aboutissement de cette thèse. Merci d'être une source infinie de connaissance. Merci de la confiance que tu m'accordes au quotidien. Merci de partager les valeurs fondamentales du travail d'équipe et de la qualité du travail. Merci de partager ma névrose du cueilleur de champignons, nous poussant toujours plus loin.

Aux rapporteurs, les Professeures Dominique Bonnefond-Rousselot et Laurence Duvillard

Je vous remercie d'avoir pris le temps de juger ce travail en tant que rapporteuses et ainsi de leur apporter votre avis d'expert en lipidologie. Soyez assurées de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aux membres du jury, le Professeur Eric Bruckert et le Docteur Carole Ferraro-Peyret

Je vous remercie pour l'intérêt porté à ce travail et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Veuillez croire à ma plus grande estime.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et ont donc été indispensables à la réalisation de ce travail à leur façon, fruit d'une collaboration multidisciplinaire :

- Merci aux Docteurs Sybil Charrière, Christophe Marçais, Cyrielle Caussy et Marine Dancer, pour leur implication dans l'étude des dyslipidémies et leurs conseils avisés.
- Merci aux médecins prescripteurs sans qui le recrutement des patients serait impossible, en particulier les services d'Endocrinologie adulte et gastro-entérologie pédiatrique
- Merci aux plateformes Biogenet et de NGS du groupement hospitalier EST
- Merci aux services de Biostatistiques
- Merci à toute l'équipe des Dyslipidémies
- Merci à tous mes collègues du service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est pour leur soutien

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans l'unité INSERM 1060 CarMeN (Cardiovasculaire Métabolisme Diabétologie Nutrition) dirigée par le Dr Hubert Vidal au sein de l'Equipe Ingénierie et Fonction des Lipides & lipoprotéines (INFOLIP) animée par le Pr Philippe Moulin et Marie-Caroline Michalski et dans l'U.F. Dyslipidémies, Laboratoire de Biologie Médicale MultiSites du CHU de Lyon, Groupe Hospitalier Est, Centre de Biologie, dirigée le Dr Mathilde Di Filippo. Je tiens donc à remercier ces structures pour leur accueil et d'avoir permis la réalisation de cette thèse.

RESUME

DYSREGULATIONS DE LA PRODUCTION ET DE LA CLAIRANCE DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES - APPORTS DES NOUVELLES STRATEGIES DE SEQUENÇAGE AU DIAGNOSTIC DES DYSLIPIDEMIES MONOGENIQUES

L'hypertriglycémie (HTG) correspond à une accumulation des lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) dans la circulation plasmatique, conséquence d'une augmentation de leur synthèse ou plus classiquement décrite, d'une diminution de leur catabolisme. Dans près de 50% des cas, aucune cause génétique n'est identifiée chez les patients présentant une HTG sévère, aussi bien dans le cadre du syndrome de chylomicronémie familiale (FCS) que dans celui du syndrome de chylomicronémie multifactorielle (MCS). Pour améliorer nos connaissances et la caractérisation de ces patients, la conduction de corrélations phénotype-génotype précises grâce à une collaboration clinico-biologique étroite, ainsi que le développement d'outils de diagnostic moléculaire performants, demeurent des enjeux majeurs. Premièrement, l'évaluation de la concentration pré-héparinique en LPL et l'activité post-héparinique 60 minutes après l'injection d'héparine chez 62 patients MCS caractérisés génétiquement a permis la mise en évidence de deux sous-groupes chez ces patients. Deuxièmement, le développement d'une stratégie de séquençage de nouvelle génération permettant d'explorer simultanément les 9 gènes les plus prévalents dans les hypercholestérolémies, les hypocholestérolémies et les HTG, a permis de détecter les variants nucléotidiques avec une sensibilité équivalente au séquençage Sanger mais aussi de détecter des grands réarrangements. L'ensemble des résultats souligne la complexité des mécanismes de régulation du métabolisme des LRTG et l'intérêt de l'étude des interactions gène-gène. Ainsi, ces travaux ont permis de mettre en évidence de nouvelles hypothèses à explorer pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques des HTG sévères et d'améliorer les outils disponibles pour les études de corrélation génotype-phénotype.

Mots clés : Lipoprotéine lipase, hypertriglycémie, chylomicrons, lipolyse, séquençage de nouvelle génération, dyslipidémie, diagnostic moléculaire, grand réarrangement.

SUMMARY

DYSREGULATIONS OF PRODUCTION AND CLEARANCE OF TRIGLYCERIDE-RICH LIPOPROTEINS - CONTRIBUTION OF NEW SEQUENCING STRATEGIES TO THE DIAGNOSIS OF MONOGENIC DYSLIPIDEMIA

Hypertriglyceridemia (HTG) correspond to an increase of triglyceride-rich lipoproteins (TGRL) circulating concentration, as a consequence of an increase in the synthesis or a decrease in their catabolism, most classically described. In nearly 50% of patients with severe hypertriglyceridemia (HTG), no genetic cause is identified, either in familial chylomicronemia syndrome (FCS) or in multifactorial chylomicronemia syndrome (MCS). To gain new insights and to improve patient's characterization, it remains important to conduct accurate phenotype-genotype association studies through close collaboration with referent lipidologists, and to develop high-performance tools for molecular diagnosis. Firstly, the assessment of pre-heparin LPL concentration, as well as LPL activity 60 minutes after heparin injection, enabled the identification of two subgroups within 62 genotyped MCS patients. Secondly, the development of a new sequencing generation workflow exploring simultaneously the 9 most prevalent genes in dyslipidemia, allowed the detection of single nucleotide variations with sensitivity equivalent to Sanger sequencing, but also allowed the detection of copy number variations. Collective consideration of the results underlines the complexity of the regulation mechanisms of TGRL metabolism and the interest of gene-gene interactions study. Thus, the studies presented herein bring new hypothesis to explore for understanding the pathophysiological mechanisms of severe HTG and to improve molecular diagnosis tools available for phenotype-genotype association studies.

Key words: Lipoprotein lipase, hypertriglyceridemia, chylomicrons, lipolysis, next-generation sequencing, dyslipidemia, molecular diagnosis, copy number variation.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RESUME.....	5
SUMMARY	6
SOMMAIRE.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
INDEX DES TABLEAUX.....	11
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET ENJEUX DU TRAVAIL	14
1. METABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES	15
1.1. Synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides.....	15
1.1.1. Synthèse intestinale des chylomicrons : la voie exogène	15
1.1.1.1. Absorption, synthèse et sécrétions des composants des chylomicrons dans les entérocytes	15
1.1.1.2. Assemblage des chylomicrons	16
1.1.2. Production hépatique des VLDL : la voie endogène.....	16
1.1.2.1. Synthèse hépatique des triglycérides	17
1.1.2.2. Assemblage des VLDL.....	17
1.2. Catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides	18
1.2.1. La lipoprotéine lipase (LPL)	18
1.2.1.1. Structure de la LPL	19
1.2.1.2. Régulation de la LPL	21
1.2.1.3. Variants délétères et polymorphismes du gène <i>LPL</i>	21
1.2.2. Cofacteurs régulateurs de la LPL	22
1.2.2.1. Lipase maturation factor 1 (LMF1)	22
1.2.2.2. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding 1 (GPIHBP1)	24
1.2.2.3. Apolipoprotéine A-V (ApoA-V).....	25
1.2.2.4. Apolipoprotéine C-I (ApoC-I).....	27
1.2.2.5. Apolipoprotéine C-II (ApoC-II).....	28
1.2.2.6. Apolipoprotéine C-III (ApoC-III).....	29
1.2.2.7. Apolipoprotéine E (ApoE).....	30
1.2.2.8. Protéines angiopoietine like (ANGPTL)	32
1.2.2.8.1. ANGPTL3 et ANGPTL4	32
1.2.2.8.2. ANGPTL8	35

1.2.2.9.	Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREB-H)	35
1.2.3.	Lipolyse intravasculaire des LRTG	36
1.2.3.1.	Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière capillaire	36
1.2.3.2.	Margination et hydrolyse des LRTG	37
1.2.3.3.	Conséquence de la lipolyse sur la structure et devenir des LRTG hydrolysés	38
1.2.3.3.1.	Capture hépatique des remnants de LRTG	39
1.2.3.3.2.	Conversion des IDL en LDL	42
1.2.3.4.	Affinité relative de La LPL pour les chylomicrons et les VLDL	42
2.	DYSLIPIDEMIES MONOGENIQUES DES LIPOPROTEINES CONTENANT DE L'APOB	43
2.1.	Hypertriglycémie sévère	43
2.1.1.	Syndrome de chylomicronémie familiale	45
2.1.2.	Syndrome de chylomicronémie multifactoriel	45
2.1.3.	Exploration génétique des hypertriglycémies sévères	46
2.1.4.	Exploration phénotypique des hypertriglycémies sévères	48
2.1.4.1.	Concentration et activité LPL	48
2.1.4.2.	Détection d'auto-anticorps	50
2.1.4.3.	Dosages des protéines régulatrices	51
2.2.	Hypercholestérolémie	51
2.3.	Hypobetalipoprotéinémie	53
3.	OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE POUR LES EXPLORATIONS DES DYSLIPIDEMIES	55
3.1.1.	Séquençage direct	55
3.1.2.	Recherche de grands réarrangements et de variations du nombre de copies (CNV)	56
3.1.3.	Le séquençage haut débit	56
3.1.3.1.	Protocole général du séquençage haut-débit	57
3.1.3.2.	Les principales technologies de séquençage haut-débit ou NGS (Next Generation Sequencing)	58
3.1.3.2.1.	La technologie IonTorrent™ de Life technologies	58
3.1.3.2.2.	La technologie Illumina®	59
3.1.3.3.	Traitement des données : outils bio-informatiques	62
3.1.3.4.	Avantages et inconvénients des stratégies de séquençage haut débit	63
4.	ENJEUX DU TRAVAIL	64
DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DES TRAVAUX		66
1.	ARTICLE 1	67
2.	ARTICLE 2	85
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION		124
ANNEXES		147
BIBLIOGRAPHIE		156

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGPAT : Acylglycerol-3-phosphate acyltrasférase
ANGPTL : Angiopoïétine like
Apo : Apolipoprotéine
Apobec-1 : ApoB editing complex catalytic subunit 1
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASO : Oligonucléotides antisens
CETP : Cholesteryl Ester Transfert Protein
CNV : Copy number variation
CM : Chylomicrons
CREB-H : Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H
CT : Cholestérol total
DAG : Diacyglycérol
DAGT : Diacyglycérol transférase
ddNTP : Didésoxynucléotides
dNTP : Désoxynucléotides
FABP : Fatty Acids Binding Protein
FCS : Familial chylomicronemia syndrome
GCKR : Glucojinase regulator
GPAT : Glycerol-3-phosphate acyltransférase
GPIHBP1 : Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1 protein
GWAS : Genome Wide Association Study
HDL : High Density Lipoprotein
HDL-c : Cholestérol des HDL
HSPG : Héparane sulfate protéoglycanes
HTG : Hypertriglycémie
IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire
KO : knock-out

LDL : Low density lipoprotein
LDL-c : LDL cholestérol
LDLR : Récepteur de LDL
LPL : Lipoprotéine Lipase
LMF1 : Lipoprotein Maturation Factor 1
LRP : Low density lipoprotein receptor-related protein
LRTG : Lipoprotéines riches en triglycérides
miR : MicroARN
MTP : Microsomal Triglyceride Transfert Protein
MCS : Multifactorial chylomicronemia syndrome
NGS : Next generation sequencing
PCR : polymerase chain reaction
PCTV : Prechylomicrons transport vesicle
PLTP : Protéine plasmatique de transfert des phospholipides
rs : référence SNP
Sar1b : Ras-related GTPase 1B
SR-BI : Scavenger receptor B-I
SNP : Single nucleotide polymorphism
TG : Triglycéride
UTR : Région non traduite (untranslated region)
VAMP7 : Vesicle-associated membrane protein 7
VLDL : Very low density lipoprotein
WT : Wild type

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison des syndromes hyperchylomicronémies familiale et multifactorielle...	44
Tableau 2. Gènes responsables de syndrome de chylomicronémie familial.....	47
Tableau 3. Comparaison des deux principales technologies de séquençage de 2 ^{ème} génération. .	61

Introduction

L'hypertriglycéridémie (HTG) est un état clinique fréquent, qui se définit comme une élévation de la concentration en triglycérides (TG) plasmatiques à jeun au-delà du 95^{ème} percentile en fonction de l'âge et du sexe, soit environ 3,37 mmol/L (1). Cette dyslipidémie est hétérogène avec une forte interaction gène-environnement, une athérogénicité élevée et un risque élevé de pancréatite. Les mécanismes sous-jacents restent largement méconnus et ce travail constitue une contribution à leur démantèlement.

Les lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) comprennent les chylomicrons (CM) synthétisés par l'entérocyte, et les VLDL (very low density lipoprotein), synthétisées par l'hépatocyte pour le transport endogène du cholestérol et la sécrétion des TG produits par le foie (2). Une augmentation de la synthèse des LRTG ou une diminution de leur catabolisme entraînent une augmentation de leur concentration circulante (3,4).

Les HTG sévères (> 10 mmol/L) peuvent correspondre à deux formes différentes : une forme familiale monogénique extrêmement rare (Familial chylomicronemia syndrom, FCS, OMIM #238600) et une forme oligogénique multifactorielle moins rare (Multifactorial chylomicronemia syndrom, MCS, OMIM #144650) (5,6). Dans environ 30 % des cas des FCS et plus fréquemment lors des MCS, aucun variant rare ou fréquent n'est mis en évidence sur les gènes candidats (7), suggérant qu'il reste encore des mécanismes physio-pathologiques non identifiés dans le développement des HTG sévères. De plus, une étude GWAS a montré que les variants géniques sur les loci identifiés n'expliquaient qu'environ 10 % des variations de concentrations plasmatiques en TG dans la population (8). Par ailleurs, à l'heure actuelle, le principal mécanisme physiopathologique mis en évidence chez des patients présentant une HTG sévère primitive est une altération de la lipolyse. Une augmentation de la production des LRTG a été mise en évidence, mais seulement chez des patients atteints de diabète de type 2 et lors d'hyperlipidémie combinée familiale (9). Enfin, l'intérêt pour le rôle de la recapture hépatique des remnants dans les HTG sévères est croissant depuis la mise en évidence de l'importance de l'apolipoprotéine (Apo) C-III

dans la régulation de la recapture via les effets spectaculaires de l'utilisation des oligonucléotides antisens (ASO) *APOC3* comme thérapie hypotriglycérémiant (10,11). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu demeurent largement inexplorés. Il est donc nécessaire de poursuivre le développement d'outils génétiques et phénotypiques afin de progresser dans nos connaissances physiopathologiques du métabolisme des LTRG, et de mieux comprendre les interactions gène-environnement et des interactions gènes-gènes impliquées dans le développement des HTG sévères.

La première partie de ce travail sera consacrée à une revue bibliographique composée de trois axes. La synthèse et le catabolisme des LRTG, ainsi que les protéines clés impliquées de ce métabolisme, seront particulièrement détaillés pour introduire le sujet de la première partie du travail expérimental. Les principales dyslipidémies monogéniques seront pour leur part présentées brièvement, afin d'introduire le rationnel de la deuxième partie du travail expérimental. Les méthodes d'exploration des HTG sévères ainsi que les outils de biologie moléculaire disponibles seront également présentés afin d'introduire les méthodologies utilisées. Ensuite, après une présentation des enjeux et du contexte, les travaux expérimentaux seront exposés. La première étude s'intéresse à la détermination de l'activité LPL sur des temps post-héparinique tardifs chez des patients MCS. La deuxième étude décrit la mise au point d'une technique de séquençage haut débit pour les dyslipidémies monogéniques, comprenant les gènes classiquement impliqués dans les HTG sévères, les hypercholestérolémies et les hypocholestérolémies. Enfin, dans une troisième partie, les résultats de ces études seront discutés.

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET ENJEUX DU TRAVAIL

1. METABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES

1.1. Synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides

1.1.1. Synthèse intestinale des chylomicrons : la voie exogène

Les CM sont les plus grosses lipoprotéines retrouvées dans la circulation périphérique (100-500 nm de diamètre). De faible densité ($<0,93\text{g/mL}$), ils sont constitués majoritairement de TG et monoglycerides (85-92%), mais aussi de cholestérol libre et estérifié (1-3%), de phospholipides (6-12%) et de traces d'acides gras non estérifiés. Bien qu'elles représentent moins de 2% de leur composition, les apolipoprotéines, détaillées par la suite, jouent un rôle clé dans le métabolisme des CM en déterminant leur devenir intra et extracellulaire. Les CM ont pour fonction de transporter les lipides apportés par l'alimentation (12).

1.1.1.1. Absorption, synthèse et sécrétions des composants des chylomicrons dans les entérocytes

L'alimentation quotidienne apporte 60 à 150 g/j de lipides, essentiellement sous forme de TG, phospholipides et esters de cholestérol. Les lipides d'origine alimentaire seront d'abord émulsifiés par les sels biliaires dans la lumière intestinale, afin de faciliter leur hydrolyse par différentes lipases. Les acides gras libres ainsi générés peuvent être absorbés par l'entérocyte par diffusion (lorsque leur concentration extracellulaire est supérieure à la concentration intracellulaire) ou par des récepteurs spécifiques tels que SLC27A1 (FATP selon l'ancienne nomenclature) et CD36. Dans l'entérocyte, les acides gras libres sont liés à des protéines de transports spécifiques (Fatty acid-binding proteins, FABPs) et seront adressés vers le réticulum endoplasmique pour permettre l'estérification des monoacylglycérols en diacylglycérols (DAG) par la monoacylglycérol transférase. Ensuite, les DAG pourront être estérifiés à leur tour : 1/ avec un acide gras libre supplémentaire en TG par les diacylglycérol transférases (DGAT) ; 2/ avec la choline et l'éthanolamine en phospholipides par la choline et l'éthanolamine transférases (13-15).

1.1.1.2. Assemblage des chylomicrons

Les mécanismes moléculaires conduisant à la synthèse et à la sécrétion des CM dans les cellules épithéliales intestinales sont complexes et ne sont pas totalement élucidés à ce jour, ainsi ils ne seront pas décrits en détail ici, notre travail étant consacré en premier lieu à la lipolyse intravasculaire de leur TG.

L'ApoB-48 est la principale apolipoprotéine non échangeable des CM. Contrairement au foie, qui sécrète la protéine complète ApoB-100 (4536 acides aminés), l'ApoB produite dans l'intestin, à partir du même gène *APOB*, subit une modification post-transcriptionnelle (« édition ») par Apobec-1. Ceci consiste en l'insertion d'un codon-stop prématuré entraînant la synthèse d'une protéine ApoB tronquée à 48% de l'ApoB-100 (ApoB-48; 2152 acides aminés) (16). Dans le réticulum endoplasmique de l'entérocyte, l'ApoB-48 va être lipidée grâce à la microsomal triglyceride transfer protein (MTP) pour donner naissance aux CM primordiaux puis aux pré-chylomicrons suite à des cycles supplémentaires de lipidation de l'ApoB-48 par la MTP et à l'ajout de l'ApoA-IV (12,17). L'ApoA-IV se situe à la surface des pré-chylomicrons et facilite ensuite leur transport vers le Golgi (18). Ils sont alors transportés vers le Golgi via des vésicules (PCTV, pre-chylomicrons transport vesicle). Une fois le Golgi atteint, ils fusionnent par l'interaction de VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) avec les protéines membranaires du Golgi, et par l'action de Sar1b (Ras-related GTPase 1B) (17). Dans le Golgi, l'ApoB-48 est glycosylée et l'ApoAI est incorporée (13,19). Les CM sont ensuite sécrétés dans la *lamina propria* intestinale par exocytose de la membrane basolatérale des entérocytes et transférés dans le compartiment lymphatique (14,15).

1.1.2. Production hépatique des VLDL : la voie endogène

Les VLDL sont des lipoprotéines de 30-80 nm de diamètre, composées d'une molécule d'ApoB-100 et de multiples copies d'autres apolipoprotéines (ApoE, ApoC). Leur composition en TG et cholestérol est variable, selon leur taille (20).

1.1.2.1. Synthèse hépatique des triglycérides

Pour la synthèse hépatique de TG, les trois sources principales d'acides gras libres sont : 1/ issus des TG alimentaires ; 2/ issus des TG du tissu adipeux ; 3/ issus de la synthèse *de novo* à partir des glucides. Lors de la synthèse hépatocytaire des TG, le glycerol-3-phosphate est issu de la glycolyse. Pour être estérifiés, les acides gras libres doivent être activés sous forme de molécule d'acyl-CoA, puis estérifiés par le glycerol-3-phosphate et la glycerol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). L'acide lysophosphatidique produit est ensuite acylé par une acylglycerol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) et déphosphorylé pour donner un DAG. Une nouvelle acylation par les DGAT aboutira à la formation d'une molécule de TG. Les TG synthétisés localement pourront être stockés dans les gouttelettes lipidiques ou être intégrés dans les VLDL (21,22).

1.1.2.2. Assemblage des VLDL

Malgré les études menées ces dernières décennies, l'assemblage des VLDL est complexe et reste imparfaitement connu. Les données actuelles de la littérature suggèrent un mécanisme en deux étapes, dont les facteurs limitants principaux seraient la disponibilité en TG et en ApoB-100 fonctionnelle (23,24) .

Le processus d'assemblage est initié dans le réticulum endoplasmique, dès que l'ApoB-100 est disponible du côté luminal de l'hépatocyte. La lipidation de l'ApoB par la MTP conduit à la formation d'une petite particule appelée «VLDL primordiale» (25,26). La lipidation se poursuit par la fusion de VLDL primordiale avec une gouttelette lipidique contenant de l'ApoC-III, dépourvue d'ApoB et apportant la majeure partie des lipides pour la formation des VLDL (27). Lorsque la lipidation et le repliement sont corrects, les particules sont transportées, sous forme de VLDL2 via des vésicules spécifiques, vers le Golgi où se poursuivra la maturation (28,29). Dans ce compartiment, l'ApoB subit une glycosylation, une phosphorylation et un changement conformationnel et d'autres protéines comme l'ApoA-I et l'ApoE sont ajoutées aux VLDL (30–32). Les VLDL2 pourront soit être directement sécrétées, soit subir un nouveau cycle de

lipidation pour former des VLDL1 plus riches en TG (33). Les VLDL sont ensuite exportées vers la membrane plasmique via des vésicules spécifiques (32).

1.2. Catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides

1.2.1. La lipoprotéine lipase (LPL)

La lipoprotéine lipase (LPL) appartient à la « superfamille des lipases » qui inclut la lipase hépatique, la lipase pancréatique, la lipase endothéliale et les *Drosophila* yolk protéines 1, 2 et 3 (YP1, YP2 et YP3 respectivement) (35). La LPL est une glycérol-ester-hydrolase (EC 3.1.1.34) composée de 475 acides aminés (55 kDa ; les 27 premiers acides aminés correspondent au peptide signal), et est codée par le gène *LPL* (36). Elle est synthétisée dans de nombreux tissus principalement par les adipocytes et les myocytes, et plus accessoirement par la glande mammaire, les macrophages, les ovaires, les glandes surrénales, certaines cellules neurologiques, l'aorte thoracique, la rate, l'intestin, et les testicules (37,38). La LPL hydrolyse les TG présents dans les CM et les VLDL circulants, en acides gras libres et en di-acylglycérol puis en 2-monoacylglycérol (37). Sa place et son rôle dans la clairance des LRTG seront abordés plus en détail dans le paragraphe 1.2.3. En outre, la LPL assure une fonction non-catalytique de pontage moléculaire, permettant ainsi de lier de façon simultanée les lipoprotéines et des surfaces cellulaires spécifiques telles que les héparane sulfate protéoglycanes (HSPG), le LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), le récepteur des LDL (LDLR), le récepteur des VLDL (VLDLR), le récepteur de l'ApoE de type 2 et gp330 (39,40). Ces interactions peuvent conduire à une accumulation et à une capture cellulaire des lipoprotéines et/ou des vitamines A et E liposolubles sans internalisation des lipoprotéines (4,37,39,41). Cette fonction de pontage a également été décrite à l'échelle cellulaire : la LPL serait capable de former des ponts en se liant aux HSPG exprimés à la fois sur les monocytes et les cellules endothéliales (42). Enfin, plusieurs études ont suggéré que la LPL jouait également un rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et l'activation macrophagique (43-45).

Chez la souris, le modèle knock-out (KO) *lpl*^{-/-} n'est pas viable, mais un modèle de « sauvetage » avec expression transitoire médiée par un vecteur adénoviral pendant les premiers jours de vie a été utilisé pour étudier des souris avec un déficit en LPL. Ces souris présentent à l'âge adulte une HTG extrêmement sévère (concentration en TG plasmatiques multipliée par 220) et une activité LPL résiduelle très faible (environ 5 % de l'activité LPL des souris wild type (WT)) (46).

1.2.1.1. Structure de la LPL

La structure tridimensionnelle de la LPL a été déduite de celle de la lipase pancréatique (47). Elle est organisée en deux régions structurellement distinctes : un domaine N-terminal (résidus 28-339) et un plus petit domaine C-terminal (résidus 340-475), connectés par un peptide flexible (48). Le domaine C-terminal est nécessaire pour la liaison au substrat alors que le domaine N-terminal détermine les propriétés catalytiques de la LPL (37). La forme active de la LPL correspond à un homodimère lié de façon non-covalente avec une orientation tête-bêche. L'activité LPL nécessite l'interaction d'un site catalytique avec une sous-unité et la reconnaissance du substrat sur l'autre sous-unité (49,50). La dissociation des dimères conduit à une inactivation irréversible de l'enzyme (51). Les études de relation structure-activité ont permis l'identification de plusieurs domaines fonctionnels, revus par Wang *et al.* ainsi que Mead *et al.* (37,52).

Domaine catalytique. La fonction catalytique de la LPL humaine est assurée par une triade catalytique composée du site actif (Ser159-Asp183-His268), d'un trou oxyanion (Trp82, Leu160), et d'une structure boucle (résidus 81 à 91)/couvercle (résidus 243 à 266) (47,53). L'activité catalytique est liée à une modification conformationnelle de la structure boucle/couvercle : la forme ouverte étire la boucle de surface et expose le sillon contenant le site actif le rendant plus accessible aux substrats (47,49). L'ouverture du couvercle est induite par la liaison à une lipoprotéine (53).

Domaine de liaison lipidique. La liaison au substrat lipidique est assurée par le domaine C-terminal de la LPL, et plus précisément par un groupe de résidus composé de tryptophanes (Trp417-Trp420-Trp421) et la région 442-465 (54,55). Actuellement,

l'hypothèse la plus répandue reste que la LPL interagit avec les apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines et notamment l'extrémité N-terminale de l'ApoB (56,57). Cependant, Boren *et al.* ont montré que la délipidation des LDL empêchait la liaison LPL-LDL, ainsi l'interaction LPL-LDL se ferait via les lipides des LDL et notamment la phosphatidylcholine (58).

Domaine de liaison à l'héparine/HSPG. Il existe quatre sites principaux de liaison (chargés fortement positivement) aux HSPG (chargés négativement), deux sites principaux (Arg290-Arg306-Lys307-Arg309 et Arg321-Lys323-Arg324-Lys327) et deux sites secondaires (Lys174-Lys175-Arg178 et Lys346-Lys430-Arg432-Lys434-Lys440-Lys441) (47,49). Une étude par mutagenèse dirigée a prouvé que l'héparine peut se lier à ces mêmes groupements, entrant ainsi en compétition avec les HSPG (59). Le site de liaison à l'héparine est situé de manière opposée au site actif, suggérant ainsi l'absence de rôle direct de l'héparine dans l'activité catalytique de la LPL (49). La dissociation des dimères de LPL, et donc son inactivation, est prévenue par la présence d'HSPG et d'héparine (60). La forme dimérique est 6000 fois plus affine pour l'héparine et les HSPG que la forme monomérique, expliquant la plus grande abondance de la forme dimérique à la surface de l'endothélium vasculaire (37).

Domaine de liaison à l'ApoC-II. L'ApoC-II est nécessaire pour une activité LPL maximale *in vitro* et *in vivo* (voir paragraphe 1.2.2.5). Les données de la littérature sont contradictoires sur la localisation des sites de liaisons de la LPL pour l'ApoC-II, suggérant des interactions avec des sites localisés en N-terminal et en C-terminal (49,61).

Domaine de liaison à GPIHBP1. La liaison à GPIHBP1 (cf. 1.2.2.2) implique le domaine de liaison aux HSPG (Lys430, Arg432, Lys434, Lys440, Lys441), mais également la partie C-terminale de la LPL (résidus 443 à 462) qui interagit avec le domaine Ly6 de GPIHBP1 (62-64).

Domaine de liaison aux récepteurs. Des études de délétion ont montré que la liaison de la LPL aux récepteurs cellulaires est indépendante des sites catalytiques et de liaison aux HSPG et requiert les acides aminés 407-411 et 431-468 (37).

1.2.1.2. Régulation de la LPL

Compte tenu de son rôle clé dans le métabolisme des LTRG, l'activité LPL est largement régulée via de multiples mécanismes afin de s'adapter aux besoins tissulaires en acides gras. Ce système de régulation complexe permet des variations rapides de l'activité LPL (de l'ordre de l'heure) de manière tissu-spécifique, permettant une réponse adaptée à l'alimentation/jeûne, l'hypoxie, l'exercice, le froid. Ces adaptations sont la résultante de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles complexes, abordées dans plusieurs revues (60,65–67). Un nouveau niveau de régulation a été décrit récemment, en effet plusieurs études indépendantes, *in vitro* ou chez la souris, ont identifié des microARN (miR) candidats pour la régulation post-transcriptionnelle de la LPL : miR-467b, miR-29, miR-27 et miR-590 (68–71). De façon intéressante, deux études de population ont montré que des sites de fixation de miR pourraient être altérés par certains variants fréquents (>1%) (en particulier rs1059611 et rs13702, isolés ou sous forme d'haplotype) et qu'ils étaient associés à la triglycémie, expliquant ainsi le mécanisme sous-jacent (72,73).

Protéines régulatrices. La régulation post-translationnelle de l'activité LPL est assurée par de nombreuses protéines extracellulaires, dont le rôle sera détaillé dans les paragraphes suivants : ApoC-II, ApoC-III, ApoA-V, ApoE, ANGPTL3, ANGPTL4 (65,66).

1.2.1.3. Variants délétères et polymorphismes du gène *LPL*

Chez l'homme, plus de 220 variants délétères différents du gène *LPL* ont été décrits (74–76). La présence de variants délétères, avec perte de fonction, à l'état homozygote, est responsable du FCS. Les patients hétérozygotes ne présentent généralement pas d'anomalie du bilan lipidique, cependant une HTG mineure à modérée est parfois constatée et peut s'aggraver en HTG sévère, en particulier chez les diabétiques, en cas d'éthylisme ou au cours de la grossesse (77).

Trois variants fréquents (>1%) situés dans les régions codantes ont été décrits associés à la concentration plasmatique en TG. Le variant p.Asp36Asn à l'état

hétérozygote est associé à une augmentation des TG plasmatiques seulement de l'ordre de 20%, bien qu'il soit associé à une diminution de l'activité LPL *in vivo* et *in vitro* de l'ordre de 30% (78,79). Le variant p.Asn318Ser à l'état hétérozygote est associé à une augmentation des TG plasmatiques de l'ordre de 30% et une diminution du même ordre de l'activité et de la concentration en LPL (80,81). La diminution de l'activité LPL serait liée à une diminution des formes dimériques au profit des formes monomériques (82). Le variant p.Ser474X est quant à lui associé à une diminution de la concentration plasmatique en TG et une augmentation du HDL-cholestérol (HDL-c) (79,83). Le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas clairement élucidé à ce jour, cependant, il existe une augmentation de l'activité et de la concentration en LPL chez les porteurs hétérozygotes de ce variant. Deux mécanismes ont été proposés : 1/une réduction de la sensibilité à l'inhibition par l'épinéphrine, cependant ce mécanisme concernerait surtout le tissu adipeux et non pas la lipolyse intravasculaire (84) ; 2/une régulation miR-dépendante, via des variants situés dans la 3'UTR et en déséquilibre de liaison fort avec le variant p.Ser474X (73).

Enfin, une quinzaine de variants situés dans les régions non codantes du gène *LPL* sont associés dans les études GWAS (Genome Wide association study) à une diminution ou une augmentation de la concentration plasmatique en TG (85–89).

1.2.2. Cofacteurs régulateurs de la LPL

1.2.2.1. Lipase maturation factor 1 (LMF1)

LMF1 est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, jouant un rôle essentiel dans la maturation (repliement et assemblage) de trois lipases : la LPL, la lipase hépatique et la lipase endothéliale (91). Le gène correspondant à cette protéine, *LMF1*, a été décrit pour la première fois en 1983, comme impliqué dans le modèle murin de déficit combiné en lipase (« *combined lipase deficiency* », *clld*) (92).

LMF1 est une protéine de 567 acides aminés (65 kDa), constituée de 6 domaines transmembranaires. Près de 70% de la séquence protéique correspond au domaine

DUF1222, très conservé au cours de l'évolution (91). Ce domaine joue un rôle essentiel dans la maturation des lipases puisque tous les variants décrits associés au *cld* entraînent une troncature de ce domaine (93). La boucle C, située du côté luminal du réticulum endoplasmique, joue également un rôle clé en liant spécifiquement les lipases dimériques. La proximité de ces 2 sites suggère une coopération dans le processus de maturation (91). Plus récemment, Sha *et al.* ont montré qu'une autre protéine du réticulum endoplasmique impliquée dans le contrôle qualité des protéines au niveau cellulaire, Sel1L, qui stabiliserait la liaison LPL-LMF1 et jouerait ainsi un rôle dans le repliement et la sécrétion de la LPL (94).

Les souris *cld/cld* développe une HTG sévère due à l'accumulation de CM, dès la période néonatale et les conséquences de cette HTG conduisent à la mort 2 à 3 jours après la naissance (93).

Chez l'homme, une HTG sévère associée à une diminution de l'activité LPL et HL post-héparinique a été observée chez des patients homozygotes pour des mutations non-sens (p.Tyr439*, p.Tyr460* et p.Trp464*) (93,95,96) et plus récemment chez un patient hétérozygote composite pour des variants faux-sens (97). Par ailleurs, le séquençage de *LMF1* dans des cohortes de patients présentant une HTG sévère a mis en évidence l'existence d'une dizaine de variants faux-sens à l'état hétérozygote (98,99). L'affirmation du caractère délétère de ces variants reste délicate. En effet, bien que certains variants soient prédits comme délétères *in silico*, les résultats des études fonctionnelles *in vitro* sont contradictoires : le modèle utilisé par Surendran *et al.* (99) n'a pas mis en évidence d'effet sur l'activité LPL (n= 7 variants testés), alors que le modèle utilisé par notre équipe et publié récemment (100) a montré une diminution de 38 à 79% pour 4 variants (n= 10 variants testés). Ensuite, les porteurs hétérozygotes de variants *LMF1* sont majoritairement normotriglycéridémiqes et présentent une activité LPL post-héparinique normale ou seulement légèrement diminuée (95,96,99). Cependant, cette généralité est à nuancer par les observations cliniques récentes de notre équipe qui rapportent des épisodes d'HTG sévère chez une enfant porteuse hétérozygote d'un variant non-sens dans un contexte infectieux et chez un porteur homozygote d'un variant faux-sens. Ainsi, des variants *LMF1* pourraient jouer un rôle

dans le MCS, en combinaison avec d'autres variants génétiques et/ou d'autres facteurs environnementaux (100).

1.2.2.2. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding 1 (GPIHBP1)

GPIHBP1 est une glycoprotéine de 184 acides aminés (28 kDa ; les 18 premiers acides aminés correspondent au peptide signal), codée à partir du gène *GPIHBP1*. Cette protéine a été découverte par Ioka *et al.* en 2003 comme protéine facilitant la liaison aux HDL sur des cellules en cultures (101). Depuis, nos connaissances et notre compréhension de son rôle dans le métabolisme des LRTG ne cessent de progresser et elle a déjà fait l'objet de plusieurs revues (63,64,102).

GPIHBP1 appartient à la famille des protéines Ly6 et est structurée en plusieurs domaines : un peptide signal, un domaine acide, un motif Ly6 riche en cystéine (lymphocyte antigen), un domaine C-terminal hydrophobe et une ancre GPI (*GPI anchor*). Elle est exprimée exclusivement par les cellules endothéliales capillaires, sur la face luminale des capillaires du tissu adipeux brun, du cœur et des muscles squelettiques (103). GPIHBP1 se lie spécifiquement et avec une grande affinité à la LPL et aux CM grâce à son domaine acide (103,104). Le domaine Ly6 semble également intervenir dans la liaison GPIHBP1-LPL (105). Selon Reimund *et al.*, ces deux domaines interagissent de manière indépendante avec la LPL, et seule la LPL liée au domaine acide interagit avec les LRTG (106). La liaison à GPIHBP1 stabilise la conformation du domaine catalytique de la LPL et assure une protection contre une désactivation par ANGPTL3 et ANGPTL4 (107,108). Cette liaison survient au niveau du sous-endothélium et GPIHBP1 transporte la LPL, sous forme de vésicules, dans la lumière capillaire où elle sert de plateforme à la lipolyse (103,109,110). En l'absence de GPIHBP1, la LPL est piégée dans l'intersitium et n'est pas disponible pour la lipolyse intravasculaire des LRTG (109). Au niveau intravasculaire, le complexe GPIHBP1-LPL ainsi formé est responsable de la margination des LRTG dans les capillaires (111). D'autre part, le domaine acide de GPIHBP1 est également capable de se lier au motif de liaison à l'héparine de l'ApoA-V, mais le mécanisme exact de l'interaction LPL-ApoA-V- GPIHBP1

reste méconnu (104,112). En conclusion, la quasi-totalité de la LPL étant liée à GPIHP1 sur les capillaires, il est désormais nécessaire de définir les effets des ApoA-V, CII, CIII et d'ANGPTL4 sur le complexe LPL-GPIHBP1 et non plus seulement sur la LPL libre afin de mieux comprendre le rôle de la LPL dans la lipolyse intravasculaire (102).

Chez la souris KO *Gpihbp1*^{-/-}, l'accumulation de CM et de VLDL est responsable d'une HTG majeure. La quantité de LPL tissulaire est normale, mais la localisation de la LPL est anormale puisqu'elle se situe majoritairement autour des cellules parenchymateuses et très peu à la surface de l'endothélium vasculaire (103,105,113). Les souris *Gpihbp1*^{+/-} présentent une concentration plasmatique en TG comparable aux souris WT, l'HTG survient après le premier mois de vie (103,113).

Chez l'homme, des variants délétères homozygotes ou hétérozygotes composites ont été décrits chez un nombre restreint de patients présentant une HTG majeure, avec plus d'une vingtaine de variants décrits (74,76,99,114–123). Chez ces patients, il existe une cinétique anormale de relargage de la LPL par l'héparine : le pic d'activité et de concentration, habituellement observé 10 à 15 minutes après l'injection d'héparine, est absent, mais il a été observé une augmentation continue jusqu'à 60 minutes (114,119). En revanche, l'activité et la concentration tissulaires de LPL dans le tissu adipeux et le lait maternel sont normales chez des patientes hétérozygotes composites (119). Les hétérozygotes présentent majoritairement un profil lipidique normal (115–117).

Enfin, deux polymorphismes de *GPIHBP1* ont été décrits comme associés aux HTG : le variant c.-469G>A, situé dans le promoteur, et pour lequel il n'existe pas d'étude fonctionnelle (124) ; et le variant c.41G>T (p.C14F), situé dans le peptide signal, qui diminuerait la capacité de transfert de la LPL à la surface endothéliale via une diminution d'expression de GPIHBP1 (116,122).

1.2.2.3. Apolipoprotéine A-V (ApoA-V)

L'ApoA-V est une protéine de 366 acides aminés (39 kDa ; les 23 premiers acides aminés correspondent au peptide signal) codée par le gène *APOA5*, appartenant au locus

APOA5- APOA4- APOC3 APOA1. La protéine mature est sécrétée après clivage du peptide signal (125). Elle est principalement exprimée par le foie et au niveau plasmatique, elle circule principalement sous forme monomérique, associée au VLDL, HDL et CM (126,127). Sa concentration plasmatique est très faible comparativement aux autres apolipoprotéines (inférieure à 1 mg/L), suggérant un rôle régulateur plutôt que structural (126).

L'ApoA-V intervient à plusieurs étapes dans la régulation du métabolisme des LRTG. Premièrement, elle active la lipolyse LPL-dépendante en augmentant l'adhérence des LRTG à la surface cellulaire via les HSPG et/ou GPIHBP1 (67,128,129). En effet, plusieurs domaines de liaison ont été identifiés sur l'ApoA-V : domaines de liaisons aux lipides (résidus 192-238 et 301-343), à la LPL (résidus 192-238) et à l'héparine et à GPIHBP1 (résidus 186-227) (104,130). Deuxièmement, l'ApoA-V accélérerait la capture hépatique des LRTG, par sa liaison à certains membres de la famille des récepteurs aux LDL (131,132) et aux protéoglycanes (133). Cependant, compte tenu des concentrations plasmatiques, ce rôle ne semble pas prépondérant (134). Enfin, l'ApoA-V pourrait intervenir sur la synthèse des VLDL soit par diminution de la lipidation de l'ApoB (135), soit en guidant les TG vers la formation de gouttelettes lipidiques (136). Cependant, ce rôle reste controversé puisque la production de VLDL et de CM n'est pas affectée chez les souris sur-exprimant l'ApoA-V humaine (137,138).

Les souris KO *apoA5*^{-/-} présentent des TG plasmatiques 3 à 4 fois supérieurs aux souris WT et des VLDL plus volumineuses. Les souris *apoA5*^{+/-} présentent une augmentation modérée des TG (125,137). A l'inverse, les souris transgéniques sur-exprimant l'ApoA-V présentent une réduction d'1/3 des concentrations plasmatiques en TG (137,138).

Chez l'homme, l'impact des variants *APOA5* sur la concentration plasmatique en TG a été largement étudié ces quinze dernières années et a fait l'objet de revues récentes (139,140). Premièrement, plus d'une vingtaine de variants délétères rares du gène *APOA5*, revus par Melegh *et al.* en 2012, ont été décrits associés à des HTG à l'état homozygote ou hétérozygote (141). La pénétrance est généralement considérée comme variable, avec nécessité d'association de facteurs génétiques additionnels (variant rare

LPL, polymorphisme *APOA5* p.S19W, polymorphisme *APOE*) ou de facteurs environnementaux (grossesse, diabète, obésité...) pour le développement de l'HTG (76,99,142–148). Les résultats d'activité *LPL* post-hépariniques sont contradictoires dans la littérature, normale ou abaissée selon les cas, aussi bien chez les hétérozygotes que chez les homozygotes (142–146,149).

D'autre part, le gène *APOA5* est un des locus les plus fortement associés à la concentration plasmatique en TG lors des études GWAS (8). Plusieurs polymorphismes de l'*APOA5* sont cohérités ou en fort déséquilibre de liaison, et sont donc transmis sous forme d'haplotype. Certains haplotypes, notamment celui comprenant le variant p.S19W, sont décrits associés à une augmentation de 20 à 30 % des TG plasmatiques par rapport aux homozygotes sauvages (125,150,151). Il est à noter l'existence d'une forte variabilité interethnique de la fréquence de ces variants (139). Plus récemment, 2 études sardes intéressantes ont décrit que le variant p.Arg282Ser (rs 778114184) était associé à une diminution des TG, du cholestérol total (CT) et du LDL-cholestérol (LDL-c) dans une population d'adolescents obèses et chez des adultes (152,153). Enfin, plusieurs études ont montré que deux polymorphismes d'*APOA5* (c.-1131T>C et p.S19W) étaient associés à une augmentation du risque cardiovasculaire (139), observation faite également pour des variants délétères (154).

1.2.2.4. Apolipoprotéine C-I (ApoC-I)

L'ApoC-I est une protéine de 83 acides aminés (6,6 kDa ; les 26 premiers acides aminés correspondent au peptide signal) codée par le gène *APOC1*, appartenant au locus *APOC1-APOC2-APOC4* (155). L'ApoC-1 inhibe l'activité *LPL* (156) et inhibe la liaison des VLDL aux récepteurs cellulaires (157). Plus précisément, au niveau du tissu adipeux blanc, l'ApoC-I inhiberait la *LPL*, participant ainsi à la régulation du métabolisme post-prandial des LRTG (158). Enfin, Larsson *et al.* ont montré récemment que l'ApoC-I, comme l'ApoC-III, inhibait la *LPL* en la déplaçant des particules lipidiques et la rendant ainsi plus vulnérable à l'inactivation irréversible par des facteurs comme ANGPTL4 (159).

Les souris transgéniques sur-exprimant le gène *APOC1* présentent une élévation importante des TG et une augmentation modérée du CT, principalement due à un défaut de capture hépatique des VLDL soit directement par l'ApoC-I, soit par modification de la composition des VLDL en autres apolipoprotéines (155). Des études ultérieures ont montré une inhibition dose dépendante de la LPL par l'ApoC-I, participant donc également au phénotype des souris transgéniques (160,161).

Chez l'homme, aucun variant fonctionnel du gène *APOC1* n'a été identifié comme modulateurs de la triglycéridémie à ce jour (65,155). En effet, seules deux anomalies génétiques sont rapportées dans la littérature, et leur rôle physiopathologique sur la triglycéridémie est questionnable : un variant situé dans le promoteur en déséquilibre de liaison avec un polymorphisme du gène *APOE* (162,163) et une délétion du gène *APOC1* associé à une délétion du gène *APOC2* (164).

1.2.2.5. Apolipoprotéine C-II (ApoC-II)

L'ApoC-II est une protéine de 101 acides aminés (8,8 kDa ; les 22 premiers acides aminés correspondent au peptide signal) codée par le gène *APOC2*, appartenant également au locus *APOC1-APOC2-APOC4*. Elle est localisée à la surface des CM, VLDL et des HDL dans la circulation périphérique (165). *In vitro*, l'ApoC-II active la LPL humaine synthétisée par le tissu adipeux (156). L'activation de la LPL est assurée par la partie C-terminale, en particulier les résidus 63, 66, 69 et 70, cependant la partie N-terminale intervient également dans la liaison à la LPL (166). Bien que l'ApoC-II soit un activateur essentiel de la LPL, son action est dose dépendante, et à forte concentration elle l'inhibe paradoxalement (155). Ainsi, une surexpression de l'ApoC-II entraîne une HTG par accumulation de VLDL chez la souris (167).

Chez l'homme, un peu moins de 30 variants délétères ont été décrit et ont été récemment revus par Wolska et *al.* (168). A l'état homozygote, les variants délétères, entraînant un défaut de synthèse ou de structure, sont associés à une HTG sévère et un phénotype similaire à celui d'un déficit en LPL, bien que parfois moins sévère et/ou de déclaration plus tardive. Ces variants représentaient la deuxième atteinte monogénique

la plus fréquente dans les FCS avant la découverte des variants délétères d'ApoA-V (7,155). Les porteurs hétérozygotes ont majoritairement un bilan lipidique normal, cependant ils pourraient présenter une HTG en cas de facteurs génétiques et/ou environnementaux additionnels (169). Curieusement, aucun variant *APOC2* n'a été associé à la triglycéridémie dans les études GWAS (170).

1.2.2.6. Apolipoprotéine C-III (ApoC-III)

L'ApoC-III est une protéine de 99 acides aminés (6,6 kDa ; les 20 premiers acides aminés correspondent au peptide signal) codée par le gène *APOC3*, appartenant à un locus différent des deux précédentes, *APOA5- APOA4- APOC3 APOA1*. Elle est localisée à la surface des CM, VLDL et des HDL dans la circulation périphérique (155). Les souris KO *apoc3*^{-/-} présentent une diminution d'environ 70% de leur concentration plasmatique en TG ainsi qu'une diminution de leur concentration plasmatique en CT (155). A l'inverse, les souris transgéniques sur-exprimant l'ApoC-III présentent une HTG (171,172). Son rôle dans le métabolisme des LRTG a fait l'objet d'une intéressante revue récemment (173).

Le rôle principal décrit de l'ApoC-III est d'être un inhibiteur de la LPL. En effet, plusieurs études *in vitro* ont montré que l'ApoC-III inhibait l'hydrolyse des TG LPL-dépendante en déplaçant celle-ci des LRTG par compétition (159,174,175). Cependant, des publications récentes remettent en cause ces observations.

- Premièrement, l'ApoC-III inhibe la LPL seulement si sa concentration est 5 fois supérieure à celle de l'ApoC-II dans les LTRG ; ces situations ne sont quasiment jamais observées chez l'homme en conditions physiopathologiques (159,175,176).

- Deuxièmement, les études *in vitro* utilisent de la LPL libre, et comme rapporté précédemment, il est plus pertinent de s'intéresser au complexe LPL-GPIHBP1. Larsson *et al.* ont décrit récemment que l'ApoC-III inhibait modérément la LPL libre, mais que cette inhibition augmentait significativement lorsque la LPL est liée GPIHBP1 (176).

- D'autre part, la réduction spectaculaire de la concentration en TG plasmatiques chez 3 patients FCS par l'utilisation d'ASO, suggère que l'ApoC-III intervient dans le métabolisme des LRTG principalement par un mécanisme LPL-indépendant (10). Ainsi,

l'ApoC-III inhibe la capture hépatique des LRTG via la famille des récepteurs aux LDL. En effet, Gordts *et al.* ont montré que chez les souris KO *ldlr*^{-/-} ou *lrp1*^{-/-}, l'administration ASO *APOC3* n'avait aucun effet sur la concentration en TG, contrairement aux souris WT. Au contraire, les souris KO *sdcl*^{-/-} (déficiente pour syndécan-1, voir paragraphe 1.2.3.3.1) accumulent des LRTG enrichies en ApoC-III, suggérant une voie préférentielle pour la capture des LRTG (177). Il a été proposé que l'ApoC-III empêcherait la capture hépatique des LRTG via le LDLR et LRP1 en affaiblissant l'association ApoE-LRTG (171,178), mais cela reste controversé et les mécanismes exacts doivent encore être élucidés (173).

- Enfin, trois études *in vitro* ont montré que l'ApoC-III participe à la régulation de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL, sans que de mécanisme ne soit clairement identifié (179–181). Cependant, à l'heure actuelle, les études utilisant les stratégies anti *APOC3* (ASO et anticorps monoclonaux) n'ont pas mis en évidence de rôle de l'ApoC-III dans la production de VLDL chez l'homme et/ou la souris (177).

L'intérêt pour l'ApoC-III est ainsi croissant depuis ces dernières années, notamment grâce aux résultats prometteurs de l'utilisation d'ASO *APOC3* comme thérapie hypotriglycéridémiante, sous réserve de leur sécurité d'emploi (10,11).

Des études sur de larges cohortes européennes ou d'origine africaine ont conduit à l'identification d'une vingtaine de variants *APOC3* nul ou perte de fonction, qui à l'état hétérozygote sont associés à une diminution des TG (-39 à 44 % vs WT) et une diminution du risque cardiovasculaire (36 à 40% vs WT) (182,183). A l'inverse, un variant rare gain de fonction a été identifié (p.Gln38Lys), associé quant à lui à une HTG modérée et une augmentation du risque cardiovasculaire (180,184). En plus de ces variants rares, plusieurs variants non codants du gène *APOC3*, tels que les variants promoteurs (rs2854117 et rs2854116) ou 3'UTR *SstI* (rs5128), sont étroitement associés à l'HTG modérée à sévère, mais leur fonctionnalité n'est pas clairement établie (185,186).

1.2.2.7. Apolipoprotéine E (ApoE)

L'ApoE est une protéine de 317 acides aminés (34,2 kDa ; les 28 premiers acides aminés correspondent au peptide signal), codée par le gène *APOE*. L'ApoE humaine

existe sous trois isoformes communes : ApoE3 est considérée comme la forme sauvage/ancestrale. L'ApoE2 diffère de l'ApoE3 par la substitution d'une arginine par une cystéine en position 158, à proximité du domaine de liaison au LDLR, entraînant la création d'un pont disulfure. L'ApoE4 diffère quant à elle de l'ApoE3 par la substitution d'une cystéine par une arginine en position 112. L'ApoE2 et l'ApoE4 ont une fonctionnalité altérée et sont associées à des anomalies de concentrations et de distribution des lipoprotéines plasmatiques (187).

L'ApoE3 circule associée aux CM, VLDL et HDL (187). Son rôle principal est de se lier aux récepteurs LRP, LDLR, et aux HSPG présents à la surface des hépatocytes et ainsi de participer à l'endocytose des remnants des LRTG (188). D'autre part, il a également été décrit que l'ApoE interviendrait dans la production des VLDL puisque son expression intracellulaire dans des hépatocytes favorise l'assemblage des VLDL et leur sécrétion (189). Enfin, L'ApoE est capable d'inhiber la LPL *in vitro* via son domaine de liaison aux lipides (190,191). L'ApoE2 a une affinité diminuée pour le LDLR (192), et par conséquent entraîne une diminution de la clairance des LRTG de la circulation. L'ApoE4 a une affinité similaire à l'ApoE3 pour le LDLR, en revanche elle a une affinité plus importante pour les VLDL (193,194). En effet, la substitution en position 112 déstabilise la structure C-terminale, avec pour conséquence une augmentation de l'affinité pour les lipides (195). L'augmentation de la concentration de l'ApoE4 à la surface des VLDL qui en résulte, serait responsable d'une altération de la lipolyse LPL dépendante par déplacement de l'ApoC-II (190,196).

Les souris KO *apoe*^{-/-} furent le premier modèle d'hyperlipidémie et d'athérosclérose. Une accumulation de remnants riches en cholestérol est observée chez ces souris, avec une concentration en cholestérol circulant multipliée par 5 (197).

Chez l'homme, l'allèle ϵ 2 (codant pour l'ApoE2) à l'état homozygote et certains variants rares peuvent être responsables de dysbetalipoprotéinémie, lorsqu'ils sont associés à d'autres facteurs environnementaux. La dysbetalipoprotéinémie est une hyperlipidémie mixte, athérogène, caractérisée par l'accumulation de remnants de LRTG enrichis en cholestérol, et pouvant décompenser transitoirement en HTG sévère (198,199). Cependant, les variants rares ont également été associés à un large spectre de

dyslipidémies, allant de l'HTG (200,201) à l'hypercholestérolémie (202) ainsi que dans la glomérulopathie lipoprotéinique (203).

1.2.2.8. Protéines angiopoietine like (ANGPTL)

Les protéines angiopoietin-like (ANGPTL) sont au nombre de 8 (ANGPTL1 à ANGPTL8) et sont caractérisées par une structure commune : une séquence N-terminale ou séquence signal, une séquence spécifique, un domaine super hélice (*coiled-coil*) et un large domaine fibrinogène/angiopoietine-like, à l'exception d'ANGPTL8. Depuis les débuts des années 2000, les ANGPTL ont émergé comme régulateurs de la concentration plasmatique en TG. A l'heure actuelle, les rôles d'ANGPTL3 et 4 sont relativement bien caractérisés, mais il n'existe aucune preuve d'une implication directe des autres ANGPTL dans le métabolisme des LRTG (204,205). Cependant, quelques études suggèrent qu'ANGPTL8 agirait de concert avec ANGPTL3 pour inhiber la LPL (206,207). Zhang *et al.* ont proposé un modèle intégré coopératif des ANGPTL 3, 4 et 8 dans la régulation tissu spécifique de la LPL et par conséquent dans le métabolisme des TG (208).

1.2.2.8.1. ANGPTL3 et ANGPTL4

ANGPTL3 est une protéine de 460 acides aminés (54 kDa), codée par le gène *ANGPTL3*. ANGPTL3 est spécifiquement synthétisée dans le foie. Comme les autres ANGPTL, ANGPTL3 subit un clivage protéolytique au niveau du site ²²¹RAPR₂₂₄, ainsi qu'une glycosylation sur une thréonine adjacente (209). ANGPTL4 est une protéine constituée de 406 acides aminés (45 kDa), codée par le gène *ANGPTL4*. Contrairement à ANGPTL3, ANGPTL4 est synthétisée dans les hépatocytes, les adipocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales intestinales, les myocytes, et les macrophages. Avant sécrétion, elle subit une oligomérisation par des liaisons disulfides et, après sécrétion, elle est clivée au niveau du site ¹⁶¹RRKR₁₆₄ (205).

ANGPTL3 et 4 inhibent la LPL, mais le mécanisme de cette inhibition reste controversé. En 2009, Shan *et al.* ont proposé des mécanismes différents pour les deux ANGPTL :

- ANGPTL4 favoriserait l'inactivation de la LPL en entraînant la dissociation des dimères actifs en monomère de LPL (210,211).

-ANGPTL3 supprimerait l'activité catalytique de la LPL (212). Cette hypothèse est soutenue par l'observation de Sonnenburg *et al.*, qui ont démontré que l'héparine pouvait annuler l'inhibition de la LPL par ANGPTL3, mais pas celle par ANGPTL4 (107).

A l'inverse, Mysling *et al.* ont montré qu'ANGPTL3 et ANGPTL4 étaient tous les deux capables d'accélérer le dépliement de la triade catalytique de la LPL. Ainsi, ANGPTL3 et ANGPTL4 agiraient de façon similaire, mais pas identique, notamment par un pouvoir inhibiteur beaucoup plus faible d'ANGPTL3 et par leur mode de signalisation (endocrine pour ANGPTL3 *versus* paracrine ou autocrine pour ANGPTL4)(209). La liaison à GPIHBP1 à la LPL assure une protection contre sa désactivation par ANGPTL3 et ANGPTL4 (107,108).

ANGPTL3 et ANGPTL4 présentent quelques spécificités supplémentaires. ANGPTL3 serait capable d'inhiber également la lipase endothéliale, mais le mécanisme n'est pas élucidé (213). Enfin, ANGPTL3 pourrait réguler la sécrétion des VLDL puisqu'une diminution de la sécrétion des VLDL a été observée par l'inhibition d'ANGPTL3 (immunologique, génétique ou par ASO), mais ce mécanisme d'action reste controversé (214,215).

Des études récentes suggèrent qu'ANGPTL4 est une protéine clé de la régulation du métabolisme des LRTG en conditions physiologiques, comme en cas de jeûne, le froid et l'exercice. En effet, ANGPTL4 serait le composant central du rétrocontrôle régulant l'hydrolyse des TG et ainsi, la capture tissulaire des acides gras en réponse à la disponibilité en lipides et la demande cellulaire en énergie (216–218). Récemment, Mattijssen *et al* ont prouvé qu'ANGPTL4 inhibait également la lipase pancréatique, jouant ainsi rôle dans la régulation de l'absorption intestinale des lipides et protégeant ainsi l'entérocyte de la surcharge lipidique (219). En revanche, il n'a pas été démontré qu'ANGPTL4 inhibait la lipase endothéliale, et un effet sur la lipase hépatique reste controversé (216).

Une souche particulière hypolipidémique du modèle de souris obèse KK, les souris *KK/San*, est le premier modèle murin présentant un déficit en ANGPTL3 et a

permis la découverte du gène *ANGPTL3*. Les souris KO *Angptl3*^{-/-} présentent une augmentation de l'activité LPL post-héparinique et une diminution des TG plasmatiques (220). Chez la souris, la surexpression d'ANGPTL4 induit une HTG alors qu'une diminution des TG est observée chez les souris KO *Angptl4*^{-/-}. Les souris *Angptl4*^{-/-} présentent également une augmentation du poids corporel et une augmentation de l'accumulation de TG dans l'intestin (220).

Chez l'homme, l'utilisation d'une approche par séquençage exomique a permis d'identifier l'association des variants *ANGPTL3* perte de fonction à l'état homozygote ou hétérozygote composite, au phénotype d'hypolipémie combinée familiale (FHBL2, OMIM#605019) (221). Une cinquantaine de variants perte de fonction ont été décrits à ce jour, et ont été revus par Tarugi *et al* récemment (222). Les patients homozygotes présentent une diminution des TG, CT et LDL-c plasmatiques associée à une augmentation de l'activité et de la concentration plasmatique en LPL. En revanche, le phénotype hypolipique des hétérozygotes est variable, sans variation significative de l'activité et de la concentration en LPL (223–227). Également, les études GWAS ont identifié plusieurs loci, situés à proximité d'*ANGPTL3*, associés à la concentration plasmatique en TG (170). Enfin, les premières études d'inhibition d'ANGPTL3, par ASO ou anticorps monoclonal, ont montré une diminution des TG (-33,2 à -76%) et du LDL-c (-3,4 à -25,7%) laissant présager une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des dyslipidémies et la réduction du risque cardiovasculaire (215,228). Par ailleurs, les variants perte de fonction *ANGPTL4*, notamment le variant p.Glu40Lys, sont associés à une diminution des TG et une augmentation du HDL-c (227,229,230). Plus récemment, Dewey *et al.* ont été décrit une réduction du risque cardiovasculaire chez les porteurs de variants perte de fonction *ANGPTL4* (231), mais le mécanisme physiopathologique reste controversé (232). Ces variants ont également été décrits comme associés à l'homéostasie du glucose et à la sensibilité à l'insuline (233). A noter que deux variants situés dans le domaine fibrinogène like (p.Pro251Thr et p.Arg371Glu) sont quant à eux associés à une augmentation des TG sans que leur fonctionnalité soit connue (227). Enfin, les études GWAS ont identifié plusieurs variants à proximité d'*ANGPTL4*, étaient associés au HDL-c, mais pas à la concentration en TG (170).

1.2.2.8.2. ANGPTL8

ANGPTL8, également dénommée lipasine, RIFL (Re-feeding Induces in Fat and Liver), ou betatrophin, est une protéine de 198 acides aminés (22 kDa) codée par le gène C19orf80 (chromosome 19 open reading frame 80) (234). L'expression d'ANGPTL8 est induite par la prise alimentaire et est majoritairement hépatique (235). ANGPTL8 favorise le clivage d'ANGPTL3, se lie à la partie N-terminal d'ANGPTL3 et ce complexe ainsi formé inhiberait la LPL (206–208,235).

Les souris KO *angptl8*^{-/-} ont des concentrations plasmatiques en TG plus basses et une augmentation de l'activité LPL (236,237). Inversement, la surexpression d'ANGPTL8 augmente la concentration plasmatique en TG et induit une diminution de l'activité LPL (237,238).

Chez l'homme, trois polymorphismes ont été associés à des modifications du profil lipidique. Premièrement, le variant p.Arg59Trp est associé dans plusieurs populations à une diminution du HDL-c et du LDL-c (235,239). Ensuite, les porteurs du variant non-sens p.Gln121* présentent une augmentation du HDL-c et une diminution des TG (≈15%) (240). Enfin, le variant rs737337, situé dans la région promotrice du gène codant pour ANGPTL8, a également été associé au HDL-c dans les études GWAS (170).

1.2.2.9. Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREB-H)

La protéine CREB-H (Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H), codée par le gène *CREB3L3*, est un facteur de transcription qui lie les éléments CRE (TGACGTCA) et box-B-like de régions promotrices (241,242). La découverte de son implication dans la régulation du métabolisme LRTG est récente. Les souris KO *Creb3l3*^{-/-} présentent une augmentation significative des concentrations plasmatiques en TG et en ApoB par rapport aux souris WT. Chez ces souris, l'accumulation de VLDL enrichies en TG est la conséquence d'une diminution de la clairance des TG plasmatiques, par diminution de l'expression de coactivateurs de la LPL (ApoC-II, ApoA-IV et ApoA-V) et une augmentation de l'ApoC-III (243).

Chez l'homme, Johansen *et al.* ont décrit des variants à l'état hétérozygote chez des individus présentant une HTG (TG>3,37 mmol/L); aucun variant délétère n'a été retrouvé dans une population normotriglycéridémique témoin (8). Des études supplémentaires sont nécessaires pour connaître les mécanismes cellulaires exacts par lesquels CREB-H est activé et régule l'homéostasie des TG en concert avec les autres protéines régulatrices de la transcription.

1.2.3. Lipolyse intravasculaire des LRTG

La lipolyse intravasculaire correspond à l'hydrolyse des acides gras des TG contenus dans les LRTG sous l'action de la LPL. Cette lipolyse permet l'élimination d'environ 90% des TG des LRTG générant ainsi des remnants (244).

1.2.3.1. Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière capillaire

La LPL est synthétisée dans les cellules parenchymateuses sous forme de monomères inactifs (37). Grâce à l'action de la protéine chaperonne LMF1 et de Sel1L, les dimères de LPL vont se former par liaisons non covalentes (93). En cas de mauvais repliement dans le réticulum endoplasmique ou en l'absence de LMF1, la LPL peut subir une dégradation intracellulaire (245). La LPL peut être sécrétée sous forme de monomères ou de dimères et pourra se lier aux HSPG à la surface cellulaire ou au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace sous-endothélial. La liaison aux HSPG permet la diminution de l'internalisation et de la dégradation intracellulaire de la LPL (246,247). Les dimères de LPL sont instables et peuvent se dissocier en monomères inactifs spontanément ou par interactions avec les ANGPTL (208). Les dimères de LPL se lient à GPIHBP1, qui permet leur translocation vers le côté vasculaire de l'endothélium, où de nombreux complexes GPIHBP1 peuvent coopérer pour former des « plateformes lipolytiques ». Le complexe GPIHBP1-LPL serait capable de circuler de manière bidirectionnelle à travers les cellules endothéliales (109,110). Ainsi, GPIHBP1 et ANGPTL4 entrent en compétition pour la liaison de la LPL : ANGPTL4 capture la LPL dans l'espace sous-endothélial via ses liaisons avec la matrice extracellulaire et GPIHBP1 emmène la LPL à travers l'endothélium (216). Au niveau de l'endothélium des capillaires

des tissus sécrétant la LPL, les HSPG sont localisés en groupement à la surface cellulaire, et forment des stations d'ancrages («docking stations») de la LPL (248). Au niveau de ces sites, les HSPG fournissent une plateforme pour l'interaction avec les LRTG en facilitant leur liaison par la présence de charges négatives (4,249).

1.2.3.2. Margination et hydrolyse des LRTG

Pour que la lipolyse des LRTG soit possible, celles-ci doivent «s'arrêter», s'attacher à la face luminale des capillaires. Ce phénomène correspond à la margination des LRTG. Le complexe LPL-GPIHBP1 pourrait être nécessaire à la margination (48). Dans une étude de cinétique des CM chez la souris, Hultin *et al.* ont montré qu'une fois que la particule de CM est liée à l'endothélium des capillaires cardiaques, elle restait alors de nombreuses minutes (246). Goulbourne *et al.* ont montré que les complexes LPL-GPIHBP1 étaient responsables de cette margination, via les domaines de liaison des lipides de la LPL (111). Ils ont également montré que la liaison de la LPL aux HSPG ne semblait pas être impliquée, bien que l'héparine soit capable d'inhiber cette margination.

Une fois que les LRTG sont liées, la LPL hydrolyse les TG, entraînant la libération d'acides gras libres et monoacylglycérols. Après 3 minutes, la lipoprotéine a perdu 1/3 de ces TG. Ceci correspond à l'hydrolyse d'environ 600 000 liaisons ester (251). La réaction d'hydrolyse est stimulée par l'ApoC-II et l'ApoA-V à la surface des LRTG. A l'inverse ; elle est inhibée par l'ApoC-III qui entre en compétition avec la LPL à la surface des LRTG. Les acides gras libérés sont ensuite recaptés par des récepteurs, comme CD36, localisés à la surface de la membrane plasmique des adipocytes et des myocytes. Ils sont ré-estérifiés et stockés ou procurent une source d'énergie pour l'oxydation mitochondriale (248,252). En l'absence d'accepteurs comme l'albumine ou de recapture, les acides gras libres et les monoacylglycérols s'accumulent au niveau du site d'hydrolyse et inhibent la réaction (77). Il a également été montré que les remnants, les IDL et les LDL étaient des inhibiteurs non compétitifs de la LPL (253).

Les remnants de LRTG ainsi produits se détachent : 1/ quand la LPL et les protéines activatrices sont expulsées de la particule ; 2/ quand les produits de lipolyse

s'accumulent sur le site de lipolyse ; 3/ les dimères de LPL se dissocient spontanément ou sous l'action des ANGPTL 3 et 4 (250). La lipolyse des LRTG serait constituée d'une série d'attachement/détachement. A chaque site d'attache, il a été montré qu'approximativement quarante molécules de LPL pouvaient agir simultanément pour atteindre la capacité maximum d'hydrolyse (37).

1.2.3.3. Conséquence de la lipolyse sur la structure et devenir des LRTG hydrolysés

L'hydrolyse des TG des LRTG s'accompagne d'une diminution de leur taille et de leur masse, et d'un enrichissement en ester de cholestérol (254,255). La lipolyse des LTRG s'accompagne *in vitro* d'une diminution des HDL3 et d'une augmentation des HDL2 : cette transformation serait le résultat du relargage des composants de surface des LRTG (phospholipides) avec un transfert facilité par la protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP) en vue de leur accumulation par les HDL3 (254,256).

Au cours de la lipolyse, les ApoC-II et III, du cholestérol libre et des phospholipides seront transférés des VLDL aux HDL (254,255). L'ApoE pourrait également être transférée aux HDL, mais en moindre importance car il a été décrit un enrichissement relatif des CM et VLDL en ApoE au cours de la lipolyse. Cet enrichissement pourrait empêcher l'action catalytique de la LPL et orienter les remnants vers une recapture hépatique (254,257-259). De plus, il existerait également un transfert de cholestérol estérifié des remnants de VLDL vers les HDL médié par la CETP (Cholesteryl Ester Transfert Protein), mais celui-ci serait variable et dépendrait de la composition des HDL (255). Des esters de cholestérol pourraient également être transférés à des VLDL naissants : ceci permettrait d'éliminer l'excès de CE et les remnants ainsi enrichis en TG pourraient alors subir à nouveau une hydrolyse (260).

Les remnants ont alors deux devenir possibles : certains IDL et les remnants de CM sont captés par le foie alors qu'une partie des VLDL est ensuite convertie en IDL puis en LDL (4). L'orientation vers l'une ou l'autre voie dépendrait de la taille et de la composition des VLDL (261). Les VLDL de petite taille (contrairement aux VLDL de

grande taille) peuvent également être le substrat de la lipase hépatique, ceci pourrait favoriser l'hydrolyse de ces VLDL avant leur capture (4). Ensuite, l'ApoE semble jouer un rôle crucial en redirigeant vers la capture hépatique alors que l'ApoC-III inhibe cette voie (257). Les LRTG ne contenant ni ApoC-III ni ApoE (<10 % des VLDL totales) sont presque exclusivement lipolysées en IDL alors que celles qui contiennent de l'ApoC-III, mais pas d'ApoE (environ 50 % des VLDL totales) sont majoritairement converties en LDL et celles qui contiennent de l'ApoE et qui ont perdu l'ApoC-III au cours de la lipolyse sont rapidement captées de la circulation (257).

1.2.3.3.1. Capture hépatique des remnants de LRTG

Les remnants de LRTG vont être endocytés par les hépatocytes pour subir une dégradation lysosomale (262,263). Les remnants de LRTG sont tout d'abord séquestrés au niveau de l'espace de Disse grâce aux interactions avec les HSPG, et leurs TG pourront continuer à être hydrolysés à ce niveau par la LPL et la lipase hépatique (264,265). De nombreux récepteurs interviennent dans ce processus : LDLR, VLDL, LRP1, LRP5, syndecan-1, SR-B1 et LSR. Les ligands diffèrent d'un récepteur à l'autre et les principaux sont l'ApoE et la LPL. Après endocytose, les lipides et l'ApoB seront dirigés vers le lysosome pour dégradation alors l'ApoE sera recyclée et incorporée aux HDL (266,267).

Les ligands. Tous les ligands des récepteurs possèdent un domaine hydrophobe pour adhérer aux lipoprotéines et un domaine cationique chargé négativement qui interagit avec les récepteurs hépatiques spécifiques (263). Des protéines additionnelles possédant des domaines hydrophobes peuvent également jouer un rôle, comme la lipase hépatique et l'ApoA-V (131,268–270). Pour les IDL, l'ApoB-100 contribue elle aussi à l'endocytose, après modification de sa conformation durant la lipolyse (271). D'autre part, l'ApoC-III serait un inhibiteur de la recapture hépatique (voir 1.2.2.6.). Dans une étude cinétique *in vivo*, Zheng *et al.* ont montré que l'association de l'ApoC-III aux lipoprotéines inhibait leur élimination de la circulation (257). La diminution spectaculaire des LRTG par l'administration d'ASO *APOC3* chez les patients FCS est en faveur de cette hypothèse (10).

Syndecan-1 heparan sulfate. L'hépatocyte exprime de nombreux HSPG, mais syndecan-1 (SDC1) a été identifié comme l'acteur principal dans la recapture des LRTG (263,265). SDC1 est un HSPG transmembranaire exprimé abondamment à la surface du parenchyme hépatique, le long des microvilli faisant face à l'espace de Disse (272). Il possède 3 chaînes héparane sulfate et deux chaînes chondroïtin/dermatan sulfate (265). La capacité de SDC1 à se lier et à internaliser les remnants de LRTG a été montrée *in vitro* sur cellules CHO (273,274). Des études *in vivo* chez la souris ont confirmé que l'absence de SDC1 entraînait une altération de la clairance des LRTG associée à une augmentation des TG plasmatiques (272). De plus, il a été montré que d'autres protéines intervenant dans le métabolisme des HSPG pouvaient avoir un impact sur la capture des remnants de LRTG (265). Premièrement, l'inactivation spécifique de *Ndst1* (N-déacétylase/N-sulfotransférase (heparan glucosaminyl) 1) et de *Hs2St* (Heparan sulphate 2-O-sulphotransferase) au niveau hépatique chez la souris a montré que les N- et 2-O-sulfatations sont nécessaires à la liaison des remnants (275,276). Ensuite, l'inactivation d'EXT1 (Exostosin-1, catalysant l'assemblage des chaînes héparane sulfate avec EXT2) et du LDLR chez la souris est responsable d'une hyperlipidémie modérée, suggérant que la longueur de la chaîne d'héparane sulfate pourrait être importante dans la capture des remnants (277). Enfin, une augmentation de l'expression de SULF2 (héparane sulfate endo-6-sulfatase) est associée à une diminution de liaison des VLDL sur des hépatocytes en culture alors que son inhibition par ASO corrige l'HTG induite par sa surexpression chez les souris *db/db* (278). En accord avec cette observation et confirmant l'importance de la 6-O-sulfatation, un variant fréquent de *SULF2* a été associé à une HTG post-prandiale chez des sujets obèses. Le traitement d'hépatocytes par héparine lyase a montré que les HSPG représentent au moins 90% des capacités de liaison de l'hépatocytes et participent à environ 50 % de la clairance des remnants de LRTG (279). L'internalisation de SDC1 et l'acheminement des remnants liés aux lysosomes est relativement lente ($t_{1/2} \approx 30$ à 45 minutes). Ce mécanisme est indépendant des protéines clathrines et cavéolines mais fait intervenir des structures en « raft » et l'oligomérisation de SDC1 (273,274,280). D'autre part, il a également été montré que SDC1 liait préférentiellement les remnants d'un diamètre compris entre 20 et 40 nm et enrichis en ApoE et en ApoA-V (133,281). La liaison LRTG-SDC1 requiert la liaison simultanée de l'ApoE et l'ApoA-V aux héparanes sulfates mais ne fait pas intervenir l'ApoB (133). D'autre part, une accumulation d'ApoC-III a été observée chez les souris

KO *sdcl*^{-/-}, contrairement aux souris KO *ldlr*^{-/-} et *lrp1*^{-/-}, suggérant que SDC1 capture spécifiquement les remnants de petite taille enrichis en ApoC-III (281). Cette hypothèse est soutenue par la diminution de clairance des remnants chez les souris KO *sdcl*^{-/-}, alors qu'il n'y a pas d'effet chez les souris *ldlr*^{-/-} et *lrp1*^{-/-} (281).

LDLR. L'endocytose des remnants de LRTG par le *LDLR* serait une voie complémentaire de celle des HSPG, en étant de faible capacité (<5x10⁴ sites de liaison par hépatocytes), de forte affinité et rapide (t_{1/2} = 10 minutes) (263,272). Cependant, les études *in vivo* chez les souris KO *ldlr*^{-/-} n'ont pas montré de différence sur le taux de capture hépatique des remnants comparé au WT, mais seulement une capture légèrement plus lente (190,282). D'autre part, il a également été montré que, chez ces souris, les remnants restaient une vingtaine de minutes dans l'espace de Disse avant d'être progressivement endocytés. En revanche, ils ne sont pas retrouvés chez les souris WT, probablement grâce à une endocytose plus rapide liée au LDLR (283,284). Enfin, il a été proposé que le LDLR jouerait un rôle seulement dans la recapture des remnants de petite taille (285).

SRB1. Le récepteur scavenger de classe B type I (SR-BI) agit principalement comme récepteur des HDL (286). Cependant, les souris KO *SR-BI*^{-/-} présentent une accumulation de remnants de LRTG après une charge en graisse (287) et une altération de la capture hépatique des β-VLDL (288). A l'inverse, la surexpression de SR-B1 au niveau hépatique chez la souris accélère la clairance des lipoprotéines en période postprandiale (287). Les études menées *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que SR-B1 servait de point d'ancrage pour les remnants mais qu'il ne médiait pas l'internalisation des remnants ou la capture spécifique des lipides des remnants (287–289). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de SR-B1 dans le métabolisme des remnants chez l'homme (286).

LRP1. LRP1 (LDL récepteur-related protein 1) est un récepteur d'endocytose et de signalisation cellulaire, exprimé dans de nombreux tissus (290,291). En tant que membre de la famille des récepteurs aux LDL, plusieurs études ont proposé la participation de LRP1 dans la capture hépatique des remnants (292–294). Cependant,

son rôle reste incertain puisque la délétion de *LRP1* au niveau hépatique chez la souris n'induit pas, à elle seule, de phénotype lipidique (294).

1.2.3.3.2. Conversion des IDL en LDL

Les VLDL de petite taille subissent des étapes de lipolyse multiples et sont hydrolysées jusqu'à leur conversion en LDL (4). Il a également été proposé une participation de la lipase hépatique dans la conversion VLDL-IDL-LDL. En effet, cette lipase, présentant 40% d'homologie avec la LPL, est capable d'hydrolyser les TG des HDL et des IDL principalement (269,295). L'activité de la lipase hépatique est corrélée à la diminution d'ApoB observée après infusion d'héparine (296). La conversion d'IDL en LDL nécessite la perte d'ApoE pour ces particules (297).

1.2.3.4. Affinité relative de La LPL pour les chylomicrons et les VLDL

Dès les années 1970, il a été décrit que la clairance des CM était beaucoup plus rapide que celle des VLDL (demi-vie plasmatique de 4,5 minutes pour les CM versus 264 minutes pour les VLDL de petite taille) (298). Cependant, de faibles variations de concentration de VLDL à jeun entraînent un retard de la clairance des CM. Ces observations matérialisent la problématique de l'affinité relative de la LPL vis-à-vis des CM et des VLDL (298).

D'une part, *in vitro*, la LPL se lie avec une affinité beaucoup plus importante aux CM qu'aux VLDL (environ 50 fois plus importante) (298). D'autre part, la clairance plus rapide des CM par rapport aux VLDL peut s'expliquer par des considérations anatomiques. Premièrement, elle pourrait être fonction de la taille des capillaires. Si l'on considère que la proximité, vis-à-vis de la LPL, comme une fonction de l'espace vasculaire occupée par la lipoprotéine, les particules de CM ont 25 fois plus de chance d'interagir avec chaque molécule de LPL. Deux autres facteurs pouvant modifier l'interaction des lipoprotéines avec la LPL doivent être pris en compte : le flux sanguin et les mouvements des vaisseaux eux-mêmes. Dans la circulation rapide et turbulente des

artères, les CM restent en suspension. Dans la circulation plus lente des capillaires, il est possible que les particules de CM commencent à se séparer du plasma. Les VLDL, moins sujets à la flottaison, resteraient en suspension quelles que soient les conditions de circulation. De plus, les vibrations et les mouvements d'organe entier, comme la contraction musculaire, pourraient distordre la circulation intravasculaire et augmenter la possibilité de rencontre entre les particules insolubles et les parois vasculaires (4).

Cependant, les VLDL étant présentes en quantité beaucoup plus importante dans le plasma, environ 20 fois plus de particules, ceci pourrait expliquer qu'à l'état postprandial, elles pourraient entrer en compétition avec les CM et avoir des chances égales de se lier à une molécule de LPL.

2. DYSLIPIDEMIES MONOGENIQUES DES LIPOPROTEINES CONTENANT DE L'APOB

Dans ce chapitre, l'exploration des HTG sévères sera détaillée pour introduire les travaux des deux articles de la partie expérimentale. En revanche, les hypercholestérolémies et hypocholestérolémies seront seulement décrites brièvement, car seulement abordées dans le deuxième article.

2.1. Hypertriglycémie sévère

L'HTG sévère se définit par une concentration en TG plasmatiques supérieure à 10 mmol/L et peut correspondre à deux formes différentes : une forme familiale monogénique extrêmement rare, le FCS, et une forme oligogénique multifactorielle un peu moins rare, le MCS (5,6) (Tableau 1). Le diagnostic différentiel entre ces deux entités peut être difficile puisque le phénotype clinique et biologique est similaire pendant les décompensations (299). Le diagnostic d'orientation repose sur la présentation clinique et le bilan lipidique. Le diagnostic de confirmation repose sur l'analyse génétique, considérée à l'heure actuelle comme la technique de référence, ou le dosage de l'activité LPL si il est disponible (75,300,301). Un groupe d'experts européens a proposé en 2017 un algorithme diagnostique afin d'aider les praticiens à reconnaître les signes d'orientation et manifestations cliniques du FCS (300). Très récemment, un panel d'experts européens plus élargi a proposé un score diagnostique basé sur des items clinico-

biologiques proches de ceux proposés dans l'algorithme. Un score >10 correspond à un FCS très probable. Ce score pourrait permettre de cibler les patients pour lesquels il faut réaliser une analyse génétique, et d'autre part, aider au diagnostic de FCS lorsque les tests de confirmation ne sont pas disponibles (299).

	FCS	MCS
Désignations antérieures	Chylomicronémie familiale Hyperlipoprotéïnémie de type I	Dyslipidémie mixte Hyperlipoprotéïnémie de type V
Principales anomalies des lipoprotéines	Augmentation des CM principalement	Augmentation transitoire des LRTG Augmentation des CM Augmentation des VLDL Augmentation des remnants de LRTG
Anomalies des lipoprotéines associées	Diminution des VLDL, LDL et HDL	Diminution des HDL Parfois diminution des LDL
Age de découverte	Enfance ou adolescence	Adulte
Manifestations cliniques	Retard de croissance Douleurs abdominales Nausées, Vomissements Xanthomes éruptifs Lipémie rétienne Pancréatites Hépatosplénomégalie	Douleurs abdominales Nausées, Vomissements Xanthomes éruptifs (rare) Lipémie rétienne (rare) Pancréatites
Association au risque cardiovasculaire	Minime	Augmentée selon certaines études
Prévalence	≈1 : 100 000 à 1 : 1 000 000	≈1 : 600
Contribution de facteurs secondaires	Minime	Majeure
Mode de transmission	Autosomique récessif	Caractère familial, mais pas de transmission selon modèle classique
Causes génétiques	Variants délétères homozygotes ou hétérozygotes composites de <i>LPL</i> , <i>APOC2</i> , <i>APOA5</i> , <i>GPIHBP1</i> ou <i>LMF1</i>	Augmentation de la prévalence : - de variants délétères hétérozygotes <i>LPL</i> , <i>APOC2</i> , <i>APOA5</i> , <i>GPIHBP1</i> , <i>LMF1</i> , <i>APOB</i> , <i>GCKR</i> et <i>CREBH</i> - de variants fréquents associés à des variations mineures de la concentration en TG, identifiés dans 40 gènes par étude GWAS
Traitement	Règles hygiéno-diétiques Faible efficacité des fibrates, de la niacine, des omégas 3 et des statines	Règles hygiéno-diétiques Contrôle des facteurs secondaires Efficacité variable des fibrates et de la niacine

Tableau 1. Comparaison des syndromes hyperchylomicronémies familiale et multifactorielle, traduit d'après Brahm et Hegele (7)

On parle de chylomicronémie, quelle que soit son étiologie, lors de la persistance de CM plasmatiques après un jeûne de 12 à 14 heures. Chez les individus sains, les CM disparaissent de la circulation plasmatique en 3 à 4 heures après une prise alimentaire (7). En estimant que la présence de CM est associée à une triglycéridémie à jeun supérieure à 10 mmol/L, la fréquence des HTG sévères est controversée, étant estimée de 1:600 (8) à 1:1300 dans des population adulte (302).

2.1.1. Syndrome de chylomicronémie familiale

Le FCS est une maladie rare (1 à 3 par millions d'individus), caractérisée par une HTG sévère associée à au moins une des manifestations cliniques suivantes : xanthome éruptif, lipémie rétinienne, hépatomégalie, se compliquant de pancréatite aiguë hypertriglycéridémiques (7,303). Les symptômes apparaissent souvent dans la période néonatale ou dans l'enfance. Le FCS est de transmission autosomique récessive et résulte dans la majorité des cas de variants délétères bi-alléliques sur le gène *LPL* (7,8,304). Les autres cas résultent de variants délétères bi-alléliques de 4 autres gènes additionnels impliqués dans la fonctionnalité de la LPL : *APOC2*, *APOA5*, *LMF1* et *GPIHBP1* (7,76,99,301,305).

2.1.2. Syndrome de chylomicronémie multifactoriel

La prévalence de MCS est beaucoup plus élevée que celle de FCS (7,8). La plupart, des patients atteints de MCS présentent un cumul de variants associés à des augmentations des TG plasmatiques d'une part, et des facteurs secondaires d'HTG d'autre part (7,306,307). Ces variants peuvent être soit des variants délétères rares hétérozygotes ou des variants fréquents avec des effets modestes sur la concentration plasmatique en TG (8,98,170,308,309). A titre individuel, ces variants sont insuffisants pour entraîner un phénotype de chylomicronémie, mais leur association augmente le risque de la développer. Les facteurs d'HTG secondaire les plus fréquents sont l'obésité, le diabète de type 1 ou 2, une alimentation déséquilibrée et la consommation d'alcool (7,306). Il peut s'agir également de l'adjonction de certains médicaments spécifiques (5,310) : thérapie rétinoïde pour l'acné, l'œstrogénothérapie, les modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (en particulier raloxifène), les inhibiteurs de la protéase, la L-aspariginase.

De façon exceptionnelle, la présence d'auto-anticorps peut-être responsable d'HTG sévère : la plupart des descriptions concerne des auto-anticorps anti-LPL (311–315), mais plus récemment des autoanticorps anti-ApoC-II (316) et anti-GPIHBP1 (317,318) ont également été décrits.

Comparativement au FCS, les patients présentant un MCS ont tendance à se présenter plus tardivement (souvent après 50 ans), à avoir une concentration en TG plasmatiques moins élevées, des manifestations cliniques moins sévères et moins de complications et surtout des facteurs secondaires beaucoup plus prévalents (3,7).

2.1.3. Exploration génétique des hypertriglycériidémies sévères

L'exploration génétique est la référence pour l'exploration des HTG sévères et repose sur le séquençage complet des gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* et *LMF1* (7,75,300,301). Le séquençage du gène *APOE* doit y être ajouté pour exclure une décompensation transitoire d'une dysbetalipoprotéinémie (300).

La mise en évidence de variants délétères bi-alléliques confirme le diagnostic de FCS. Dans le cas où des variants différents sur le même gène sont identifiés, une enquête familiale ou une analyse par PCR de clonage est nécessaire pour confirmer le caractère composite de l'hétérozygotie (300). Le gène *LPL* est la première étiologie moléculaire, le reste se partage sur les 4 autres gènes avec des pourcentages variables en fonction des cohortes, probablement en raison la rareté de ces variants et du mode de recrutement des cohortes (10 à 67 patients) (Tableau 2) (76,99,301,304,319,320). La faible proportion des variants *LMF1* reste à confirmer puisque dans les études les plus anciennes, *LMF1* n'était pas étudié systématiquement. Il a également été décrit des patients doubles hétérozygotes avec des variants délétères sur deux gènes différents (301). Enfin, un nombre non négligeable de patients présentant un phénotype compatible avec un FCS ne présentent aucun variant délétère : de l'ordre d'un tiers, 22 à 33 % selon les études (7,99,301,304,319,321).

Gène	Prévalence approximative des homozygotes	Rôle du produit du gène dans la lipolyse	Caractéristique clinique	Proportion dans les FCS, % ¹
<i>LPL</i>	1 pour 1 million	Hydrolyse des triglycérides et capture périphérique	Chylomicronémie sévère dans l'enfance	50 à 78,8%
<i>APOC2</i>	< 20 familles décrites	Cofacteur de la LPL	Chylomicronémie sévère dans l'enfance ou l'adolescence	0 à 10%
<i>APOA5</i>	<10 familles décrites	Activateur/exhausteur de l'activité LPL	Chylomicronémie à l'âge adulte	3 à 7,7 %
<i>GPIHBP1</i>	<5 familles décrites	Stabilisateur LPL et plateforme lipolytique	Chylomicronémie à l'âge adulte	0 à 30%
<i>LMF1</i>	<5 familles décrites	Protéine chaperonne pour la LPL	Chylomicronémie à l'âge adulte	0 à 3%

Tableau 2. Gènes responsables de syndrome de chylomicronémie familial, adapté d'après Lewis *et al.* (322)

¹ Les fréquences relatives sont issues de cohortes de FCS publiées (76,99,301,304,319,320)

Les patients MCS pouvant présenter une combinaison de variants délétères hétérozygotes et/ou de variants fréquents associés à la concentration en TG, peu de données concernant la distribution de ces variants dans des cohortes sont disponibles dans la littérature. Néanmoins, 11 à 23 % des patients présentent au moins un variant délétère hétérozygote dans les gènes précités (99,323,324). Dans la cohorte décrite par Surendran *et al.*, 37 % des patients présentaient seulement un ou plusieurs variants fréquents associés à la concentration en TG et 40% ne présentaient aucun variant dans les gènes étudiés (99).

Ainsi, la frontière entre les patients FCS et MCS est floue, avec une charge génétique qui augmente progressivement du MCS, où elle peut être minimale, au FCS, où elle est maximale chez les porteurs de variants *LPL* homozygotes. Moulin *et al.* ont proposé une représentation graphique de ce spectre continu de la charge génétique dans les HTG sévères (299).

2.1.4. Exploration phénotypique des hypertriglycéridémies sévères

2.1.4.1. Concentration et activité LPL

La LPL et sa régulation ont une place centrale dans le métabolisme des LRTG et donc dans la physiopathologie des HTG sévères. Par conséquent, l'évaluation de la fonctionnalité de la LPL reste primordiale dans l'exploration phénotypique des HTG afin de décrypter les mécanismes complexes impliqués. L'évaluation *ex vivo* de la lipolyse des TG dépendante de l'activité LPL est difficile à quantifier. Un dosage direct de l'activité catalytique de l'enzyme est nécessaire, avec neutralisation simultanée de l'activité des autres lipases plasmatiques. La détermination de l'activité de l'enzyme est préférable à la détermination de la concentration de la protéine, étant donné la présence de formes inactives (325). En outre, l'expression du gène *LPL* est peu informative en raison de régulations post-transcriptionnelles majeures (326).

L'essentiel de la LPL est lié à l'endothélium vasculaire, une injection d'héparine (10-50 UI/kg) est donc nécessaire pour libérer la LPL des HSPG de la paroi vasculaire et ainsi pouvoir mesurer son activité sur des prélèvements de sang périphérique. Le pic d'activité est mesuré 10 à 15 minutes après l'injection d'héparine (75,327-329). Certaines études utilisent également l'activité pré-héparinique, cependant, celle-ci est 20 à 100 fois plus faible que l'activité post-héparinique, posant le problème de la sensibilité des techniques (330). L'injection d'héparine entraîne un relargage de la LPL, mais aussi de la lipase hépatique. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des techniques permettant de mesurer sélectivement ces deux lipases (75,331).

Malgré des décennies d'utilisation et d'amélioration technique, la détermination de l'activité LPL est délicate et reste peu répandue dans les laboratoires. Les méthodes utilisant des émulsions de TG commerciaux comme substrat ont été mises en difficulté par : 1/ une concentration en acides gras libres pouvant être élevée à l'état basal chez les patients présentant une HTG sévère ; 2/ par un manque de spécificité due à la présence de mono et diglycérides (327,332). Publiée par Nilsson-Ehle *et al.* en 1972, l'utilisation d'un substrat trioléine avec incorporation de traceurs radioactifs (^3H), émulsionné par ultrasons dans des conditions strictement contrôlées, fut une amélioration majeure (333). Cependant, ces essais étaient chronophages et

nécessitaient d'être réalisés en triple pour diminuer l'erreur intra-essai avec une variabilité majeure selon le lot d'émulsion (325,334). La plupart des méthodes actuelles utilisent des substrats radiomarqués (^3H ou ^{14}C) et ne peuvent pas être automatisées. Certains chromophores (335,336) ou substrats fluorescents (337) ont été utilisés, cependant la préparation de ces substrats est délicate, les dérivés instables et ces techniques peuvent manquer de sensibilité. Basu *et al.* ont utilisé un substrat fluorescent commercialisé (EnzChek®), estérifié par BODIPY-C12 sur la position 1 du glycérol, stable et solubilisé avec un détergent spécifique (Zwittergent®). Malheureusement, cette méthode n'a pas été testée pour l'activité post-héparinique plasmatique chez l'homme (325). Plus récemment, notre équipe a publié une méthode utilisant comme substrat un pool de VLDL humaines permettant de s'affranchir de l'utilisation d'émulsion avec traceurs radioactifs (149). Cette méthode présente des performances analytiques satisfaisantes notamment en termes de reproductibilité (fidélité intermédiaire CV $\approx$ 7%) et de spécificité (aucun variant délétère bi-allélique n'a été trouvé chez les patients présentant une activité supérieure au seuil de 10 $\mu\text{mol/L/min}$).

S'appuyant sur l'association de la LPL aux lipoprotéines dans la circulation (338–340), Pruneta *et al.* ont décrit une nouvelle technique d'évaluation de l'activité LPL ne nécessitant pas d'injection d'héparine, déterminant directement l'hydrolyse des TG des VLDL par la LPL liée aux VLDL (*VLDL-bound LPL-dependent VLDL-TG hydrolysis*, LVTH) (331,341). Cette étude a montré que l'activité LVTH présentait une relation inverse avec la concentration plasmatique en TG ainsi qu'une corrélation positive avec l'activité lipolytique post-héparinique et avec le catabolisme des VLDL marquées par un isotope stable. Malgré les avantages présentés par cette technique, aucune étude récente n'a réutilisé cette méthode, probablement pour des difficultés de reproductibilité de la technique (données non publiées), liées aux conditions draconiennes de réalisation de la FPLC et des difficultés techniques liées à la concentration des échantillons.

La détermination de la concentration LPL utilise des techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Les premières techniques publiées étaient des ELISA sandwich « maison » (342–344). Les premiers antigènes utilisés pour le développement des anticorps furent des protéines natives, provenant de plasma post-héparinique, du lait, de tissu cardiaque ou adipeux de différentes espèces. La production d'anticorps

était très laborieuse, notamment pour obtenir une quantité suffisante d'antigène. De plus, comme les épitopes reconnus par ces anticorps n'étaient pas caractérisés, la spécificité des techniques n'était pas toujours optimale (338,342,345). Dans les années 1990, plusieurs équipes ont travaillé à l'amélioration des performances analytiques de ces techniques, soit par amélioration des anticorps utilisés comme Kawamura *et al.* (346), soit par simplification des procédures techniques et amélioration de la fiabilité (347). A ce jour, plusieurs kits commerciaux ELISA sont disponibles pour la détermination de la concentration de LPL (CUSABIO, Houston, TX, USA ; ALPCO, Salem, NH, USA ; CellBiolabs, San Diego, CA, USA).

La détermination de la concentration sérique en LPL a été étudiée chez les patients FCS dès l'apparition d'ELISA suffisamment sensible pour détecter des concentrations pré-hépariniques (348,349). Auwerx *et al* ont étudié 23 patients FCS présentant une nette diminution de l'activité LPL : chez seulement 11 d'entre eux la concentration pré-héparinique était indosable ou très faible, permettant de diagnostiquer un déficit en LPL sans injection d'héparine (348). Ainsi, une concentration de LPL masse dans les valeurs de référence ne permet pas d'exclure un déficit en LPL consécutif à un variant faux-sens. L'étude de Kern *et al.* montre une faible différence de concentration entre les patients FCS et les sujets témoins (3,8 – 8,3 ng/mL versus 8-25 ng/mL) (349). Ces limites expliquent probablement que la détermination de la concentration pré-héparinique en LPL ne soit pas utilisée en diagnostic de routine ou dans les études récentes de description de cohorte (301), bien qu'elle puisse offrir une première orientation dans les cas de contre-indication à l'héparine, notamment lors de diagnostic pédiatrique ou chez la femme enceinte.

2.1.4.2. Détection d'auto-anticorps

Actuellement, la détection d'auto-anticorps anti-LPL fait appel à des techniques « maison ». La plus utilisée est le Western blot, réalisé à l'aide de LPL purifiée à partir de plasma post-héparinique ou de LPL bovine (312,315,350). Il est également possible de détecter les immunoglobuline G anti-LPL par technique ELISA, cependant une confirmation par Western blot est nécessaire en cas de positivité (313).

Les auto-anticorps anti GPIHBP1 et ApoC-II ont été décrits chacun par une seule équipe (316–318). A l'heure actuelle, le développement de ces techniques n'a pas été reproduit par d'autres équipes en raison de la difficulté de mise au point de ces techniques et de la rareté des cas.

2.1.4.3. Dosages des protéines régulatrices

Seul le dosage des apolipoprotéines C est facilement disponible pour l'exploration phénotypique des HTG puisqu'il existe des kits de dosage par immunoturbidimétrie adaptables sur analyseur multiparamétrique de biochimie (351,352). L'ApoC-II est indosable dans la majorité des cas de déficits familiaux en ApoC-II. Cependant, il existe un certain nombre de cas atypiques de déficit en ApoC-II présentant une concentration d'ApoC-II circulant nettement réduite, mais détectable (75,169). D'autre part, certaines études ont décrit une diminution du ratio ApoC-II/ApoC-III associée à une augmentation des TG-VLDL et ont proposé qu'elle contribuait à une diminution de l'activité de la LPL (353,354).

Concernant les autres protéines régulatrices, des kits ELISA ont été développés pour la majorité de ces protéines (LMF1, GPIHBP1, ANGPTL3 et 4, ApoA-V), mais leur intérêt en diagnostic clinique reste à évaluer (355–358).

2.2. Hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie familiale (OMIM 143890 et 107730) est classiquement décrite par une augmentation de la concentration du LDL-c, une transmission mendélienne et des antécédents familiaux cardiovasculaires cependant les critères peuvent varier selon les recommandations (359,360). Deux scores cliniques sont classiquement utilisés pour évoquer le diagnostic d'hypercholestérolémie familiale, le score du réseau de la *Dutch lipid clinic* (*Dutch Lipid Clinic Network Criteria*, DLCN) (361) et celui du registre Simon Broome (362). En ce qui concerne les recommandations françaises, la Nouvelle société française d'athérosclérose recommande l'association des

critères suivants, en l'absence de cause secondaire (cholestase, syndrome néphrotique, insuffisance rénale, anorexie mentale, hypothyroïdie...) pour évoquer le diagnostic d'hypercholestérolémie familiale (363) :

- une concentration en LDL-c > 4,9 mmol/L chez l'adulte ou 4,1 mmol/L chez l'enfant
- contexte de transmission autosomique dominante
- maladies cardiovasculaires précoces et/ou présence de dépôts extravasculaires de cholestérol, en particulier de xanthomes tendineux.

L'hypercholestérolémie familiale est la plus fréquente des dyslipidémies monogéniques, avec une prévalence classiquement décrite de 1 pour 500 individus. Cependant cette prévalence est à nuancer en fonction des critères diagnostiques utilisés et des régions géographiques (359,360). En effet, des études pays-spécifiques utilisant des critères standardisés ont rapporté des prévalences allant de 1 pour 219 à 1 pour 300 (364–367).

La majorité des hypercholestérolémies familiales monogéniques (60-80%) est liée à la présence de variants sur le gène *LDLR* (359,360), avec plus de 118 grands réarrangements et 1589 variants ponctuels décrits dans la base de données de l'université de Londres (<https://www.LOVD.nl/LDLR>) (368). Ces mutations peuvent affecter toutes les étapes de l'endocytose des LDL médiée par ce récepteur et peuvent être classées en deux catégories : celles entraînant l'absence de synthèse de protéine ou la synthèse d'une protéine complètement non fonctionnelle et celles entraînant la synthèse d'une protéine défectueuse. Ensuite, des variants délétères situés dans les régions du gène *APOB* codant pour le domaine de liaison aux LDLR sont également responsables d'hypercholestérolémie familiale chez 5 à 10% des patients, avec notamment une mutation récurrente (c.10580G>A, p.Arg3527Gln) (369,370). En effet, l'ApoB est la protéine structurelle des LDL et est essentielle à leur liaison au LDLR. Dans de rares cas ($\approx$ 1%), des variants gain de fonction *PCSK9*, impliqué dans la dégradation du LDLR, ont été retrouvés chez des patients présentant une hypercholestérolémie familiale (370,371). Pour ces trois gènes, la transmission est dite autosomique co-dominante, la présence d'un variant entraînant une hypercholestérolémie correspondant aux critères définis ci-dessus (« hypercholestérolémie familiale

hétérozygote »), et la présence de variants homozygotes ou hétérozygotes composites entraîne un phénotype plus sévère (« hypercholestérolémie familiale homozygote »). Dans tout les cas, la conséquence de ces variants est une absence ou une diminution de la recapture des LDL conduisant à leur accumulation dans la circulation et au phénotype d'hypercholestérolémie.

Il existe également des étiologies moléculaires beaucoup plus rares. Des variants rares hétérozygotes ont été mis en évidence dans les gènes *APOE* (202,372) et *STAP1* (373) de façon rarissime chez des patients présentant une hypercholestérolémie. Il existe également un mode de transmission récessive dans certains cas. La présence de variants rares homozygotes ou hétérozygotes composites sur le gène *LDLRAP1* (codant pour la protéine LDLR adaptator 1, liant le LDLR lors de l'internalisation des puits de clathrine) entraîne une hypercholestérolémie sévère, appelée hypercholestérolémie autosomique récessive (*Autosomal recessive hypercholesterolemia*, ARH ; OMIM 603813) (374). La présence de variants bialléliques pour les gènes *ABCG5*, *ABCG8* et *LIPA*, responsables respectivement de sitostérolémies (OMIM 210250) et de déficit en lipase acide lysosomale (OMIM 278000), peuvent également être identifiés chez des patients présentant un phénotype compatible avec une hypercholestérolémie familiale (375,376).

2.3. Hypobetalipoprotéïnémie

Les hypobetalipoprotéïnémies primitives sont caractérisées par une concentration en LDL-c et en ApoB inférieure au 5^{ème} percentile en fonction de l'âge et du sexe, en l'absence de causes secondaires (insuffisance hépatique, dénutrition, hyperthyroïdie, inflammation...). Les formes les plus fréquentes sont les formes monogéniques de transmission autosomique codominante, qui seront détaillées dans ce chapitre. Cependant, il existe également des formes rares de transmission récessive : l'abetalipoprotéïnémie (OMIM#200100) et la maladie de rétention des chylomicrons (OMIM#246700) (377).

L'hypobetalipoprotéïnémie FHBL1 (OMIM#615558) familiale est une maladie de transmission autosomique codominante liée à la présence de variants rares délétères du

gène *APOB*. Plus d'une centaine de variants ont été décrits, la plupart sont des variants non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture, mais certains variants faux-sens sont également responsables d'hypobetalipoprotéinémie (378–380). Les formes tronquées d'ApoB sont produites en moins grande quantité que l'ApoB-100 et sont moins lipidées (381). La forme hétérozygote est la plus fréquente avec une prévalence de 1 pour 500 à 1 pour 1000 en population générale (377,382). Sa découverte est le plus souvent fortuite, à l'occasion d'un bilan lipidique systématique. En effet, les patients sont le plus souvent asymptomatiques, cependant certains patients présentent une stéatose hépatique, pouvant évoluer vers une fibrose hépatique et *in fine* une cirrhose (383,384). La forme homozygote est extrêmement rare, avec un phénotype sévère pouvant être similaire à l'abétalipoprotéinémie et une atteinte hépatique systématique (377,385).

L'hypobetalipoprotéinémie FHBL 2 (OMIM#605019) est causée par des variants délétères sur le gène *ANGPTL3*. La transmission du phénotype est complexe puisqu'elle est autosomique co-dominante pour le LDL-c et la triglycérémie mais récessive pour le HDL-c, qui est donc abaissé uniquement chez les patients présentant une forme homozygote ou hétérozygote composite. La perte de fonction d'*ANGPTL3* induirait une augmentation de la lipolyse, une accélération de la clairance des lipoprotéines et donc une diminution de leur concentration circulante (voir paragraphe 1.2.2.8.1). Une cinquantaine de variants délétères ont été mis en évidence chez au total 93 hétérozygotes et 22 homozygotes/hétérozygotes composites (222,386). Les patients publiés sont asymptomatiques et ont été diagnostiqués de façon fortuite ou par étude familiale.

Des variants rares perte de fonction de *PCSK9* peuvent également être responsables d'hypobetalipoprotéinémie (387,388). Dans ce cas, le nombre de LDLR à la surface cellulaire est augmenté, entraînant une réduction de la concentration circulante du LDL-c. Ces variants ont été initialement trouvés dans une population de patients présentant une diminution du LDL-c (Dallas Heart Study) et ont été mis en évidence chez 2% des individus d'origine africaine américaine et moins de 0,1% d'individus d'origine européenne (387). Une quarantaine de variants ou de mutations associées à une hypocholestérolémie a été décrite. Deux patients homozygotes ou hétérozygotes

composites asymptomatiques ont été décrits avec une concentration en LDL-c proche de 0,4 mmol/L (389).

3. OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE POUR LES EXPLORATIONS DES DYSLIPIDEMIES

3.1.1. Séquençage direct

Le séquençage direct de l'ADN est la méthode actuelle de référence pour la mise en évidence de variations ponctuelles. Cette méthode a initialement été développée par Frederick Sanger en 1977 (390) et est basée sur l'interruption de l'élongation du brin d'ADN complémentaire (arrêt de la synthèse enzymatique du brin d'ADN). Techniquement, après une PCR (*polymerase chain reaction*) d'amplification de la région d'intérêt et une étape de purification, l'amplicon à séquencer est incubé avec une courte amorce oligonucléotidique servant de point de départ pour la synthèse du nouveau brin, une ADN polymérase, des désoxynucléotides classiques (dNTP) et des didésoxynucléotides (ddNTP) en concentration plus faible. L'incorporation de ces ddNTP dans le brin en cours de synthèse sera responsable d'un arrêt de l'élongation due à l'absence de groupement OH en 3' du désoxyribose. Ainsi, la longueur des fragments obtenus sera fonction du point d'insertion du ddNTP et la séparation de ces fragments par migration dans un gel d'acrylamide permettra la lecture de la séquence du gène.

En 1986, une évolution de cette méthode est développée (391). Elle consiste à marquer les ddNTP par un fluorophore spécifique. Ainsi, les différents fragments d'ADN produits portent en 3' ce fluorophore, dont la longueur d'onde d'émission est spécifique du ddNTP incorporé. Cette évolution a permis l'automatisation du séquençage par séparation des fragments par électrophorèse capillaire. On obtient alors un fluorogramme qui peut être aligné contre la séquence de référence par un logiciel d'alignement pour permettre la mise en évidence des variants.

Cette technique, toujours considérée comme la technique de référence pour la détection des variations ponctuelles, est uniquement qualitative. Le produit de PCR n'est pas quantifié : il n'est donc pas possible de détecter si les deux allèles ont été amplifiés.

Cela conduit à de faux négatifs soit en cas de délétion hétérozygote incluant au moins un des deux sites de fixation des amorces (grands réarrangements par exemple), soit en cas de variations ponctuelles empêchant la fixation d'au moins une des deux amorces. Dans les deux cas, un seul brin est amplifié sans que cela soit détectable. Enfin, cette technique devient rapidement fastidieuse pour étudier des gènes ou des régions de grande taille, et son utilisation est donc limitée à des études ciblées majoritairement.

3.1.2. Recherche de grands réarrangements et de variations du nombre de copies (CNV)

La technique de MLPA® (pour Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) est une méthode commerciale permettant la mise en évidence de grands réarrangements tels que les délétions ou duplications. Le principe est fondé sur celui de la PCR multiplex et utilise une sonde divisée en deux oligonucléotides et nécessitant la ligation de ces deux parties pour que l'amplification ait lieu. Un kit est disponible seulement pour certains gènes, par exemple *LDLR* pour les hypercholestérolémies et *LPL* pour les HTG sévères (MLPA MRC –Holland, Amsterdam, Pays-Bas).

D'autres techniques sont utilisables telles que les PCR quantitatives, les PCR long-range ou des techniques de micro-array (117,121,392). Cependant, ces techniques sont fastidieuses car elles demandent une mise au point lourde dans la majorité des cas, et de surcroît les techniques de PCR sont spécifiques d'un réarrangement. Pour ces raisons, elles ne sont souvent utilisées qu'en deuxième intention et réservées à certains cas particuliers.

3.1.3. Le séquençage haut débit

Depuis 2006, l'émergence de nouvelles techniques dites « à haut débit » ou de « nouvelle génération » (avec l'acronyme NGS pour « *next generation sequencing* ») a révolutionné le séquençage des génomes en permettant un séquençage rapide, de plusieurs gènes à la fois, de l'ensemble des régions codantes d'un individu (exome), voire de l'ensemble de son génome. Le développement de ces méthodes de séquençage a été rendu possible par :

- la génération d'algorithmes bioinformatiques puissants pour la conversion des signaux en séquences et l'alignement des fragments de séquences contre un génome de référence
- la maîtrise de techniques microfluidiques
- le développement de techniques d'amplification clonale (comme la PCR en émulsion par exemple) permettant d'obtenir des données provenant d'un seul brin d'ADN (origine clonale des signaux).

3.1.3.1. Protocole général du séquençage haut-débit

Plusieurs stratégies de séquençage haut débit sont actuellement disponibles sur le marché permettant le séquençage de plusieurs mégabases (Mb) (voire d'1 gigabase) en des temps relativement courts. Bien que différentes, ces stratégies partagent un protocole « général » partagé en 4 étapes clés (393).

La préparation de la librairie. L'ensemble des technologies de séquençage haut-débit requiert la préparation d'une collection de fragments d'ADN qui, mis bout à bout, recouvrent la totalité des séquences d'ADN à séquencer. Cette collection est appelée « librairie », « bibliothèque » ou encore « banque ». La première étape repose sur la fragmentation du génome afin d'obtenir des fragments d'ADN de taille très proches, et spécifiques de la plateforme considérée (394). D'autre part, les fragments d'ADN composant cette librairie doivent acquérir des caractéristiques, notamment à leurs extrémités 5' et 3', et pour cela seront fixés aux extrémités de chacun des fragments :

- des « codes-barres » ou « barcodes ». Ce sont de courtes séquences (20 nucléotides environ) permettant lors de l'étape bioinformatique d'analyse des données, de réattribuer chacun des fragments au patient source.
- des adaptateurs (*adapters* en anglais). Ces séquences oligonucléotidiques uniques (non retrouvées dans le génomes) et communes à tous les fragments permettent l'amplification clonale et le séquençage en utilisant des amorces universelles et non dépendantes de l'ADN à séquencer (395).

Enfin, l'étape finale consiste en une purification des librairies afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN génomique, amorces, nucléotides ou enzymes pouvant subsister dans les échantillons.

Amplification clonale. Une amplification des bibliothèques est nécessaire pour obtenir un signal détectable par les séquenceurs (394). On parle « d'amplification clonale » puisque, à partir d'un fragment d'ADN unique, vont être générées un très grand nombre de copies identiques de ce même fragment d'origine (396). Les copies de ce même fragment sont alors immobilisées sur un support qui est spécifique de chacune des plateformes.

Séquençage. Après l'amplification clonale, chacun des fragments va subir, en même temps, la réaction de séquençage. Le signal détecté par l'appareil sera donc la somme des signaux émis par chacun des fragments lors de l'incorporation d'un nucléotide. A la différence du séquençage classique basé sur la méthode de Sanger et sur l'électrophorèse capillaire, l'étape de séquençage est ici basée sur la mise en œuvre de cycles pendant lesquels les nucléotides sont ajoutés un à un en alternance avec une étape de lavage (394).

Cette technique permet de quantifier pour chaque position le nombre de lecture pour chaque base (Adénine, A ; Cytosine, C ; Guanine, G ; Thymine, T). Par exemple, il est possible de savoir, à une position donnée, que pour 211 lectures totales, la répartition est la suivante : A=0, C=105, G=106, T=0.

3.1.3.2. Les principales technologies de séquençage haut-débit ou NGS (Next Generation Sequencing)

3.1.3.2.1. La technologie IonTorrent™ de Life technologies

La stratégie Life technologies repose sur l'association de la préparation de la bibliothèque par technologie Ampliseq™, une amplification clonale par PCR en émulsion (Ion OneTouch™) et une technique originale de séquençage basée sur la détection d'un signal électrique généré par une variation de pH (Personal Genome machine, PGM).

La technologie Ampliseq™ est basée sur la PCR multiplex (plusieurs PCR simultanées) grâce à un mélange de nombreux couples d'amorces ciblant les régions d'intérêts. La particularité de ces amorces est d'être digérable, et ainsi de récupérer des amplicons dépourvus de ces amorces, qui seront remplacées par des adaptateurs et des

codes-barres. A la fin de ces étapes, une librairie Ampliseq™ est donc constituée d'un ensemble d'amplicons, bornés à leurs extrémités par les adaptateurs et codes-barres nécessaires aux étapes d'amplification clonales et de séquençage, et représentatifs de l'ensemble des régions d'intérêt à séquencer.

L'amplification clonale des librairies est réalisée par PCR en émulsion grâce à l'automate One Touch™. La PCR est réalisée dans une émulsion huile dans eau (H/E) (397). Les adaptateurs s'hybrident à des fragments fixés sur une bille (*Ion sphere particule*, ISP). Le modèle idéal correspond au cas où chaque goutte d'huile contient une bille et un seul fragment d'ADN : cette amplification est donc dite clonale. A chaque cycle d'amplification, le nouveau brin d'ADN polymérisé se fixe à un autre fragment de la bille. Cette étape est suivie d'un enrichissement, c'est-à-dire une sélection des billes à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié.

Les billes, servant de matrice de séquençage, sont chargées sur des puces de séquençage contenant des millions de puits, chacun permettant de recevoir une bille et de détecter la variation de pH induite par l'incorporation d'un nucléotide par variation du signal électrique (398). Par conséquent, chaque puits correspond à la détermination d'une séquence, permettant ainsi l'obtention de millions de séquences. La libération d'un proton H⁺ n'étant pas spécifique, les dNTP sont ajoutés les uns après les autres (on parle de « *flows* »), séparés par une étape de lavage entre chacun d'eux et dans un ordre consensuel. La succession de base constitue une séquence, ou une lecture, qui sera par la suite alignée contre le génome de référence et comparée à celui-ci.

3.1.3.2.2. La technologie Illumina®

La technologie Illumina® est disponible sur un large panel de séquenceurs de débit différents (MiniSeq, MiSeq, NextSeq NovaSeq et HiSeq) et repose sur deux principes technologiques originaux : l'amplification clonale par « bridge PCR » et le séquençage par terminaison cyclique et réversible (Cyclic reversible termination, CRT).

Pour la préparation des librairies, l'ADN génomique va être fragmenté mécaniquement ou enzymatiquement. La fragmentation est suivie d'une étape de « *End-*

Repair » pour homogénéiser les fragments, puis de l'ajout d'un A en 5' pour permettre la fixation des adaptateurs (« *A-tailing* »). Les adaptateurs sont ligués aux extrémités des fragments d'ADN. Les adaptateurs peuvent contenir des séquences « codes-barres ». C'est donc après cette étape que les échantillons peuvent être multiplexés. Après dénaturation, les fragments sont hybridés et capturés par des sondes spécifiques de la région d'intérêt d'environ 70 nucléotides. Leur taille permet de tolérer des « *mismatch* » avec la région à laquelle elles doivent s'hybrider. Elles sont marquées par de la biotine, permettant leur capture par des billes marquées à la streptavidine. Les fragments non hybridés sont éliminés et les séquences cibles sont récupérées et nettoyées des sondes pour constituer une librairie enrichie en séquences d'intérêt.

L'amplification clonale est donc réalisée par « *bridge PCR* » : l'ADN est dénaturé puis chaque brin est immobilisé en se fixant, via l'adaptateur, à une amorce, elle-même fixée sur un support solide (la « *flowcell* ») (394). Le brin complémentaire est synthétisé puis ce nouvel ADN double-brin est dénaturé. Chaque brin fixé forme alors un pont en s'hybridant localement avec l'amorce complémentaire de l'autre extrémité. Le brin complémentaire est synthétisé. L'opération est répétée un grand nombre de fois: il y a formation d'amas ("*cluster*") du même fragment d'ADN.

Le séquençage par terminaison cyclique et réversible repose sur l'utilisation de dNTP modifiés, à la fois par l'ajout d'un fluorophore et par l'ajout d'un groupement chimique bloquant temporairement l'élongation (3'-O-azidomethyl 2'-deoxynucleoside triphosphates) (399,400). De plus, chaque base (A, T, C ou G) est caractérisée par un fluorophore qui lui est propre. Ensuite, chacun des nucléotides modifiés est incorporé séquentiellement et l'ajout des 4 nucléotides correspond à un cycle de séquençage et dure environ 5 minutes. Après chaque cycle d'incorporation, l'identité de la base insérée est déterminée par excitation du fluorophore par un laser et lecture de la fluorescence émise. Après lecture, le groupement responsable de la fluorescence et de l'arrêt de l'élongation est hydrolysé par ajout d'un dérivé de la phosphine. Cette étape permet la régénération d'un groupe 3'-hydroxyl permettant la reprise de l'élongation et l'incorporation d'un nouveau nucléotide lors du prochain cycle de séquençage (399). Le séquençage est réalisé en « *paired-end* » c'est-à-dire qu'un fragment est séquencé dans les deux sens : dans l'un, puis grâce à la réalisation d'un pont comme pour l'amplification

clonale, dans l'autre, soit par pair. La séquence de chacun des fragments est déterminée par la succession des fluorescences obtenues à la suite des différents cycles, les différents « *clusters* » étant repérés par leurs coordonnées géographiques sur la lame de verre.

Plusieurs études se sont attachées à comparer ces deux technologies, les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Critère	Illumina®	Ion Torrent™
Amplification clonale	Bridge PCR	PCR en émulsion
Séquençage	Terminaison réversible de l'élongation	Variation de pH
Durée du séquençage	11 – 29h	3h + 6h d'amplification clonale
Longueur des lectures	2 x 75 pb 2 x 150 pb	200 pb 400 pb
Moyenne de la longueur des lectures	Non testé (140pb pour le MiSeq)	170 pb
Multiplexage des patients	Jusqu'à 96	Jusqu'à 96
Nombre de bases séquencées	15 Gb (selon la configuration de la Flow Cell)	30 Mb à 1,2 Gb (selon la puce utilisée)
Nombre de lectures	10 à 40 000 000	400 000 à 5 000 000
Taux d'erreurs	Non Testé (0,32% pour le MiSeq)	1,71 %
Type principal d'erreurs	Substitution	Homopolymères
Coût / Mb (USD)	0,5 \$ pour le MiSeq	1 – 22 \$ selon la puce utilisée

Tableau 3. Comparaison des deux principales technologies de séquençage de 2^{ème} génération.

3.1.3.3. Traitement des données : outils bio-informatiques

La génération d'une quantité importante de données par le séquençage haut débit nécessite le développement en parallèle d'outils bio-informatiques permettant le traitement de ces données. Le « pipeline » bio-informatique, dont la traduction littérale est canalisation, correspond à l'ensemble des étapes permettant le traitement des données brutes pour arriver à la détection d'altérations génomiques. Il s'agit de transformer une mesure, un signal issu du séquenceur, en séquences alignées sur un génome de référence et qui par comparaison à celui-ci permet l'identification de variations, ou variants. Ceux-ci sont ensuite commentés ou annotés pour aider à leur interprétation et leur tri. Le pipeline bio-informatique peut être divisé en quatre étapes principales:

- L'appel des bases ou « *base-calling* »
- L'alignement au génome de référence
- L'appel ou l'identification des variants par comparaison au génome de référence
- L'annotation des variants et leur filtre

De plus, le nombre de lectures à chaque position étant connu, il peut être comparé entre les patients et permettre la détection de CNV. A l'heure actuelle, l'identification de CNV sur les données de NGS a été réalisée avec succès dans plusieurs champs d'application (401,402) mais il existe peu de publications identifiant des CNV dans le diagnostic moléculaire des dyslipidémies (403,404).

Cette étape critique nécessite des compétences statistiques et informatiques pointues : elle est en général réalisée par des organismes dédiés internes (telle que le Service de Biostatistiques des Hospices Civils de Lyon) ou externes (telle que la société SOPHiA GENETICS™).

3.1.3.4. Avantages et inconvénients des stratégies de séquençage haut débit

Les stratégies de séquençage haut débit, quelque soit la technologie utilisée, permettent à la fois :

- Une analyse qualitative, permettant la détection de variants ponctuels de façon équivalente au séquençage Sanger.
- Une analyse quantitative du nombre de lecture des bases permettant de détecter les CNV, contrairement au séquençage Sanger.

De plus, l'utilisation de fragments d'ADN n'excédant pas 150 paires de bases environ, mais chevauchants, permet de limiter le risque de faux négatifs liés à la présence de variants sur les régions d'hybridation des amorces. L'augmentation des capacités de séquençage permet d'envisager des stratégies avec des panels contenant un plus grand nombre de gènes, incluant ceux permettant un diagnostic différentiel ou ceux d'implication nouvelle en pathologies. Ces avantages permettent d'espérer une amélioration du diagnostic moléculaire des dyslipidémies dans un futur proche. Cependant, ces stratégies génèrent un grand nombre de données complexifiant l'interprétation.

4. ENJEUX DU TRAVAIL

Le travail de notre laboratoire s'inscrit dans une volonté d'améliorer la compréhension des dyslipidémies. La collaboration clinico-biologique permet la constitution de cohorte de patients et de conduire une recherche translationnelle efficace. En effet, ces cohortes permettent d'étudier l'impact de variants génétiques rares sur l'organisme humain (effets métaboliques, conséquences athéromateuses) et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, l'étude des patients présentant des phénotypes opposés permet d'anticiper les effets à long terme des traitements ciblant des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides. Les travaux présentés s'intéressent spécifiquement au métabolisme des LTRG.

Comme évoqué précédemment, d'après une étude récente sur 377 patients présentant une HTG > 10 mmol/L, seulement 20,2% des patients présentent un ou plusieurs variants rares délétères sur les gènes *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1* et *LMF1* et environ 29,4% présentent une accumulation de variants communs (321). De cette simple observation nous avons développé deux axes de travail.

Premièrement, aucune cause génétique connue n'est identifiée chez 50,4% des patients : il est donc nécessaire d'y associer une exploration phénotypique pour caractériser précisément les patients et les classer, afin de différencier des mécanismes physiopathologiques au sein de l'ensemble hétérogène que constituent les HTG sévères, et éventuellement d'identifier de nouveaux acteurs du métabolisme des LTRG. En 2014, notre équipe a publié une nouvelle méthode de détermination de l'activité LPL (149). Cette approche, utilisant un substrat composé de VLDL humaines, a montré des performances analytiques satisfaisantes, cependant seulement 11 patients sur 71 présentant une HTG sévère, présentaient une diminution sévère de l'activité LPL 10 minutes après l'injection d'héparine. Ces observations nous ont motivés pour évaluer la détermination de l'activité LPL sur des temps post-hépariniques plus tardifs à la recherche d'altérations plus subtiles de la lipolyse médiée par la LPL.

Deuxièmement, le caractère oligogénique des dyslipidémies joue un rôle majeur notamment dans les HTG sévères, puisqu'il permet d'expliquer un tiers des cas.

L'importance des interactions gène-gène est également soulignée par la variabilité des phénotypes observés parfois au sein d'une même famille. D'autre part, la description de l'implication de grands réarrangements n'a cessé de progresser. Il nous est apparu nécessaire de développer un outil de diagnostic moléculaire performant afin d'explorer simultanément les principaux gènes impliqués dans les dyslipidémies d'une part et de permettre facilement la détection des grands réarrangements d'autre part, contrairement aux stratégies antérieures. L'évolutivité des techniques de séquençage nous a conduits à développer une stratégie de séquençage de nouvelle génération (NGS) permettant de détecter rapidement et simultanément des variants sur les neuf gènes principaux impliqués dans les dyslipidémies : *ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*. Grâce à cette approche, nous souhaitons à la fois répondre aux prérequis du diagnostic moléculaire de routine mais aussi améliorer la compréhension des variabilités phénotypiques et des interactions gène-gène dans le développement des dyslipidémies.

DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DES TRAVAUX

1. ARTICLE 1

Alterations in plasma triglycerides lipolysis in patients with history of multifactorial chylomicronemia.

Marmontel O, Di Filippo M, Marcais C, Nony S, Dumoux M, Serveaux-Dancer M, Caussy C, Charrière S, Moulin P. *Atherosclerosis*. 2017 Jul 29;265:22-28. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.030

Pour cette étude, nous nous sommes concentrés sur la forme oligogénique des HTG sévères, le syndrome de chylomicronémie multifactorielle (Multifactorial chylomicronemia syndrome, MCS, OMIM #144650) (5,6) (voir paragraphe 2.1.2 de la partie bibliographique). L'hétérogénéité phénotypique et les mécanismes physiopathologiques de cette entité restent imparfaitement identifiés et compris. Pour améliorer nos connaissances et la caractérisation de ces patients, nous avons déterminé la concentration pré-héparinique en LPL et l'activité post-héparinique jusqu'à 60 minutes après l'injection d'héparine chez 62 patients MCS. Nous avons également suivi les remaniements des lipoprotéines par électrophorèse. Ces patients avaient au préalable bénéficié d'un diagnostic moléculaire et aucun ne présentait de variants délétères bi-alléliques pour les gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1* et *APOE*. Ce travail nous a permis de mettre en évidence deux sous-groupes chez ces patients : un groupe de patients présentant un défaut de lipolysabilité et/ou de clairance hépatique des LRTG, et un deuxième groupe de patients présentant un probable défaut de disponibilité de la LPL.

Ce travail, ainsi que ses phases préliminaires, a également fait l'objet de posters commentés lors de congrès internationaux et d'un poster affiché lors d'un congrès national (Annexe 2 et Annexe 3).



Alterations in plasma triglycerides lipolysis in patients with history of multifactorial chylomicronemia



Oriane Marmontel^{a, b, *}, Mathilde Di Filippo^{a, b}, Christophe Marçais^{a, c, e}, Séverine Nony^a,
Marjorie Dumoux^a, Marine Serveaux-Dancer^b, Cyrielle Caussy^{b, d}, Sybil Charrière^{b, d},
Philippe Moulin^{b, d}

^a Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, GHE, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Bron Cedex, France

^b Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, F-69100, Villeurbanne, France

^c Centre de Biologie Sud, Laboratoire de Biochimie Moléculaire et Métabolique, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, F-69310, Pierre-Bénite, France

^d Fédération d'endocrinologie, Maladies Métaboliques, Diabète et Nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Bron Cedex, France

^e CENS, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, F-69921, Oullins Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2017

Received in revised form

18 July 2017

Accepted 27 July 2017

Available online 29 July 2017

Keywords:

Lipoprotein lipase

Hypertriglyceridemia

Hyperchylomicronemia

Triglycerides

Lipolysis

Multifactorial chylomicronemia

ABSTRACT

Background and aims: The heterogeneity and mechanisms of multifactorial chylomicronemia (MCM) remain poorly understood. To gain new insights, post heparin lipolysis measured at 60 min (PHLA60), in addition to the more commonly used 10 min (PHLA10), was assessed in patients with history of MCM. **Methods:** 62 consecutive MCM patients were studied. The evaluation included *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1* and *APOE* gene sequencing, as well as pre- and post-heparin injection biochemical analysis, including lipid profiles, determination of apolipoprotein B, B-48, CII, CIII, lipoprotein lipase (LPL) concentrations (LPLC0, LPLC10 and LPLC60) and post-heparin LPL activity (PHLA10 and PHLA60).

Results: In controls, PHLA60 did not differ from PHLA10, while in MCM patients, PHLA60 was significantly lower than PHLA10 ($p < 0.001$). PHLA60 showed a bimodal distribution in MCM patients ($p = 0.03$). One subgroup exhibited PHLA60 similar to controls, with persistent lipoprotein remodeling and, paradoxically, the highest basal plasma TG concentration. *APOE* $\epsilon 4$ was over-represented compared to the European population ($p < 0.05$) and Apo CIII/Apo B ratio was increased ($p < 0.01$). The other subgroup exhibited low PHLA60 ($p < 0.001$) compared to both controls and the other MCM subgroup with a lipoprotein profile consistent with fast and transient remodeling. *LMF1* p. Arg364Gln was over-represented compared to the European population ($p < 0.05$).

Conclusions: The study showed that PHLA60 identifies a subgroup of MCM with a defect in lipolysability and/or hepatic clearance of triglycerides-rich lipoproteins, and a larger one with a defect in LPL availability. These findings provide new insights into the heterogeneity of MCM and might contribute to adjust treatment targeting.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Severe hypertriglyceridemia (HTG), defined by triglyceride (TG) concentration above 10 mmol/l, is a rare condition corresponding to monogenic familial chylomicronemia syndrome (FCS) in rare cases and less infrequently to oligogenic multifactorial

chylomicronemia (MCM) [1,2]. Genetic determinants in monogenic forms include homozygous or compound heterozygous mutations in the lipoprotein lipase gene (*LPL*) and/or its cofactors: the apolipoprotein (Apo) AV (*APOA5*) and CII (*APOC2*), glycosylphosphatidylinositol anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (*GPIHBP1*) and lipase maturation factor 1 (*LMF1*) genes [3–6]. In addition, defects in the liver uptake of lipoprotein remnants, due to *APOE* variants, are also a cause of severe HTG [7]. However, severe HTG also occurs sporadically in patients with clusters of TG-raising susceptibility alleles [8,9] and environment interaction, leading to the MCM syndrome [10]. Extensive

* Corresponding author. Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de biochimie et biologie moléculaire, 59 Bd Pinel, F-69677 Bron, France.

E-mail address: oriane.marmontel@chu-lyon.fr (O. Marmontel).

phenotypic explorations, combined with genetic characterization, are needed to understand the mechanisms underlying the occurrence of this highly heterogeneous and poorly understood condition.

Our team, and others, have highlighted an apparent discrepancy between the occurrence of severe HTG in MCM patients despite normal or even increased post-heparin lipoprotein lipase (LPL) activity (PHLA) [4,11]. This finding raises the question of the relevance of PHLA assessment and of the contribution of additional mechanisms leading to MCM. Consequently, measurement of plasma LPL concentration (LPLC) without the need of heparin release [12–14] may provide a new tool to investigate MCM. Furthermore, clinical studies in two probands with homozygous *GPIHBP1* deficiency and experimental studies in transgenic mice found that the kinetic of the release of LPL activity 20–60 min after heparin injection was altered [15,16]. These findings support the need for a longer assessment of PHLA to comprehend the regulation of LPL bioavailability.

In this context, we therefore prospectively measured basal LPLC, sequential PHLA for 60 min and the remodeling of triglyceride-rich lipoproteins (TGRL), in a large cohort of patients with history of MCM and without bi-allelic causal mutations.

2. Materials and methods

2.1. Study participants

Sixty-two patients (sixty Caucasian and 2 Asian patients) with a documented history of MCM (TG > 15 mmol/l or familial history of HTG with TG > 10 mmol/l) were consecutively included from a single referral lipid clinic. Carriers of homozygous or compound heterozygous mutations in *LPL*, *GPIHBP1*, *APOA5*, *APOC2*, or *APOE* genes were excluded from the study.

Thirty controls without history of HTG or diabetes were included: twenty were previously described (9 men, 11 women; mean $\pm$ standard deviation, SD, age: 52 ± 17 years) [11], and ten additional controls (7 men, 3 women; mean $\pm$ SD age: 68 ± 9 years) were recruited to determine LPL activity 60 min after heparin injection (PHLA60).

Clinical investigations have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from both the control subjects and the patients before heparin injection and sampling. DNA was obtained from patients after specific written informed consent was given. The study protocol was approved by our institutional ethics committee (Comité d'Éthique du CHU de Lyon; DC-2012-1711). The study was registered on clinicaltrials.gov (NCT02933138).

2.2. Lipid profiles and lipoproteins electrophoresis

Patients and control subjects first received an intravenous heparin bolus (50 IU kg⁻¹ body weight) after 12-h overnight fasting. Blood was collected into EDTA tubes before heparin bolus injection (t0), then 3 min (t03), 10 min (t10), 30 min (t30), and 60 min (t60) after the heparin administration. Blood was stored on ice immediately after withdrawal. Plasma was isolated by centrifugation (2000g, 10 min, at 4 °C). Plasma was stored in aliquots at -80 °C. Basal lipid profiles including total cholesterol (TC), TG, high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), TG-chylomicrons, Apo B, CII, CIII, and B48, and lipoprotein electrophoresis were performed as described in [Supplementary Data](#).

2.3. LPL concentration, LPL and hepatic lipase (HL) activities

At t0, t10, and t60, LPLC (LPLC0, LPLC10, and LPLC60) were measured using a commercially available kit (ref 47-LPLHU-E01, Alpcos[®], Salem, New Hampshire, USA). At t10, t30, and t60, LPL (PHLA10, PHLA30, and PHLA60) and hepatic lipase (HL10, HL30, and HL60) activities were measured as previously described [11].

2.4. Molecular diagnosis

Screening by denaturing high-performance liquid chromatography or gene sequencing of encoding regions and the flanking intronic junctions of *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1*, and *LMF1* genes, and exon 4 of the *APOE* gene was performed as described in [Supplementary Data](#), excepted for two patients (DNA not available). Regarding *APOC3* gene, only the *Sst1* polymorphism was studied.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Software, Inc v5 (GraphPad, California USA). Mann-Whitney, Wilcoxon, *t*-test, Chi-squared, and Fisher's exact tests were performed to compare means/medians or distributions between groups. Correlations were assessed by Pearson correlation coefficients. Results are presented as mean $\pm$ SD or median $\pm$ 95% confidence interval (95% CI) for TG. Genotype and allele frequencies were determined by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using the Chi-squared test. Allele frequencies were compared with data of reported populations in the ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org/>). All statistical tests were two tailed and *p* values < 5% were considered to be significant.

3. Results

3.1. Cohort description

Characteristics and lipid profiles of the 62 MCM patients and the control subjects included in the study can be found in [Supplementary Table 1](#), and genetic data in [Supplementary Tables 2 and 3](#). Only 12 MCM patients (20%) carried heterozygous deleterious mutations. In 39 other MCM patients (65%), only common variants, usually associated with mild HTG (TG between 2 and 10 mmol/l [10]), were found, and no sequence variant was identified in the remaining 9 patients (15%).

3.2. LPL and HL assessments in MCM patients

Mean LPLC0 was 46% lower in MCM patients compared to controls ($p < 0.001$); it was found within the normal range (normal range: 28.5–68.1 ng/mL) in only 32% of MCM patients, including in 1/4 *LPL* heterozygous carriers and in 3/3 *APOA5* heterozygous carriers ([Fig. 1](#)).

Mean PHLA10 and LPLC10 were similar both in MCM patients and in control subjects; the distribution of PHLA10 was normal ([Fig. 2](#)). None of the MCM patients had a PHLA10 deficiency (PHLA10 < 10 μ mol/L/min [11]). Only 8/62 MCM patients had PHLA10 below the normal range (normal range: 22–47.6 μ mol/L/min [11]) and 12/62 patients had PHLA10 above the normal range. HL10 was 40% higher in MCM patients than in controls ($p < 0.01$).

In control subjects, PHLA60 did not differ from PHLA10, and LPLC60 did not differ from LPLC10; in MCM patients, PHLA60 was 50% lower than PHLA10, and LPLC60 was 42% lower than LPLC10 ($p < 0.001$ and $p < 0.001$). HL60 was similar both in MCM patients and in control subjects (2.6 μ mol/L/min vs. 2.7 μ mol/L/min respectively, $p = 0.9$). In control subjects, HL60 did not differ from PHLA10; in

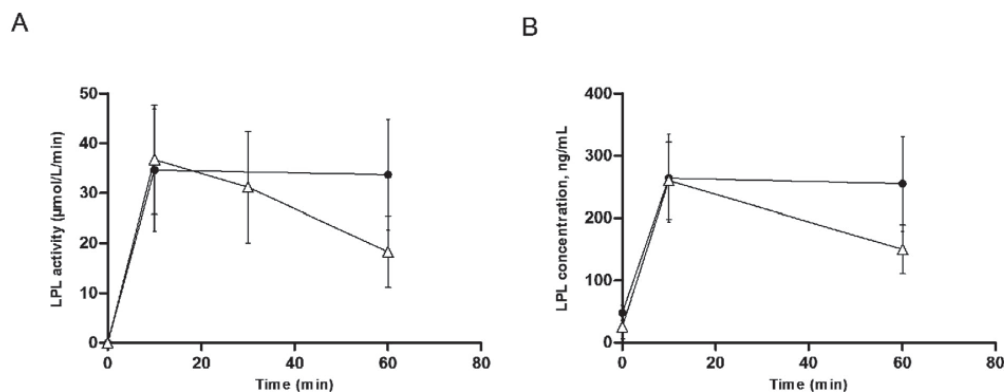


Fig. 1. Release of LPL activity and concentration in plasma after heparin injection in MCM patients and controls.

A single intravenous injection of heparin (50 UI/Kg) was given at time 0 in MCM patients (Δ) or controls subjects (●). Blood was collected prior to (t0), then 10 (t10), 30 (t30), and 60 (t60) min after heparin injection. (A) LPL activities were analyzed at t10 (MCM, n = 62; controls, n = 30), t30 (MCM, n = 17) and t60 (MCM, n = 62; controls, n = 10). (B) LPL concentrations were analyzed at t0 (MCM, n = 37; controls, n = 30), t10 (MCM, n = 37; controls, n = 30), and t60 (MCM, n = 37; controls, n = 10). Mean values ± standard deviation are presented.

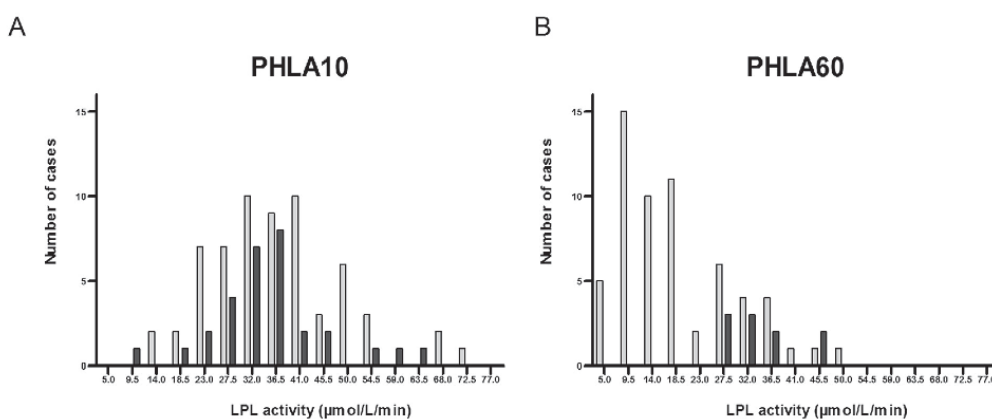


Fig. 2. Distribution of LPL activity in MCM patients and in controls.

(A) LPL activity 10 min after heparin injection (PHLA10); (B) LPL activity 60 min after heparin injection (PHLA60). (A) Normal distribution both in controls and MCM patients; (B) bimodal distribution in MCM patient only ($p = 0.03$). MCM patients (grey square); controls (black square).

MCM patients, HLA60 was 54% lower than HLA10. PHLA60 distribution was normal in controls, and bimodal in MCM patients (test of normality $p = 0.03$), leading to define a cut-off of 22.5 μmol/L/min (Fig. 2). Consequently, in MCM patients, two subgroups were identified using this cut-off; one subgroup (43/62 patients) with a low PHLA60 compared to controls (MCM low PHLA60 subgroup), and a smaller subgroup (19/62 patients) with normal PHLA60 (MCM normal PHLA60 subgroup).

3.3. Phenotypic characteristics of patients in MCM PHLA60 subgroups

Sex distribution, mean age, median body mass index (BMI), and the frequency of type 2 diabetes, as well as maximum plasma TG level, were similar between MCM PHLA60 subgroups. In the normal MCM PHLA60 subgroup, median plasma TG and TG-chylomicrons were 3 times higher ($p < 0.001$) and HDL-c significantly lower ($p < 0.001$); in agreement, TGRL were found TG enriched, with a

higher TG/TC ($p = 0.001$) and TG/Apo B ratio ($p < 0.001$). Both Apo CIII concentration and Apo CIII/Apo B ratio were increased in the MCM normal PHLA60 subgroup (Table 1).

3.4. LPL determination and lipoprotein remodeling after heparin injection in MCM PHLA60 subgroups

Low LPLC0 was present in both MCM PHLA60 subgroups. As expected, low LPLC60 was found only in the MCM low PHLA60 subgroup (Table 2). Overall, PHLA was significantly and similarly correlated with post heparin LPLC in both MCM PHLA60 subgroups ($r = 0.86$, $p < 0.001$ for MCM normal PHLA60 subgroup and $r = 0.68$, $p < 0.001$ for MCM low PHLA60 subgroup).

The absolute decrease in plasma TG concentration was larger in MCM normal PHLA60 subgroup ($p < 0.001$), however, the relative decrease in plasma TG concentration was not significantly different and TG at t60 remained significantly higher than in the MCM low PHLA60 subgroup ($p < 0.001$) (Table 3).

Table 1
Phenotypic characteristics of subgroups of MCM patients at baseline.

	MCM Normal PHLA60 n = 19	MCM Low PHLA60 n = 43	p
Sex male/female, n	16/3	29/14	NS
Age, years	43 ± 9	45 ± 12	NS
BMI, kg/m ²	28.8 ± 2.8	27.8 ± 4.8	NS
Pancreatitis, n (%)	4 (21.1%)	13 (30.2%)	NS
Highest plasma TG levels recorded, mmol/l	31.6 [28.7 57.40]	29.64 [25.99 40.88]	NS
Diabetes n (%)	9 (47.4%)	15 (34.8%)	NS
Statins/fibrates/n-3	5/3/0	12/6/2	NS
TG, mmol/l	15.79 [13.01 27.29]	5.56 [5.03 8.69]	<0.001
TG-chylomicrons, %	20.60 [17.67 44.60]	4.27 [5.56 16.25]	0.001
TC, mmol/l	11.31 ± 5.89	6.71 ± 2.42	<0.001
TG/TC	1.7 ± 0.8	1.0 ± 0.7	0.001
HDL-c, mmol/l	0.66 ± 0.16	0.86 ± 0.24	0.001
LDL-c, mmol/l	2.04 ± 1.94	2.81 ± 1.62	NS
Apo B, g/L	1.20 ± 0.57	1.13 ± 0.36	NS
Apo B48, g/L	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.02	<0.01
TG/Apo B48	0.44 ± 0.47	0.31 ± 0.22	0.16
TC/Apo B	3.8 ± 1.7	2.3 ± 0.5	<0.001
TG/Apo B	19.2 ± 15.1	6.6 ± 6.1	<0.001
Apo CII, g/L	0.224 ± 0.12	0.15 ± 0.97	<0.05
Apo CIII, g/L	0.62 ± 0.32	0.34 ± 0.23	<0.01
Apo CII/Apo CIII	0.39 ± 0.12	0.45 ± 0.16	0.17
Apo CIII/Apo B	5.6 ± 2.9	2.8 ± 2.1	<0.001

Quantitative variables are presented as mean ± standard deviation or median [95 CI] confidence interval of mean for TG. Qualitative variables are expressed as number of patients. Data were available for Apo CII and Apo CIII for 14 patients in the MCM normal PHLA60 subgroup and 29 patients in the MCM low PHLA60 subgroup. The p value was calculated by Student's *t*-test, Mann-Whitney, or Chi-squared, as appropriate.

NS, non-significant; BMI, body mass index; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; Apo, apolipoprotein.

Table 2
LPL and HL assessments in subgroups of MCM patients.

	Controls		MCM Normal PHLA60		MCM Low PHLA60		p	p'	p''
		n		n		n			
LPLC0, ng/mL	50.4 ± 20.0	30	24.8 ± 9.0	11	26.6 ± 13.7	26	<0.001	<0.001	NS
LPLC10, ng/mL	263.8 ± 61.8	30	287.9 ± 79.1	11	251.1 ± 65.1	26	NS	NS	NS
LPLC60, ng/mL	254.0 ± 41.5	10	235.1 ± 58.6	11	118.3 ± 43.6	26	NS	<0.001	<0.001
PHLA10, μmol/L/min	34.7 ± 10.8	30	42.2 ± 14.8	19	34.4 ± 10.2	43	0.05	NS	0.01
PHLA60, μmol/L/min	33.7 ± 7.2	10	32.7 ± 6.9	19	11.9 ± 5.0	43	NS	<0.001	<0.001
HL10, μmol/L/min	2.8 ± 1.5	30	4.9 ± 2.3	19	3.6 ± 1.8	43	<0.001	NS	<0.05
HL60, μmol/L/min	2.7 ± 0.7	10	3.2 ± 2.0	19	2.3 ± 1.3	43	NS	NS	<0.05

Data are presented as mean ± standard deviation. The p, p', and p'' values were calculated by Student's *t*-test or Mann-Whitney, as appropriate.

NS, non-significant; p, comparison between MCM normal PHLA60 subgroup and controls. p', comparison between MCM low PHLA60 subgroup and controls. p'', comparison between MCM normal PHLA60 and low PHLA subgroups.

LPLC, lipoprotein lipase concentration; PHLA, post heparin lipoprotein lipase activity; HL, hepatic lipase activity.

Table 3
Lipids and apolipoproteins 60 min after heparin injection in MCM subgroups.

	MCM Normal PHLA60 n = 19		MCM Low PHLA60 n = 43		p	p'	p''
	t0	t60	t0	t60			
TG, mmol/l	15.79 [13.01 27.29]	9.06 [8.49 20.06]	5.56 [5.03 8.69]	3.34 [3.32 6.00]	<0.001	<0.001	<0.001
ΔTG, %	NA	28.9 ± 12.0	NA	31.5 ± 12.7	NA	NA	NS
TC, mmol/l	11.31 ± 5.89	9.27 ± 4.41	6.71 ± 2.42	5.84 ± 2.04	<0.001	<0.001	<0.001
TG/TC	1.7 ± 0.8	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.7	0.8 ± 0.6	<0.001	<0.001	<0.01
Apo B, g/L	1.20 ± 0.57	1.17 ± 0.52	1.13 ± 0.36	1.09 ± 0.34	NS	<0.01	NS
TC/Apo B	3.8 ± 1.7	3.2 ± 1.4	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.4	<0.001	<0.001	<0.001
TG/Apo B	19.2 ± 15.1	12.9 ± 11.7	6.6 ± 6.1	4.5 ± 4.1	<0.001	<0.001	<0.001

Quantitative variables are presented as mean ± standard deviation or median [95 CI] confidence interval of mean for TG.

The p value was calculated by Student's *t*-test, Mann-Whitney test, or Wilcoxon test, as appropriate. NA, non-applicable; NS, non-significant; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; Apo, apolipoprotein. P, comparison of T0 and T60 in MCM Normal PHLA60; p', comparison of T0 and T60 in MCM Low PHLA60; p'', comparison of T60 between MCM Normal and Low PHLA60.

Comparative analysis of lipoprotein profiles obtained by agarose gel electrophoresis at t0, t3, t10, t30 and t60 found a strong

heterogeneity in the pattern of lipoprotein remodeling (Supplementary Fig. 1). By considering the profile and the time

course, three patterns of remodeling were identified. Pattern 1 was observed in 13/62 MCM patients: high amount of lipid staining in the pre β /very low density lipoproteins (VLDL) area with little VLDL disappearance at t60, appearance of two additional fractions at t3 named fractions 5 and 6 (remodeled Apo A1 containing fraction) that remained until t60. Pattern 2 was observed in 33/62 MCM patients: delayed pre β /VLDL decrease, fractions 5 and 6 no longer observed at t60. Pattern 3 was characterized by an early pre β /VLDL disappearance, without fraction 5. It was found in all the normo-triglyceridemic controls ($n = 10$) and in 16/62 MCM patients, presenting either with normal triglyceridemia ($n = 7$) or mild HTG ($n = 9$) at the time of the assessment.

Pattern 1 was more frequent among patients with normal PHLA60 (11/19) than among those with low PHLA60 (2/43, $p < 0.001$); pattern 2 was similarly distributed (8/19 vs. 25/43, $p = 0.24$), and pattern 3 was exclusively found in patients with low PHLA60 (0/19 vs. 16/43 $p = 0.002$).

Overall, as shown in [Supplementary Fig. 2](#), MCM patients with pattern 3 (presumed fast and transient lipoprotein remodeling) had mostly mild HTG and low PHLA60, whereas most of the patients with pattern 1 (presumed persistent lipoprotein remodeling) had severe basal HTG and normal PHLA60.

3.5. Genetic characteristics of patients in MCM PHLA60 subgroups

Heterozygous mutation in *LPL* and *APOA5* were found in both groups, at similar proportions ([Table 4A](#)). Regarding common genetic variants, *APOA5* p.(Ser19Trp) was more frequent in both MCM PHLA60 subgroups compared to the European population ($p < 0.001$); *APOE* $\epsilon 4$ was more frequent only in the MCM normal PHLA60 subgroup ($p < 0.05$), and *LMF1* p.(Arg364Gln) variant was only more frequent in the MCM low PHLA60 subgroup ($p < 0.05$; [Table 4B](#)).

4. Discussion

The present study showed that PHLA60 assessment identified a subgroup of MCM patients with a defect in lipolysability and/or hepatic clearance of TGRL, and a larger one with a defect in LPL availability.

4.1. Alteration in pre-heparin LPL concentration in MCM patients

Interestingly, a low LPLC0 in MCM patients was found in this study in both MCM PHLA60 subgroups of patients. This finding was previously reported in a smaller group (55 and 30 respectively) of non-genetically characterized HTG patients [17,18] and in 28 patients with FCS [19,20]. However, low LPLC0 cannot be considered as a new diagnosis hallmark of MCM for at least two reasons. Firstly, although LPLC0 was lower on average, it was found within the normal range in one third of MCM patients whatever subgroup considered. It was also found decreased in 3/30 controls. Secondly, low LPLC0 has also been reported in type 2 diabetes [21,22] and obesity [23–25], some common conditions frequently associated with MCM.

4.2. Alteration in post-heparin LPL release in MCM patients found by extended assessment of PHLA

PHLA determined 10 or 15 min after heparin injection is recognized as the gold standard for the diagnosis of severe HTG [26–28]. Regarding PHLA10, we confirm the finding that LPL deficiency is uncommon in MCM, and that most of these patients have a normal PHLA10 [4,11]. PHLA10 was even above the reference interval for 12 patients, despite those having a history of MCM as previously described in a smaller cohort [17].

Heterogeneity among the patients was found only by

Table 4
Genetic comparison according to the MCM PHLA60 subgroups.

A						
		Normal PHLA60 n = 18			Low PHLA60 N = 42	
<i>LPL</i> heterozygous carriers						
		#1			#2	
		#6			#3	
					#4	
					#5	
<i>APOA5</i> heterozygous carriers						
		#7			#8	
		#9			#10	
		#12			#11	
					#13	
					#14	
<i>APOE</i> heterozygous carriers						
B						
Gene	Variant	Allele frequency European population ^a	Allele frequency normal PHLA60	p	Allele frequency low PHLA60	p
<i>LPL</i> (n = 60)	p.(Asp36Asn)	0.0151	0.0278	NS	0.0238	NS
	p.(Asn318Ser)	0.0202	0	NS	0.0476	NS
<i>APOA5</i> (n = 60)	p.(Ser19Trp)	0.0864	0.3611	<0.001	0.2262	<0.001
<i>GPIIIBP1</i> (n = 60)	p.(Phe14Cys)	0.1062	0.0556	NS	0.0952	NS
<i>LMF1</i> (n = 52)	p.(Arg364Gln)	0.0356	0.0333	NS	0.0676	<0.05
<i>APOC3</i> (n = 60)	c.*40G > C	0.1611	0.0833	NS	0.1786	NS
<i>APOE</i> (n = 60)	($\epsilon 4$) p.(Cys130Arg)	0.2078	0.3333	<0.05	0.1310	NS
	($\epsilon 2$) p.(Arg176Cys)	0.1060	0.1944	NS	0.1190	NS

[A] Rare variants identified in *LPL*, *APOA5* and *APOE* genes. Mutations were described in [Supplementary Data](#); #, number of the patient ([Table 2](#)).

[B] Common variants. Hardy-Weinberg proportion test was applied with Chi-squared.

^a <http://exac.broadinstitute.org/>; NS, non-significant.

performing an extended monitoring of PHLA. Longer assessment of PHLA by continuous heparin infusion has been previously shown to reveal abnormalities in LPL release among a small subgroup of diabetic patients [29]. In the present study, PHLA60 was similar in diabetic and non-diabetic patients (mean $\pm$ SD: 20.4 μ mol/L/min $\pm$ 10.8 versus 17.0 $\pm$ 11.5; non-significant; data not shown). Only 2 studies using similar injection protocols can be used for comparison. Kern et al. studied the plasmatic release of immunoreactive LPL by Western blot in 5 hyperchylomicronemic patients and a single control subject [20]. Reardon et al. report results of LPL kinetics in only 2 mild HTG patients without considering a control group [30]. They found that the pattern of release of LPL differed strongly from patient to patient and they reported a positive correlation between PHLA and the fraction catabolic rate of large VLDL. The present study strengthens the fact that PHLA60 is not different from PHLA10 in control subjects.

In the MCM normal PHLA60 subgroup, patients had more severe basal HTG. The findings indirectly support the contribution of other factors interfering with the lipolysability and/or hepatic removal of TGRL in these patients. According to this hypothesis, lipoprotein electrophoresis exhibited a presumed long duration of lipoproteins remodeling, without disappearance of the VLDL fraction. In agreement, the TG and the TG/Apo B ratio decreased after heparin injection without significant modifications of Apo B levels. That is all the more surprising since their TGRL were large particles (high TG/Apo B ratio in serum), known to have better affinity for LPL and increased liposability [31–33]. APOE ϵ 4, known to impair VLDL lipolysis by modification of apolipoproteins partition between VLDL and HDL [34,35], was more frequent in this subgroup of patients with normal PHLA and LPLC. Moreover, the Apo CIII/Apo B ratio was increased in this group whereas the Apo CIII/Apo B48 ratio was similar. This finding suggests that Apo CIII might interfere mostly with VLDL clearance. In agreement, Gordts et al. [36] report that Apo CIII inhibits the turnover of TGRL primarily by impairing their hepatic clearance mechanism. Furthermore, antisense inhibition of Apo CIII has been shown to decrease plasma TG in LPL deficient patient as well as in non LPL deficient severe HTG patients [37,38].

A lower PHLA60 than in controls was observed in the majority of MCM patients (MCM low PHLA60 subgroup): this result supports the hypothesis of a deregulation of active LPL availability due to a fast LPL clearance and/or due to a poor recruitment of newly synthesized molecules [39,40]. First, the liver plays a role in LPL clearance [41], and fast disappearance of TGRL might increase the clearance of LPL bound to TGRL [42]. However, in the control subjects, PHLA60 did not differ from PHLA10, despite an optimal clearance of VLDL; this is an argument against this first hypothesis. In agreement with the second hypothesis, the p.(Arg364Gln) variant of *LMF1*, a chaperone protein known to modulate the maturation of LPL, was more frequent in this subgroup of patients. This variant is predicted as potentially deleterious by *in silico* analysis (both SIFT and PolyPhen softwares). A functional effect of this variant on LPL release was observed by our team (unpublished data), but this is at odds with the functional analysis performed by Surendran et al., who reported a mild but non-significant decrease of LPL release [4]. Mild residual HTG at the time of the assessment, despite a maximum peak of plasma TG similar to MCM normal PHLA60 subgroup, could be explained by the fact that LPL was effective and sufficiently releasable under normal conditions, but could not cope due to altered bioavailability in stress conditions. Accordingly, in this subgroup of patients, the electrophoretic profile was consistent with a presumed fast and efficient lipoproteins remodeling as well as VLDL disappearance. The future availability of anti ANGPTLs might be a relevant option to be considered in these patients [43,44].

4.3. Strength and limitation of the study

The study provides a large number of MCM patients with extensive genetic and phenotypic characterization. Phenotypic exploration could not always be performed at the time of acute HTG due to the transient occurrence of severe HTG in MCM. The limited number of controls is explained by the need of heparin injections. This group is older than patients, however, we previously showed that PHLA was unchanged according to age (no correlation between PHLA and age, $r = 0.063$) [11]. In addition, obesity, diabetes, and lipid lowering treatment might be some confounding factors but no difference in the distribution was observed between MCM PHLA60 subgroups. Furthermore, the observational design of this study and the lack of kinetic studies with stable isotopes cannot allow us to validate the hypothesis raised from the interpretation of the data. Finally, the functionality of the TGRL, known to be important in lipoprotein metabolism, could not be studied [45,46].

In conclusion, this study indicates that performing longer assessment of PHLA brings valuable information since it allows the identification of different subgroups of patients with history of MCM. The conjunction of phenotypic and genetic data supports the hypothesis of different mechanisms: a defect in LPL bioavailability versus an impairment of liposability and/or a defect in lipoprotein hepatic clearance. Taken together, these data suggests a complex interplay between Apo CIII and Apo E in this balance. In the context of new treatments for severe HTG, further understanding of the different mechanisms involved in MCM patients could potentially improve the targeting of these new therapeutic strategies.

Conflict of interest

Philippe Moulin has received honoraria paid to his university for participating in clinical trials and or advisory boards and/or symposia organized by: AMT, Chiesi, Novartis, Uniqure. The other authors have nothing to disclose.

Author contributions

Clinical assessments: CC, SC, PM.
Conceived and designed the experiments: MDF CM OM PM.
Performed the experiments: OM SN MD MSD.
Analyzed the data: OM MDF SC PM.
Wrote the paper: OM MDF CM SC PM.

Acknowledgments

We would like to thank Pr Gilles Rioufol, Pr Gérard Finet, Dr François Sassolas, Pierre-Valentin Laffitte and Laure Emile for their contribution to control subjects recruitment; physicians and nurses of endocrinology units for recruiting patients and carefully carrying out protocol for sampling after heparin injections. We would also like to give special thanks to Dr Agnes Sassolas for her previous work on the subject; Marie Caroline Michalski, Michel Lagarde and Michel Krempf for helpful discussions; and Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for expert editorial assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.030>.

References

- [1] R.A. Hegele, H.N. Ginsberg, M.J. Chapman, B.G. Nordestgaard, J.A. Kuivenhoven, M. Averna, et al., The polygenic nature of

- hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (8) (2014 Aug) 655–666.
- [2] A.L. Catapano, Z. Reiner, G. De Backer, I. Graham, M.-R. Taskiran, O. Wiklund, et al., ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS), *Atherosclerosis* 217 (1) (2011 Jul) 3–46.
 - [3] A.J. Brahm, R.A. Hegele, Chylomicronaemia current diagnosis and future therapies, *Nat. Rev. Endocrinol.* 11 (6) (2015 Jun) 352–362.
 - [4] R.P. Surendran, M.E. Visser, S. Heemelaar, J. Wang, J. Peter, J.C. Defesche, et al., Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia, *J. Intern. Med.* 272 (2) (2012 Aug) 185–196.
 - [5] C. Rabacchi, L. Pisciotto, A.B. Cefali, D. Noto, R. Fresa, P. Tarugi, et al., Spectrum of mutations of the LPL gene identified in Italy in patients with severe hypertriglyceridaemia, *Atherosclerosis* 241 (1) (2015 Jul) 79–86.
 - [6] I. Lamiqiz-Moneo, C. Blanco-Torrecilla, A.M. Bea, R. Mateo-Gallego, S. Pérez-Calahorra, L. Baila-Rueda, et al., Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridaemia in the general population of Spain, *Lipids Health Dis.* 15 (2016) 82.
 - [7] L. Berglund, J.D. Brunzell, A.C. Goldberg, I.J. Goldberg, F. Sacks, M.H. Murad, et al., Evaluation and treatment of hypertriglyceridaemia: an Endocrine Society clinical practice guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (9) (2012 Sep) 2969–2989.
 - [8] C.T. Johansen, R.A. Hegele, Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (5) (2012 May) 833–842.
 - [9] I. De Castro-Orós, A. Cenarro, M.T. Tejedor, L. Baila-Rueda, R. Mateo-Gallego, I. Lamiqiz-Moneo, et al., Common genetic variants contribute to primary hypertriglyceridaemia without differences between familial combined hyperlipidaemia and isolated hypertriglyceridaemia, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7 (6) (2014 Dec) 814–821.
 - [10] A. Chait, S. Subramanian, J.D. Brunzell, Genetic disorders of triglyceride metabolism, in: L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, et al. (Eds.), *Endotext* [Internet], MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000 [cited 2017 Apr 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326743/>.
 - [11] M. Di Filippo, C. Marçais, S. Charrière, O. Marmontel, M. Broyer, M. Delay, et al., Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects, *PLoS One* 9 (5) (2014) e96482.
 - [12] J.W. Goers, M.E. Pedersen, P.A. Kern, J. Ong, M.C. Scholtz, An enzyme-linked immunosorbent assay for lipoprotein lipase, *Anal. Biochem.* 166 (1) (1987 Oct) 27–35.
 - [13] M. Kawamura, T. Gotoda, N. Mori, H. Shimano, K. Kozaki, K. Harada, et al., Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for lipoprotein lipase with newly developed antibodies, *J. Lipid Res.* 35 (9) (1994 Sep) 1688–1697.
 - [14] H. Kimura, Y. Ohkura, K. Katoh, H. Ishii, N. Sunahara, A. Takagi, et al., Development and evaluation of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of lipoprotein lipase mass in human plasma, *Clin. Biochem.* 32 (1) (1999 Feb) 15–23.
 - [15] R. Franssen, S.G. Young, F. Peelman, J. Hertecant, J.A. Sierts, A.W.M. Schimmel, et al., Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIIIBP1 defects, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3 (2) (2010 Apr) 169–178.
 - [16] G. Olivecrona, E. Ehrenborg, H. Semb, E. Makoveichuk, A. Lindberg, M.R. Hayden, et al., Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIIIBP1 in familial chylomicronemia, *J. Lipid Res.* 51 (6) (2010 Jun) 1535–1545.
 - [17] I. Coca-Prieto, P. Valdivielso, G. Olivecrona, M.J. Ariza, J. Rioja, P. Font-Ugalde, et al., Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis, *BMC Gastroenterol.* 9 (2009) 46.
 - [18] J. Kobayashi, H. Hashimoto, I. Fukamachi, J. Tashiro, K. Shirai, Y. Saito, et al., Lipoprotein lipase mass and activity in severe hypertriglyceridaemia, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 216 (1–2) (1993 Jul 16) 113–123.
 - [19] J.H. Auwerx, S.P. Babirak, W.Y. Fujimoto, P.H. Iversen, J.D. Brunzell, Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency, *Eur. J. Clin. Invest.* 19 (5) (1989 Oct) 433–437.
 - [20] P.A. Kern, R.A. Martin, J. Carty, I.J. Goldberg, J.M. Ong, Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia, *J. Lipid Res.* 31 (1) (1990 Jan) 17–26.
 - [21] Y. Miyashita, K. Shirai, Y. Itoh, H. Sasaki, M. Totsuka, T. Murano, et al., Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 56 (3) (2002 Jun) 181–187.
 - [22] J. Kobayashi, T. Maruyama, H. Watanabe, A. Kudoh, S. Tateishi, T. Sasaki, et al., Gender differences in the effect of type 2 diabetes on serum lipids, pre-heparin plasma lipoprotein lipase mass and other metabolic parameters in Japanese population, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 62 (1) (2003 Oct) 39–45.
 - [23] C. Couillard, N. Bergeron, D. Prud'homme, J. Bergeron, A. Tremblay, C. Bouchard, et al., Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men, *Diabetes* 47 (6) (1998 Jun) 953–960.
 - [24] J. Kobayashi, J. Tashiro, S. Murano, N. Morisaki, Y. Saito, Lipoprotein lipase mass and activity in post-heparin plasma from subjects with intra-abdominal visceral fat accumulation, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 48 (4) (1998 Apr) 515–520.
 - [25] K. Taira, M. Hikita, J. Kobayashi, H. Bujo, K. Takahashi, S. Murano, et al., Delayed post-prandial lipid metabolism in subjects with intra-abdominal visceral fat accumulation, *Eur. J. Clin. Invest.* 29 (4) (1999 Apr) 301–308.
 - [26] T. Gotoda, K. Shirai, T. Ohta, J. Kobayashi, S. Yokoyama, S. Oikawa, et al., Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia, *J. Atheroscler. Thromb.* 19 (1) (2012) 1–12.
 - [27] R.H. Eckel, I.J. Goldberg, L. Steiner, T.J. Yost, J.R. Paterniti, Plasma lipolytic activity. Relationship to postheparin lipolytic activity and evidence for metabolic regulation, *Diabetes* 37 (5) (1988 May) 610–615.
 - [28] J.D. Brunzell, A. Chait, E.A. Nikkilä, C. Ehnholm, J.K. Huttunen, G. Steiner, Heterogeneity of primary lipoprotein lipase deficiency, *Metabolism* 29 (7) (1980 Jul) 624–629.
 - [29] J.D. Brunzell, D. Porte, E.L. Bierman, Reversible abnormalities in postheparin lipolytic activity during the late phase of release in diabetes mellitus (post-heparin lipolytic activity in diabetes), *Metabolism* 24 (10) (1975 Oct) 1123–1137.
 - [30] M.F. Reardon, H. Sakai, G. Steiner, Roles of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in the catabolism in vivo of triglyceride-rich lipoproteins, *Arterioscler. Dallas Tex* 2 (5) (1982 Oct) 396–402.
 - [31] P.W. Connelly, G.F. Maguire, C. Vezina, R.A. Hegele, A. Kuksis, Kinetics of lipolysis of very low density lipoproteins by lipoprotein lipase. Importance of particle number and noncompetitive inhibition by particles with low triglyceride content, *J. Biol. Chem.* 269 (32) (1994 Aug 12) 20554–20560.
 - [32] S.Q. Xiang, K. Cianflone, D. Kalant, A.D. Sniderman, Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase, *J. Lipid Res.* 40 (9) (1999 Sep) 1655–1663.
 - [33] R.M. Fisher, S.W. Coppack, S.M. Humphreys, G.F. Gibbons, K.N. Frayn, Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 236 (1) (1995 Apr 30) 7–17.
 - [34] H. Li, P. Dhanasekaran, E.T. Alexander, D.J. Rader, M.C. Phillips, S. Lund-Katz, Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (4) (2013 Apr) 687–693.
 - [35] P.C. Rensen, T.J. van Berkel, Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 271 (25) (1996 Jun 21) 14791–14799.
 - [36] P.L.S.M. Gordts, R. Nock, N.-H. Son, B. Ramms, I. Lew, J.C. Gonzales, et al., ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors, *J. Clin. Invest.* 126 (8) (2016 Aug 1) 2855–2866.
 - [37] D. Gaudet, D. Brisson, K. Tremblay, V.J. Alexander, W. Singleton, S.G. Hughes, et al., Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome, *N. Engl. J. Med.* 371 (23) (2014 Dec 4) 2200–2206.
 - [38] D. Gaudet, V.J. Alexander, B.F. Baker, D. Brisson, K. Tremblay, W. Singleton, et al., Antisense inhibition of apolipoprotein C-III in patients with hypertriglyceridaemia, *N. Engl. J. Med.* 373 (5) (2015 Jul 30) 438–447.
 - [39] O. Chevreuil, M. Hultin, P. Ostergaard, T. Olivecrona, Depletion of lipoprotein lipase after heparin administration, *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol. Am. Heart Assoc.* 13 (10) (1993 Oct) 1391–1396.
 - [40] B. Näsström, G. Olivecrona, T. Olivecrona, B.G. Stegmayr, Lipoprotein lipase during continuous heparin infusion: tissue stores become partially depleted, *J. Lab. Clin. Med.* 138 (3) (2001 Sep) 206–213.
 - [41] L. Neuger, S. Vilard, C. Lopez-Iglesias, J. Gupta, T. Olivecrona, G. Olivecrona, Effects of heparin on the uptake of lipoprotein lipase in rat liver, *BMC Physiol.* 4 (1) (2004 Nov 15) 13.
 - [42] M.W. Huff, W.C. Breckenridge, W.L. Strong, B.M. Wolfe, Metabolism of apolipoproteins C-II, C-III, and B in hypertriglyceridaemic men. Changes after heparin-induced lipolysis, *Arterioscler. Dallas Tex* 8 (5) (1988 Oct) 471–479.
 - [43] M.J. Graham, R.G. Lee, T.A. Brandt, L.-J. Tai, W. Fu, R. Peralta, et al., Cardiovascular and metabolic effects of ANGPTL3 antisense oligonucleotides, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 222–232.
 - [44] F.E. Dewey, V. Gusarova, R.L. Dunbar, C. O'Dushlaine, C. Schurmann, O. Gottesman, et al., Genetic and pharmacologic inactivation of ANGPTL3 and cardiovascular disease, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 211–221.
 - [45] L. Xia, C. Fan, H. Dong, C. Wang, Y. Lu, R.J. Deckelbaum, et al., Particle size determines effects of lipoprotein lipase on the catabolism of n-3 triglyceride-rich particles, *Clin. Nutr. Edinb Scotl* 34 (4) (2015 Aug) 767–774.
 - [46] M.C. Jong, W.L. Hendriks, L.C. van Vark, V.E. Dahlmans, J.E. Groener, L.M. Havekes, Oxidized VLDL induces less triglyceride accumulation in J774 macrophages than native VLDL due to an impaired extracellular lipolysis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (1) (2000 Jan) 144–151.

Supplementary data for materials and methods

Lipid profiles

Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), apolipoproteins (Apo) B and A1 levels were determined using commercial kits (ABBOTT Diagnostics) on an Architect C16000 autoanalyser (ABBOTT Diagnostics, Illinois, USA). Apo CII and CIII were measured using a commercial kit (K-Assay, Kamiya Biomedical Company, Whashington, USA) on an ABX Pentra 400 autoanalyzer (Horiba Medical; Montpellier, France). Apo B48 concentration was measured using a commercially available kit (ref AKHB48, Xceltis, Mannheim, France). TG levels and lipoprotein electrophoresis were carried out on all available post-heparin serums using commercial kit (see previously) and the Sebia hydragel system (Sebia; Issy Les-Moulineaux, France). Lipoprotein remodeling patterns assessed by lipoprotein electrophoresis were interpreted independently by three operators.

Determination of chylomicrons and LDL-cholesterol after ultracentrifugation

TG in the chylomicrons fraction (TG-chylomicrons) were determined by measuring TG levels in the floating fraction obtained after ultracentrifugation of the serum with distilled water in a Sorval S140 AT 017 Rotor (Sorval Discovery M150 SE ultracentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) at 15000 rpm (112 060 *g*) for 1h. TG-chylomicrons were measured for patients before heparin injection and 10 and 60 minutes after heparin injection.

LDL cholesterol (LDL-c) was determined after preparative ultracentrifugation ($d=1.006$ kg/l) using a Sorval Discovery M150 SE ultracentrifuge (Sorval S140 AT 017 Rotor: 140 000 RPM (1 050 560 *g*) for 70 minutes). After VLDL and chylomicrons removal, TC was determined in the remaining fraction (LDL + HDL). LDLc was obtained by the subtraction of the directly measured HDLc.

LPL activity

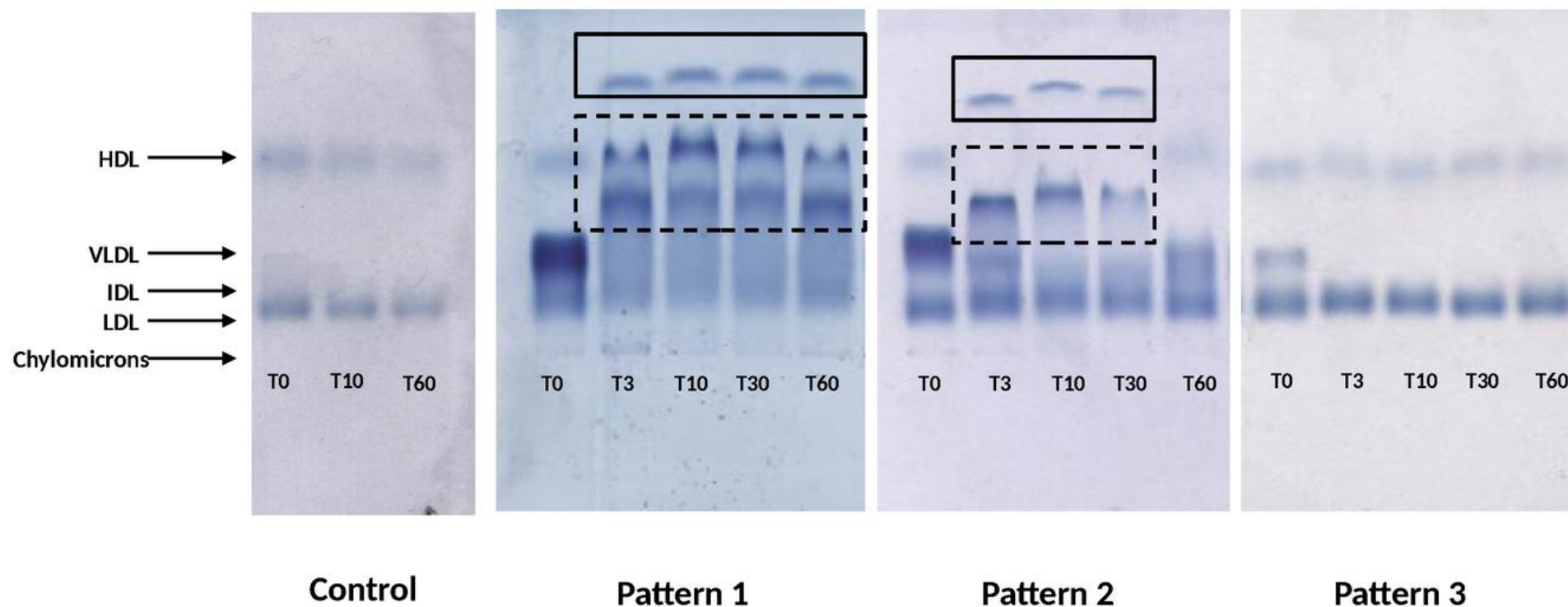
Briefly, post-heparin plasma was added to the heat inactivated VLDL substrate (obtained by ultracentrifugation of normolipidemic human serums, diluted in a phosphate buffer, pH 8.15).

Following incubation at 37°C, the released NEFA (non-esterified fatty acids) were assayed hourly for 4 hours. LPL activity was expressed as $\mu\text{mol/L/min}$ after subtraction of hepatic lipase (HL) activity, determined following LPL inhibition with NaCl 1.5 mmol/L pH 8.15.

Molecular diagnosis

Following the extraction of genomic DNA from blood (Nucleon Bac3, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), the encoding regions, and the flanking intronic junctions of *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *LMF1* genes and exon 4 of *APOE* gene were PCR amplified as previously reported (1–3). The amplicons were either screened by denaturing high-performance liquid chromatography as previously described (dHPLC, Transgenomic, Glasgow, United Kingdom) or directly sequenced with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

1 **Figure S1. Lipoprotein electrophoretic pattern after heparin injection in MCM patients and controls.**



2

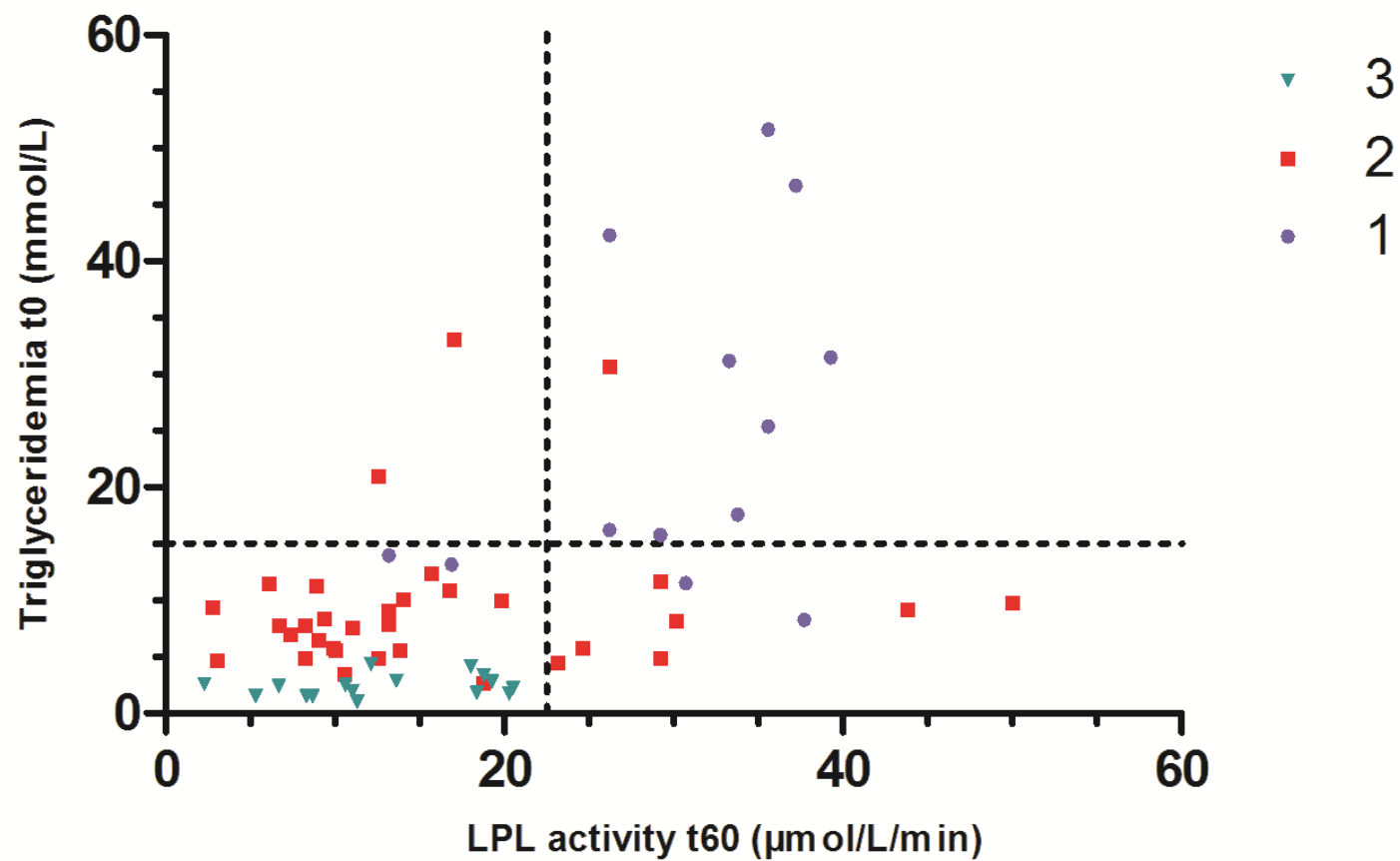
3 A single intravenous injection of heparin (50 UI/Kg) was given at time 0. Blood was collected prior to (t0), and 3 (t3), 10 (t10), 30 (t30) and 60 (t60) minutes
4 after heparin injection. Lipoprotein electrophoresis was performed at each time point, on the same agarose gel.

5 Fraction 5 (dotted line ---) and 6 (solid line—) were immunoblotted and both contained Apolipoprotein A1 (data not shown).

6

7

1 **Figure S2. Distribution of Lipoprotein electrophoretic pattern in the correlation between PHLA60 and basal triglyceridemia.**



2

3 Lipoprotein electrophoretic pattern 1 (● Blue circle), pattern 2 (■ Red square) and pattern 3 (▼ Green triangle).

4 Cut off are shown as a dotted line: 22.5 $\mu\text{mol/L/min}$ for PHLA60 and 15 mmol/L for basal triglyceridemia.

5

1 **Table S1. Characteristics of 62 MCM patients and controls the day of heparin injection**

2

	MCM n=62	Controls n=30	<i>p</i>
Sex male/female, n	45/17	18/12	NS
Age, years	45±11	57±16	< 0.001
BMI, kg/m ²	28.0±4.3	24.5±3.8	< 0.001
Pancreatitis, <i>n</i>	17 (27.4%)	NA	NA
Highest plasma TG levels recorded, mmol/L	30.78 [29.54-43.92]	NA	NA
Diabetes n (%)	24 (38.7%)	0 (0%)	< 0.001
Statins/Fibrates/n-3	17/9/2	15/0/0	0.02
TG, mmol/L	7.81 [8.07-13.80]	1.09 [1.02-1.43]	< 0.001
TC, mmol/L	8.12±4.34	4.23±1.03	< 0.001
HDLc, mmol/L	0.80±0.23	1.14±0.31	< 0.001
LDLc, mmol/L	2.57±1.75	2.54±0.90	NS
Apo B, g/L	1.15±0.43	78±26	< 0.001
Apo CII, g/L	0.17± 0.11	NA	NA
Apo CIII, g/L	0.43± 0.29	NA	NA
Apo CII/Apo CIII	0.43±0.15	NA	NA

3

4 Quantitative variable are presented as mean +/- Standard deviation, or median [IC 95] confidence interval of mean for triglycerides. Qualitative variable are
5 expressed as number of person. Data were available for Apo CII and Apo CIII for 44 patients and for BMI for 27 controls. The *p* value was calculated by
6 Student's test, Mann-Whitney and Chi square as appropriate. NS, non-significant.

- 1 BMI, Body mass index; , n-3, high dose omega 3 fatty acids supplementation (2g/day TG, triglycerides; TC, total cholesterol; HDLc, high density lipoprotein
- 2 cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; Apo, apolipoprotein).
- 3

Table S2. Rare genetic variants identified in candidate genes in MCM patients.

Gene	N°	Exon	Trivial name (protein effect)	Systematic name (DNA level)	Missense mutation Polyphen/SIFT	Truncate d protein	References
<i>LPL</i>	#1	2	p.(Trp91*)	NM_000237.2(LPL):c.272G>A		Yes	SNPdb rs118204070
	#2	3	p.(Ala98Thr)	NM_000237.2(LPL):c.292G>A	Probably damaging/tolerated		Chan 2002 (4)
	#3	4	p.(Ser199Phefs*8) ^a	NM_000237.2(LPL):c.596del		Yes	Pruneta 2005 (5)
	#4	5	p.(Leu209Tyrf*43)	NM_000237.2(LPL):c.624del		Yes	Non reported
	#5	5	p.(Gly215Glu)	NM_000237.2(LPL):c.644G>A	Probably damaging/Deleterious		Reina 1992 (6); Ebara 2007 (7)
	#6	5	p.(Ile245Thr)	NM_000237.2(LPL):c.734T>C	Benign/Deleterious		Non reported
<i>APOA5</i>	#7	4	p.(Gln97*) ^a	NM_052968.4(APOA5):c.289C>T		Yes	Charière 2009 (3); Dussailant 2012 (8); Chokshi 2014 (9)
	#8	4	p.(Tyr110Leufs*158) ^a	NM_052968.4(APOA5):c.327dup		Yes	Di Filippo 2014 (10)
	#9	4	p.(Arg143Alafs*57)	NM_052968.4(APOA5):c.427del		Yes	Do 2015 (11)
	#10	4	p.(Leu198Argfs*65)	NM_052968.4(APOA5):c.593_606del		Yes	Non reported
	#11	4	p.(Leu253Pro)	NM_052968.4(APOA5):c.758T>C	Probably damaging/deleterious		Mendoza Barbera 2013 (12)
	#12	4	p.(Gln295*) ^a	NM_052968.4(APOA5):c.883C>T		Yes	Di Filippo 2014 (10)
	#13	4	p.(Ala315Val) ^b	NM_052968.4(APOA5):c.944C>T	Probably damaging/deleterious		Do 2015 (11); Hubacek 2008 (13)
<i>APOE</i>	#14	4	p.(Arg163Cys)	NM_000041.3(APOE):c.487C>T	Probably damaging/Deleterious		Rall 1983 (14)

Each mutation was described only in one patient and no patient had more than one mutation.

In silico analysis of the mutations was performed with Alamut v2.0 (Interactive Software), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html).

^a mutation already published by our team

^b considered with no major deleterious effects according previous reports

Table S3. Common genetic variants identified in candidate genes in MCM patients.

Gene	Exon	Trivial name (protein effect)	Systematic name (DNA level)		Allele frequency European population ^a	Allele frequency in MCM cohort	References
<i>LPL</i>	2	p.(Asp36Asn) ^b	NM_000237.2(LPL):c.106G>A	rs1801177	0.01512	0.025	Zhang 1996 (15)
	6	p.(Asn318Ser) ^b	NM_000237.2(LPL):c.953A>G	rs268	0.02017	0.033	Zhang 1996 (15)
<i>APOA5</i>	3	p.(Ser19Trp)	NM_052968.4(APOA5):c.56C>G	rs3135506	0.0864	0.200	Talmud 2004(16)
<i>GPIHBP1</i>	1	p.(Phe14Cys)	NM_178172.5(GPIHBP1):c.41T>G	rs11538389	0.1062	0.075	Charriere 2011(2)
<i>LMF1</i>	8	p.(Arg364Gln)	NM_022773.2(LMF1):c.1091G>A	rs35168378	0.03568	0.057	Surendran 2012 (17)
<i>APOC3</i>	3'UTR		c.*40G>C	rs5128	0.1611	0.150	Song 2014(18)
<i>APOE</i>	4	(ε4) p.(Cys130Arg) ^b	NM_000041.3(APOE):c.388T>C	rs429358	0.2078	0.144	Rall 1992(19)
	4	(ε2) p.(Arg176Cys) ^b	NM_000041.3(APOE):c.526C>T	rs7412	0.106	0.144	Rall 1992(19)

^a <http://exac.broadinstitute.org/>

^b Old nomenclatures: p.D9N, p.N291S, C112R and R158C.

Supplementary References

1. Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Draï J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart J-C, Durlach V, Moulin P. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J. Clin. Invest.* 2005;115(10):2862–2869.
2. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, Delay M, Debard C, Lefai E, Lachaux A, Moulin P, Marçais C. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(10):E1675-1679.
3. Charrière S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, Charcosset M, Pruneta-Deloche V, Merlin M, Billon S, Delay M, Sassolas A, Moulin P, Marçais C. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis* 2009;207(1):150–156.
4. Chan LYS, Lam C-W, Mak Y-T, Tomlinson B, Tsang M-W, Baum L, Masarei JRL, Pang C-P. Genotype-phenotype studies of six novel LPL mutations in Chinese patients with hypertriglyceridemia. *Hum. Mutat.* 2002;20(3):232–233.
5. Pruneta-Deloche V, Marçais C, Perrot L, Sassolas A, Delay M, Estour B, Lagarde M, Moulin P. Combination of circulating antilipoprotein lipase (Anti-LPL) antibody and heterozygous S172 fsX179 mutation of LPL gene leading to chronic hyperchylomicronemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90(7):3995–3998.
6. Reina M, Brunzell JD, Deeb SS. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J. Lipid Res.* 1992;33(12):1823–1832.
7. Ebara T, Endo Y, Yoshiike S, Tsuji M, Taguchi S, Murase T, Okubo M. A 60-y-old chylomicronemia patient homozygous for missense mutation (G188E) in the lipoprotein lipase gene showed no accelerated atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2007;386(1–2):100–104.
8. Dussaillant C, Serrano V, Maiz A, Eyheramendy S, Cataldo LR, Chavez M, Smalley SV, Fuentes M, Rigotti A, Rubio L, Lagos CF, Martinez JA, Santos JL. APOA5 Q97X mutation identified through homozygosity mapping causes severe hypertriglyceridemia in a Chilean consanguineous family. *BMC Med. Genet.* 2012;13:106.
9. Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Lipidol.* 2014;8(3):287–295.
10. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, Merlin M, Nollace A, Valéro R, Lagarde M, Pruneta-Deloche V, Moulin P, Sassolas A. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PloS One* 2014;9(5):e96482.
11. Do R, Stitzel NO, Won H-H, Jørgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, Kiezun A, Farrall M, Goel A, Zuk O, Guella I, Asselta R, Lange LA, Peloso GM, Auer PL, NHLBI Exome Sequencing

- Project, Girelli D, Martinelli N, Farlow DN, DePristo MA, Roberts R, Stewart AFR, Saleheen D, Danesh J, Epstein SE, Sivapalaratnam S, Hovingh GK, Kastelein JJ, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J, Shah SH, Kraus WE, Davies R, Nikpay M, Johansen CT, Wang J, Hegele RA, Hechter E, Marz W, Kleber ME, Huang J, Johnson AD, Li M, Burke GL, Gross M, Liu Y, Assimes TL, Heiss G, Lange EM, Folsom AR, Taylor HA, Olivieri O, Hamsten A, Clarke R, Reilly DF, Yin W, Rivas MA, Donnelly P, Rossouw JE, Psaty BM, Herrington DM, Wilson JG, Rich SS, Bamshad MJ, Tracy RP, Cupples LA, Rader DJ, Reilly MP, Spertus JA, Cresci S, Hartiala J, Tang WHW, Hazen SL, Allayee H, Reiner AP, Carlson CS, Kooperberg C, Jackson RD, Boerwinkle E, Lander ES, Schwartz SM, Siscovick DS, McPherson R, Tybjaerg-Hansen A, Abecasis GR, Watkins H, Nickerson DA, Ardisson D, Sunyaev SR, O'Donnell CJ, Altshuler D, Gabriel S, Kathiresan S. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature* 2015;518(7537):102–106.
12. Mendoza-Barberá E, Julve J, Nilsson SK, Lookene A, Martín-Campos JM, Roig R, Lechuga-Sancho AM, Sloan JH, Fuentes-Prior P, Blanco-Vaca F. Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 2013;54(3):649–661.
 13. Hubacek JA, Wang W-W, Skodová Z, Adámková V, Vráblík M, Horínek A, Stulc T, Ceska R, Talmud PJ. APOA5 Ala315>Val, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, is a common mutation with no major effects on plasma lipid levels. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008;46(6):773–777.
 14. Rall SC, Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982;79(15):4696–4700.
 15. Zhang H, Henderson H, Gagne SE, Clee SM, Miao L, Liu G, Hayden MR. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. *Biochim. Biophys. Acta* 1996;1302(2):159–166.
 16. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J. Biol. Chem.* 2005;280(31):28215–28220.
 17. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, Kuivenhoven JA, Hosseini M, Péterfy M, Kastelein JJP, Johansen CT, Hegele RA, Stroes ESG, Dallinga-Thie GM. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med.* 2012;272(2):185–196.
 18. Song Y, Zhu L, Richa M, Li P, Yang Y, Li S. Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015;14(1). doi:10.1186/s12944-015-0027-0.
 19. Rall SC, Mahley RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J. Intern. Med.* 1992;231(6):653–659.

2. ARTICLE 2

Single, short in-del, and copy number variations detection in monogenic dyslipidemia using an NGS strategy

Marmontel O, Charrière S, Simonet T, Bonnet V, Dumont S, Mahl M, Jacobs C, Nony S, Chabane K, Bozon D, Janin A, Peretti N, Lachaux A, Bardel C, Millat G, Moulin P, Marçais C, Di Filippo M. *Clinical genetics*. 2018. *Clin Genet* 2018 Mar 2. doi: 10.1111/cge.13250

Cette étude décrit une nouvelle stratégie de séquençage de nouvelle génération pour l'exploration des gènes les plus prévalents dans les HTG, les hypercholestérolémies, et les hypocholestérolémies (*ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*). Cette stratégie est basée sur la combinaison d'un panel personnalisé Ampliseq™ et d'un séquençage sur séquenceur Ion PGM™. Dans un premier temps, cette méthode a été évaluée et validée sur une cohorte de 75 patients, pour lesquels nous avons déjà identifié de manière conventionnelle des variants nucléotidiques ou des petites insertions/délétions. Grâce au développement d'outils bio-informatiques par le Service de Biostatistiques des Hospices Civils de Lyon et des collègues, rapidement nous avons également été capables de contrôler les régions couvertes et de détecter de grands réarrangements. Ensuite, nous avons testé cette approche de façon prospective sur une cohorte de 140 patients dyslipidémiques : nous avons identifié 87 variants nucléotidiques ou petites insertions/délétions et 4 grands réarrangements. Grâce au séquençage simultané des 9 gènes, nous avons pu mettre en évidence 28 variants qui n'auraient pas été identifiés avec notre stratégie précédente, permettant ainsi d'améliorer la compréhension des interactions gène-gène dans les modulations de phénotype, la fiabilité et le rendement du diagnostic moléculaire des dyslipidémies primitives.

ORIGINAL ARTICLE

Single, short in-del, and copy number variations detection in monogenic dyslipidemia using a next-generation sequencing strategy

O. Marmontel^{1,2} | S. Charrière^{2,3} | T. Simonet^{4,5} | V. Bonnet¹ | S. Dumont¹ | M. Mahl⁶ | C. Jacobs¹ | S. Nony¹ | K. Chabane⁷ | D. Bozon⁸ | A. Janin⁸ | N. Peretti^{2,9} | A. Lachaux^{9,10} | C. Bardel^{4,5} | G. Millat⁸ | P. Moulin^{2,3} | C. Marçais^{2,6,11} | M. Di Filippo^{1,2}

¹Servicede Biochimie et Biologie moléculaire Grand Est, GHE, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

²Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Villeurbanne, France

³Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, GHE, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

⁴Servicede Biostatistique-Bioinformatique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, Villeurbanne, France

⁶Centre de Biologie Sud, Laboratoire de Biochimie moléculaire et métabolique, GHE, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Benite, France

⁷Laboratoire d'hématologie, Biologie Moléculaire, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Benite, France

⁸Plateforme NGS CHU Lyon, GHE, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

⁹Servicede Gastroentérologie Hépatologie et Nutrition Pédiatrique, GHE, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

¹⁰INSERM U 1111, Faculté de médecine Lyon Est, Université Lyon 1, Lyon, France

¹¹CENS, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Oullins, France

Correspondence

Orlane Marmontel, Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Service de biochimie et biologie moléculaire, 59 Bd Pinel, F-69677 Bron, France.
Email: orlane.marmontel@chu-lyon.fr

Optimal molecular diagnosis of primary dyslipidemia is challenging to confirm the diagnosis, test and identify at risk relatives. The aim of this study was to test the application of a single targeted next-generation sequencing (NGS) panel for hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, and hypertriglyceridemia molecular diagnosis. NGS workflow based on a custom AmpliSeq panel was designed for sequencing the most prevalent dyslipidemia-causing genes (*ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*) on the Ion PGM Sequencer. One hundred and forty patients without molecular diagnosis were studied. *In silico* analyses were performed using the NextGENe software and homemade tools for detection of copy number variations (CNV). All mutations were confirmed using appropriate tools. Eighty seven variations and 4 CNV were identified, allowing a molecular diagnosis for 40/116 hypercholesterolemic patients, 5/13 hypocholesterolemic patients, and 2/11, hypertriglyceridemic patients respectively. This workflow allowed the detection of CNV contrary to our previous strategy. Some variations were found in previously unexplored regions providing an added value for genotype-phenotype correlation and familial screening. In conclusion, this new NGS process is an effective mutation detection method and allows better understanding of phenotype. Consequently this assay meets the medical need for individualized diagnosis of dyslipidemia.

KEYWORDS

copy number variation, genotype phenotype correlation, Ion torrent PGM, monogenic dyslipidemia, targeted next-generation sequencing

1 | INTRODUCTION

Dyslipidemia is a commonly encountered clinical condition and an important determinant of ischemic cardiovascular disease. In familial

hypercholesterolemia (FH) (OMIM #143890 and +107730), the most frequent monogenic dominant dyslipidemia, diagnostic algorithms such as the Dutch Lipid Clinic Network Criteria (DLCNC) can be used to evaluate the clinical relevance of genetic tests.¹⁻³ The most

common cause of FH is the presence of mutation in the LDL receptor gene (*LDLR*), involved in the cellular uptake of LDL, and a recurrent mutation in the *APOB* gene, c.10580G>A variation.⁴ In some cases, gain of function mutations were found in the proprotein convertase subtilisin/kexin gene (*PCSK9*) which is involved in *LDLR* degradation.^{4,5} Familial hypobetalipoproteinemia (FHBL) is characterized by a concentration of LDL cholesterol (LDLc) and apolipoprotein B (apoB) below the 5th age- and sex-specific percentile.^{6–8} In more than 50% of cases, mutations are found at heterozygous state in the *APOB* gene (FHBL1 OMIM #615558), essential for the assembly and the secretion of triglyceride-rich lipoproteins. In some cases, loss of function mutations is found in *PCSK9*.^{9,10} Severe hypertriglyceridemia (HTG), defined by a triglyceride (TG) level >10 mmol/L, is a rare condition corresponding to recessive monogenic familial chylomicronemia syndrome (FCS, OMIM #238600) in rare cases and most frequently to oligogenic multifactorial chylomicronemia (MCM, OMIM #144650).^{11,12} Genetic determinants in FCS include homozygous or compound heterozygous mutations in the lipoprotein lipase gene (*LPL*), and/or its cofactors: apolipoprotein (apo) AV (*APOA5*) and CII (*APOC2*), glycosylphosphatidylinositol anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (*GPIHBP1*), and lipase maturation factor 1 (*LMF1*) genes.^{13–16}

These lipid disorders are due to single nucleotide variation (SNV), short insertion/deletion (in-del), or large scale deletion/duplication spanning whole exons known as copy number variation (CNV) on concerned genes.^{4,15} Moreover, recent studies have showed the necessity to extend the gene regions to study (hypercholesterolemic mutations in *APOB* gene regions not explored in FH patients),^{17,18} to extend the number of genes considered (such as heterozygous *ANGPTL3* mutations carriers exhibiting FHBL phenotype)^{19,20}; and to study complex modulations of phenotype.²¹

As NGS panel approach successfully detected genetic alterations for the diagnosis of FH or HTG,^{22–24} we tested the clinical applicability of a custom AmpliSeq panel sequenced on the Ion PGM Sequencer for the detection of mutations in the most frequent dyslipidemia-related genes (*ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*). Because software allowing CNV detection had been previously validated in others areas,^{25–27} we developed a bioinformatic pipeline, including CNV detection for genotyping primary dyslipidemia. The aim of this study was to test the benefits of this NGS workflow in a cohort of dyslipidemic patient without molecular diagnosis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

The patients group included 140 consecutive (recruited between August, 2015 and September, 2016) and apparently unrelated patients from Hospices Civils de Lyon, without any prior molecular data. Lipid profiles were determined as previously described.²⁸ Following exclusion of secondary causes, they met clinical criteria for primary dyslipidemia. FH patients ($n = 116$) met the criteria of the New French Society of Atherosclerosis (NFSa; LDLc above

4.9 mmol/L for adults and above 4.1 mmol/L for pediatric patients, with a context of autosomal dominant transmission, premature cardiovascular disease, and/or cholesterol deposition),³ or when calculable, presented with DLCNC score ≥ 3 for adult patients (patients with a DLCNC score between 3 and 5 (39.7%) were classified as having "possible" FH, those with a score between 6 and 8 (23.3%) as having "probable" FH, and those with a score above 8 (12.1%) as having "definite" FH). FHBL patients ($n = 13$) had LDLc and apoB concentrations below the 5th age- and sex-specific percentile. Eleven patients presented with history of severe HTG defined as TG>15 mmol/L or familial history of HTG with TG>10 mmol/L.

The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the patients or their parents, according to the French bioethics law.

2.2 | NGS workflow

After Genomic DNA extraction, libraries were constructed using the Ion AmpliSeq Library Kit v2.0 (Life Technologies, Carlsbad, California), including coding DNA sequence and flanking introns (exon padding: ± 20 bp) in the following genes: *ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*. Amplified libraries were sequenced on Ion PGM (Life Technologies). Bioinformatic analyses were performed as previously described, except for the adjusted alignment settings²⁹ (default settings except for an activation of the "detect large in-del," a deactivation of the "hide unmatched ends" functionalities, a decrease of the in-dels mutation percentage to 15% and a homopolymer in-del balance frequency set at 20%).

Sequencing depth for each base was studied using a custom tool, DeCovA, developed by one of the authors (TS) (available upon request to thomas.simonet@chu-lyon.fr).³⁰ According to previous studies, we considered that only exons and their adjacent boundaries sequences with a read depth above 30 reads (30X) for each targeted nucleotide were appropriately covered.³¹

For CNV analysis, read depths of all amplicons, for all samples of the same sequencing run, were obtained using the coverage analysis plugin of the Ion torrent Browser. Amplicon read depths (ARDs) were then normalized by the sum of all ARDs from the same sample (ARDs of the same gene were subtracted). A copy number ratio (CNR) was obtained dividing the ARD of the sample by the mean ARD of all the samples as control: $CNR_x = (ARD_x / \sum ARD_{1>n})_{sample} / (ARD_x / \sum ARD_{1>n})_{control}$. CNRs <0.7 or > 1.3 in at least 2 consecutive regions were considered as deletion or gain, respectively. All identified CNV were confirmed by MLPA or droplet digital PCR (ddPCR).

The NGS workflow was validated using a training group of 75 patients with dyslipidemia-causing variations previously identified by conventional methods (see Supporting Information in Appendix S1).

2.3 | Sanger sequencing

Variations identified by NGS bioinformatics were further verified by conventional dideoxy sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). After purification,

sequencing products were applied onto an ABI 3730 automatic sequencer (Applied Biosystem, Forrester City, California).

2.4 | Confirmation of copy number variations

In case of CNV suspicion in the test group, the samples were analyzed either by MLPA (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) with a ABI 3730 automatic sequencer (Applied Biosystem) or by ddPCR (Bio-Rad, Hercules, California; see Supporting Information in Appendix S1) for confirmation, according to the manufacturer's protocol.

2.5 | Interpretation and classification of variations found

Mutations were named according to HGVS recommendations using the following gene references: *LDLR*: NM_000527.4; *PCSK9*: NM_174936.3; *ANGPTL3*: NM_014495.3; *APOB*: NM_000384.2; *APOA5*: NM_001166598.1; *LPL*: NM_000237.2.

Analyses of the mutations were performed with Alamut v2.9 software (Interactive Biosoftware, Rouen, France), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)³² and SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html).³³ Several algorithms were used for computational scoring of 5' and 3' splice sites based on different concepts using default parameter settings: Neural Network Splice Prediction (NNSplice),³⁴ MaxEntScan,³⁵ Splice site Finder Like, GeneSplicer, human splicing finder.³⁶

The LOVD, the ClinVar and the Professional Human Gene Mutation databases were screened for variant evaluation (www.lovd.nl/ and www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/).^{37,38}

Variations considered in this study were classified according to the American College of Medical Genetics and Association of Medical Pathologists (ACMG) guideline.³⁹

3 | RESULTS

The lipid profiles of the patients were shown in Table 1.

3.1 | Familial hypercholesterolemia

A FH-causing variation (pathogenic or probably pathogenic) was found in 40/116 patients, corresponding to a detection rate of 34.5%. The detection rate in the groups of patients according to DLCNC was the following: definite FH 92.9%; probable FH 22.2%; possible FH 17.4%; and 44.8% in the subgroup without DLCNC score available (Figure 1).

LDLR gene: A total of 33 (82.5%) patients were carriers of probably pathogenic or pathogenic SNV of *LDLR*, with 29 different SNV distributed as followed: 2 frameshift variations (6.9%), 3 nonsense variations (10.3%), 21 missense or small in-frame deletion/insertion (72.4%) and 3 splice site variations (10.3%; Table S5). Three probably pathogenic or pathogenic SNV, according to ACMG guidelines, were not reported previously for *LDLR* (Table 2). Interestingly, 1 patient was found to be carrier of a pathogenic SNV in the donor splice site of *LDLR* intron 6 (c.940+2T>C). In addition, 2 rare missense SNV in

TABLE 1 Biological data and clinical features of the patients

	FH		FHBL		HTG	
	n		n		n	
Age (year)	116	48.3 ± 17.6 (4-90)	13	26.4 ± 23.1 (0-70)	11	40.1 ± 17.8 (0-66)
Premature coronary artery disease	14/103		NA	NA	NA	NA
Premature cerebral or peripheral vascular disease	12/103		NA	NA	NA	NA
Nonalcoholic steatohepatitis	NA		2/13		3/11	
TC (mmol/L)	111	7.51 ± 1.98 (2.6-15.3)	13	2.75 ± 0.44 (2.09-3.47)	11	8.44 ± 6.80 (4.49-28.31)
TG (mmol/L)	111	1.35 [1.43-1.92] (0.54-7.85)	13	0.51 [0.41-0.75] (0.25-1.25)	11	6.15 [3.07-22.8] (0.48-40.44)
HDLc (mmol/L)	111	1.32 ± 0.38 (0.62-2.8)	13	1.32 ± 0.37 (1.02-2.07)	11	0.77 ± 0.32 (0.32-1.34)
LDLc (mmol/L) all	108	5.46 ± 1.88 (1.27-14.31)	13	1.07 ± 0.26 (0.61-1.56)	10	2.58 ± 1.75 (0.99-7.19)
Pediatric patients (0-17 years)	10	6.90 ± 3.18 (3.83-14.31)				
Adults without lipid lowering drug	48	6.27 ± 1.15 (4.51-9.09)				
Adults under lipid lowering drug	50	4.42 ± 1.50 (1.27-10.49)				
ApoB (g/L)	66	1.47 ± 0.46 (0.64-2.83)	13	0.31 ± 0.10 (0.15-0.47)	10	1.17 ± 0.51 (0.51-2.11)

Abbreviations: Apo, apolipoprotein; FH, familial hypercholesterolemia; FHBL, familial hypobetalipoproteinemia; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; HTG, hypertriglyceridemia; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides (assessment was often performed several weeks after the initial decompensation). Variables are presented as mean ± SD and (minimum-maximum), except for TG presented as median [95% interval of confidence]. Premature = <55 years in men; <60 years in women. Nonalcoholic steatohepatitis was considered in case of ALAT above the upper limit of reference range.

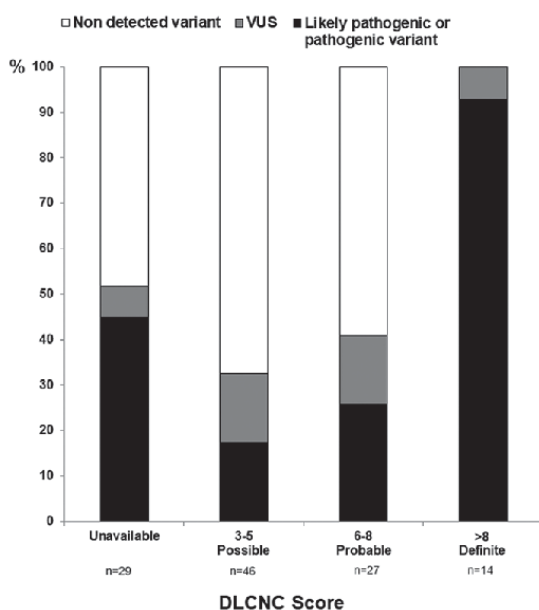


FIGURE 1 Variation detection rate in FH patients according to DLCNC score FH patients (n = 116) include patients meeting the criteria of the New French Society of Atherosclerosis black: patients carrier of pathogenic or probably pathogenic variation in *LDLR* or *APOB*; dark gray: patients carrier of variant of unknown significance (VUS) in *LDLR*, *APOB* or *PCSK9*; white: patients without variation identified or with benign variation. Distributions were significantly different between groups ($P < .001$, χ^2 test)

APOB, c.3679G>A and c.12116T>G, located in previously non-explored regions, were found using this new strategy and classified as VUS according to the ACMG guidelines. The *APOB* c.3679G>A variation was not reported yet in GnomAD consortium and was considered *in silico* as tolerated (SIFT) to pathogenic (PolyPhen). This variation is located at the end of exon 23. Using all the software, the score of a cryptic splice site in position c.3675 was shown to be increased, leading to a score greater than the natural splice site. *in vitro* minigene splicing assay was performed and showed a partial effect on splicing leading to an in-frame deletion of 21 bp/7 residues (Val1226 to Val1232) (see Supporting Information in Appendix S1). The second *APOB* variation (c.12116T>G) was reported twice in the GnomAD database with a frequency of 0.0017% and was considered as deleterious *in silico* (SIFT, PolyPhen). A familial study was conducted (Figure S3) and found a cosegregation of the *LDLR* variation with hypercholesterolemia in the son. Surprisingly, the daughter exhibited hypobetalipoproteinemia and was found to be a heterozygous carrier of the *APOB* c.12116T>G variation only. A larger segregation study is mandatory to determine the specific effect of each *APOB* variation.

CNV were identified in 3 patients (7.5%) and then confirmed by MLPA (Figure 2): 1 patient was carrier of a deletion of exons 9 and 10 of *LDLR* and 2 patients, apparently not related, were carriers of deletion of exons 2 to 5 of *LDLR*. Based on DLCNC score lower than

5 and according to our previous molecular exploration strategy (Figure S1), the MLPA would not have been performed and these CNV would have been missed before this NGS strategy.

***APOB* gene:** The c.10580G>A variation was found in 4 non-related patients (10% of FH-causing mutation). All heterozygous carriers of the c.10580G>A variation were also heterozygous carriers of the c.7696G>A variation (VUS); 1 patient was found to be carrier of c.7696G>A and was not carrier of the c.10580G>A.

Overall, 15/116 FH patients were carriers of a VUS: 4 in *LDLR*, 10 in *APOB* and 1 in *PCSK9*, which will require a familial segregation study or an *in vitro* functional study to evaluate their putative pathogenic effect (see Table S5). One patient was found to be carrier of a known variation on *APOB* gene, c.10672C>T, that could be considered as modulator of phenotype or as factor of susceptibility.^{40,41}

3.2 | Familial hypobetalipoproteinemia

A disease causing variation (pathogenic or probably pathogenic) was found in 5/13 hypobetalipoproteinemic patients, corresponding to a detection rate of 38.4%. They were found to be carriers of 5 different nonsense or frameshift variations in *APOB*, including 4 previously unreported variations (Table 2). Only the c.7537C>T variation in *APOB* was previously reported.^{42,43} One patient was carrier of a VUS in *APOB* (c.11401T>A); unfortunately, the familial study could not be conducted in order to evaluate the impact of this variation.

Additional variations were found simultaneously on *ANGPTL3* (second level gene) using this NGS strategy. A type 2 diabetic patient was both carrier of a heterozygous *APOB* nonsense variation (c.1920C>A) and a previously described probably pathogenic variation in *ANGPTL3* (c.286_288del).⁴⁴ This patient exhibited very low LDLc (0.99 mmol/L), apoB (0.27 g/L) and low TG (0.38 mmol/L); HDLc was within the normal range (1.32 mmol/L). His sister carried only the c.286_288del in *ANGPTL3* and exhibited a lipid profile within the normal ranges (TC: 5.42 mmol/L; HDLc: 2.04 mmol/L; TG: 0.72 mmol/L; LDLc: 3.05 mmol/L). Another patient, with very low LDLc (1.01 mmol/L) and low-apoB level (0.37 g/L), was a heterozygous carrier of the c.11401T>A variation in *APOB* and the c.379C>T variation in *ANGPTL3*, both considered as VUS. The genetic exploration in 2 sisters with persistent low LDLc found 3 benign or probably benign variations in *APOB* inherited from their father and 1 *ANGPTL3* VUS inherited from their mother who also had low LDLc (Figure S4).

In the *PCSK9* gene, only the common c.137G>T, associated with mild decrease of LDLc,^{10,45} was found in 1 patient who also exhibited an c.6895G>C variation in *APOB* classified as VUS.

3.3 | Hypertriglyceridemia

Disease causing variations were found in 2/11 patients. One patient was a compound heterozygous carrier for probably pathogenic variations in the *LPL* gene. The c.642A>C variation not previously reported was inherited from his mother. He was also carrier of a large deletion of exons 3 to 7, inherited from his father, which would not have been detected with the previous strategy (Figure 3). This 2-month-old boy had severe HTG (87 mmol/L) at 1 month of age complicated by acute pancreatitis.

TABLE 2 List of previously unreported variations

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	ExAC frequency (all, %)	Residue conservation	Grantham distance	Functional domain	SIFT	PolyPhen	Mutation taster	Alamut visual splicing predictions	ACMG interpretation
FH	APOB	23	c.3679G>A	p.(Gly1227Ser)	NA	NA	++	56	Lipid binding domain	T	POSDA	DC	5	VUS
FH	APOB	26	c.4733A>G	p.(Tyr1578Cys)	rs376571830	0.00042%	++	194	Lipid binding domain	D	PRODA	Poly	0	VUS
FH	APOB	26	c.7336G>A	p.(Val2444Met)	rs777259835	0.0049%	+	21	NA	T	B	Poly	0	VUS
FH	APOB	26	c.9242G>C	p.(Ser3081Thr)	rs72653100	0.0098%	++	58	Receptor binding domain	T	B	Poly	0	VUS
FH	APOB	26	c.9727C>T	p.(Pro3243Ser)	rs3722260836	0.00083%	++	74	Receptor binding domain	T	POSDA	DC	0	VUS
FH	APOB	26	c.10114T>G	p.(Ser3372Ala)	rs138850232	0.0017%	++	99	Receptor binding domain	T	PRODA	DC	4*	VUS
FH	APOB	26	c.11138A>C	p.(Asn3713Thr)	NA	NA	++	65	NA	D	POSDA	Poly	0	VUS
FH	APOB	29	c.12116T>G	p.(Phe4039Cys)	rs765643246	0.0017%	++	205	NA	D	POSDA	Poly	0	VUS
FH	LDLR	10	c.1414G>A	p.(Asp472Asn)	NA	NA	++	23	EGF like domain (YWTD rich repeats)	T	B	Poly	0	Probably pathogenic
FH	LDLR	12	c.1820_1822dup	p.(His607dup)	NA	NA	NA	NA	EGF like domain (YWTD rich repeats)	NA	NA	NA	NA	Probably pathogenic
FH	LDLR	14	c.2087G>C	p.(Cys696Ser)	NA	NA	+++	112	EGF like domain (repeat C)	D	PRODA	DC	0	Probably pathogenic
FH	LDLR	9-10	c.(1186+1_1187-1)_ (1586+1_1587-1)del	p.(Gly396Alafs*19)	NA	NA	NA	NA	EGF like domain (YWTD rich repeats)	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FH	LDLR	2-5	c.(67+1_68-1)_ (817+1_818-1)del	p.(Gly24_Val273del)	NA	NA	NA	NA	Ligand binding	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FH	PCSK9	2	c.384C>T	p.(=)	rs72646503	0.012%	NA	NA	Pro-domain	NA	NA	NA	0	Probably benign
FHBL	ANGPTL3	1	c.228C>G	p.(Asn76Lys)	rs149086653	0.18%	+++	94	Coiled-coil domain	T	PRODA	DC	0	VUS
FHBL	APOB	14	c.1920C>A	p.(Tyr640*)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	22	c.3365del	p.(Gly1122Valfs*63)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	26	c.6316C>T	p.(Gln2106*)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	26	c.10848del	p.(Gly3617Alafs*6)	NA	0.00081%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	29	c.12699G>A	p.(=)p.Ser4233Ser	rs56675344	0.051%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	Probably benign
HTG	APOA5	4	c.887T>G	p.(Ile296Arg)	rs761343549	0.000037	+++	97	NA	D	PRODA	DC	0	VUS
HTG	LPL	5	c.642A>C	p.(Arg214Ser)	NA	NA	+++	110	NA	D	PRODA	DC	0	Probably pathogenic
HTG	LPL	3-7	c.(249+1_250-1)_ (1139+1_1140-1)del	p.(Val84Alafs*2)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic

Abbreviations: ACMG, American College of Medical Genetics and Association of Medical Pathologists; B, benign; D, deleterious; DC, disease causing; FH, familial hypercholesterolemia; FHBL, familial hypobetalipoproteinemia; HTG, hypertriglyceridemia; NA, not applicable; poly, polymorphism; POSDA, possibly damaging; PRODA, probably damaging; T, tolerated; VUS, variant of unknown significance; LDLR, NM_000527.4; PCSK9, NM_174936.3; ANGPTL3, NM_014495.3; APOB, NM_000384.2; APOA5, NM_001166598.1; LPL, NM_000237.2. Residue conservation: + = low; ++ = medium; +++ = important. Alamut visual splicing predictions: number out of 5 software predicting activation of a cryptic splice site or a decrease above 10% for the score of natural splice site.

* Minigene splicing reporter assay was not performed giving that the variant is located into exon 26, far away from natural acceptor splice site.

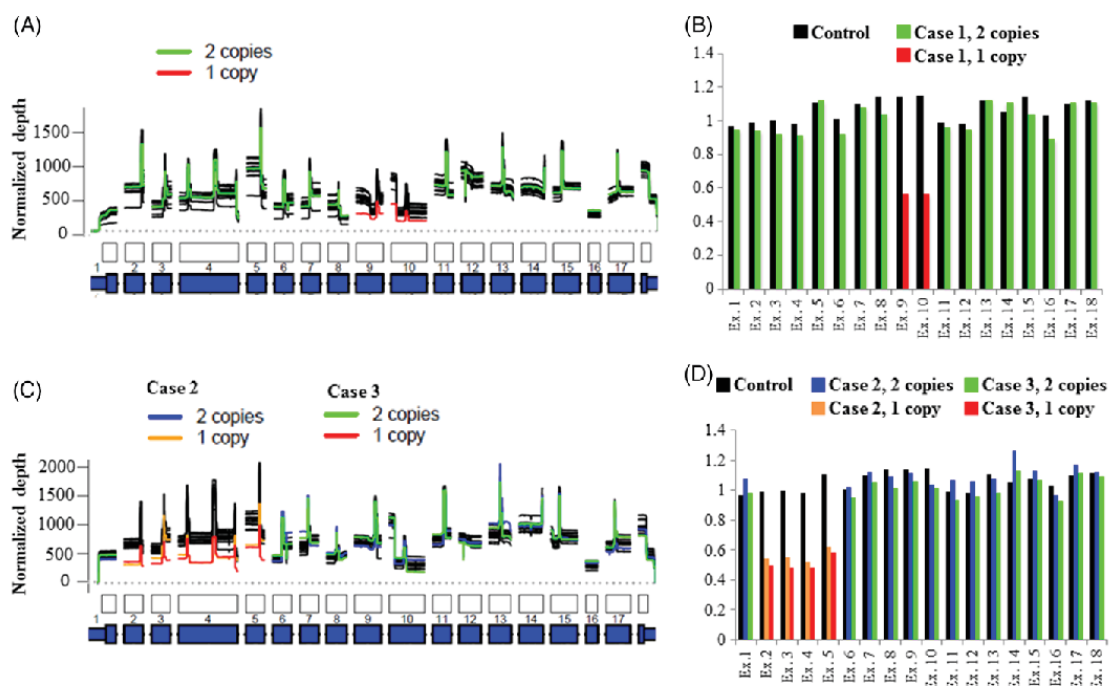


FIGURE 2 Detection of copy number variations (CNV) in *LDLR* by Ampliseq custom panel with Ion torrent PGM sequencer and confirmation by MLPA for deletion of *LDLR* exons 9 and 10 (panel A and B), and for deletion of *LDLR* exons 2 to 5 (panel C and D). (A) and (C) Detection of CNV by Ampliseq custom panel with Ion torrent PGM sequencer. Graph showing the per base read depth by sample, normalized to the total number of reads falling into target regions: exons with 2 copies are shown in green for cases 1 (A) and 3 (C) and in blue for case 2 (C); exons in only 1 copy are shown in red for cases 1 (A) and 3 (C) and in orange for case 2 (C). The normalized depths of other samples in the assay are shown in black; below are the targeted regions (white box) and exons of NM_000527.4 (blue box). (B) and (D) MLPA confirmation. Test peak height/pool control peak height. Control (black bar); patients were represented with the same color code: exons with 2 copies are shown in green for cases 1 (B) and 3 (D) and in blue for case 2 (D); exons in only 1 copy are shown in red for cases 1 (B) and 3 (D) and in orange for case 2 (D). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

One patient was a heterozygous carrier of a pathogenic variation in *LPL*, c.829G>A,⁴⁶ in association with a previously unreported VUS in *APOA5*, c.887T>G, and a common *APOA5* variation associated with TG concentration, c.56C>G.⁴⁷

In 5 other patients (45.4%), only the common variation c.56C>G was found in *APOA5*, and no sequence variation was identified in the remaining 4 patients (36.4%). No variation was found in *LMF1* and *APOC2* genes.

4 | DISCUSSION

Collective consideration of our data shows that NGS workflow, combining the AmpliSeq custom panel with Ion torrent PGM sequencer, was highly informative for identifying pathogenic variations.

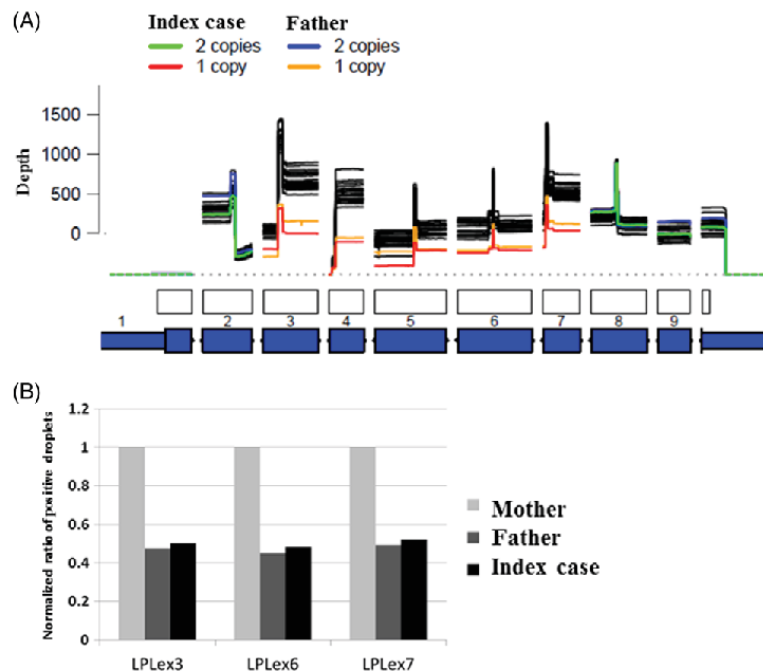
First, clinical implementation of this NGS workflow is feasible because the observed performances for SNV detection are similar to our previous strategy: 100% of the SNV were found in the validation step (see Supporting Information in Appendix S1). Moreover, we observed an overall detection rate of 38.4% for FHBL and 34.5% for FH, which is similar to that reported elsewhere.^{8,48–50} For FH, the detection rate was substantially improved when DLCNC score was

applied, reaching 92.9% in definite FH, which was similar to that obtained by Bertolini et al.⁵¹

In addition to SNV detection, this NGS workflow also allows simultaneously CNV detection, a missing step in our previous strategy. Interestingly, as previously described,^{48,51,52} CNV accounted for approximately 10% of *LDLR* FH-causing variation herein. This strengthens the value of the concomitant detection of CNV by this new strategy, as has been recently described.²⁷ It is of note that with the previous strategy, MLPA was only performed in negative patients with DLCNC score above 5 for economic reasons; thus CNV would not have been identified in 2 patients. Moreover, for molecular diagnosis of HTG, the approach used herein identified a CNV in *LPL* gene, which would not had been detected either with our previous strategy and yet to be reported using other NGS strategies published in the field.^{22,23}

Interestingly, this NGS workflow also identified additional variations that would have not been identified with our previous strategy of Sanger sequencing. First, screening of the entire coding regions of *APOB* by NGS instead of focusing on mutation hot spots enhances the discovery of FH mutations. Indeed, we detected among FH patients, 3 variations located outside the commonly sequenced regions of *APOB* exon 26, similarly as previously described.¹⁸ The

FIGURE 3 Detection of copy number variations (CNV) by Ampliseq custom panel with Ion torrent PGM sequencer (A), by ddPCR (B) of family with carrier of compound heterozygous variations in the *LPL* gene. (A) Detection of CNV by Ampliseq custom panel with Ion torrent PGM sequencer. Graph showing the per base read depth by sample, normalized to the total number of reads falling into target regions: exons with 2 copies are shown in green for index case and in blue for his father; exons in only 1 copy are shown in red for index case and in orange for his father. The normalized depths of other samples in the assay are shown in black; below are the targeted regions (white box) and exons of NM_000237.2 (blue box). (B) ddPCR confirmation. Normalized ratio of positive droplets was represented. Deletions were suspected in case of ratio lower than 0.7. Black: mother; orange: father; red: case 10



significance of these variants remains to be established but these 2 observations highlight the importance of screening additional regions of *APOB* in hypercholesterolemic patients. Moreover, in *APOB*, the c.7696G>A variation was found in 4/4 carriers of the c.10580G>A confirming the strong linkage disequilibrium between these variations^{21,53} and raising the question of the respective contribution of these variations to defective LDL uptake and/or secretion.

The AmpliSeq NGS approach also provides the ability to detect several low-frequency variations which facilitates the detection of phenotype modulation, as previously described in FH carriers of *APOB* variations.^{21,54} In this way, we identified an interesting family combining hyper and hypocholesterolemic phenotype. Identification of 2 VUS on *APOB* in addition to the *LDLR* variation, thanks to our new NGS strategy, justified familial cascade screening and allowed the detection of FHBL phenotype in the kindred. Finally, the concomitant screening of 3 FHBL genes allowed the identification of combined pathogenic variations, which may cause a more severe phenotype. This was the case for a carrier of both *APOB* and *ANGPTL3* variations who had extremely low LDLc.

Despite numerous advantages of this strategy, it is necessary to keep in mind some limits and drawbacks. First, using the adjusted settings, we obtained a maximum of 2 false positive in-dels per patient, and some coding sequences (6%) remained uncovered in our design, which led to the extensive use of conventional Sanger sequencing (2 amplicons for *APOB*, 2 for *PCSK9*, 3 for *ANGPTL3*, 2 for *APOA5*, 2 for *LPL*, 1 for *GPIHBP1*, 1 for *APOC2* and 4 for *LMF1*). Second, this technology does not allow increasing the number of regions explored without decreasing the number the samples tested. Consequently the design of the panel needed a compromise. We included only the main candidate genes involved in monogenic dyslipidemia. For this reason,

we were not able to explore: less frequently involved genes (*APOE*, *STAP1*, *LRP6*...), genes involved in recessive disorders (hypercholesterolemia: *LIPA*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*; hypocholesterolemia: *MTP*, *SAR1B* for example) and polymorphisms included in score of polygenic FH and HTG. It gets even more problematic because genes addition or modification of the designed panel is expensive. Furthermore, upon screening larger regions in more patients, the identification of larger numbers of variations of unknown significance will necessitate further extensive familial segregation, large cascade screening patients cohorts and functional assays increasing the indirect costs.^{17,40,55,56} However, the increase in the contents of updated databases and the improvements in bioinformatic tools allow more efficient filtering of variation.

In conclusion, we describe an effective and robust tool for the molecular diagnosis of SNV and CNV in known genes involved in monogenic dyslipidemia. This new strategy allows identification of additional variations that modulate lipids phenotype and strengthen familial cascade screening.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank physicians and nurses of endocrinology units for recruiting patients and the hospices civils de Lyon for funding this research. We warmly thanks Dr Agnes Sassolas, for her previous work on the subject and Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for expert editorial assistance.

Conflict of interests

Nothing to declare.

ORCID

O. Marmontel  <http://orcid.org/0000-0002-4916-6613>

A. Janin  <http://orcid.org/0000-0003-3571-003X>

G. Millat  <http://orcid.org/0000-0001-6127-0694>

REFERENCES

- Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen general population study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J*. 2016;37(17):1384-1394.
- World Health Organization Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. WHO/HGN/FH/CONS/99.2. 1999 [Internet]. World Health Organization; Geneva; 1999. WHO/HGN/FH/CONS/99.2.
- Famier M, Bruckert E, Boileau C, Krempf M. Nouvelle société française d'athérosclérose. [Diagnostic and treatment of familial hypercholesterolemia (FH) in adult: guidelines from the New French Society of Atherosclerosis (NSFA)]. *Presse Med*. 2013;42(6 Pt 1): 930-950.
- Marduel M, Carrié A, Sassolas A, et al. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Hum Mutat*. 2010; 31(11):E1811-E1824.
- Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2): 154-156.
- Whitfield AJ, Barrett PHR, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem*. 2004;50(10): 1725-1732.
- Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42(5-6):515-545.
- Tarugi P, Avema M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem*. 2011;54:81-107.
- Cohen J, Pertsemidis A, Kotowski IK, et al. Cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005;37(2):161-165.
- Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1264-1272.
- Chait A, Subramanian S, Brunzell JD. Genetic disorders of triglyceride metabolism. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., eds. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326743/> [cited April 13, 2017].
- Stroes E, Moulin P, Parhofer KG, Rebours V, Löhr J-M, Avema M. Diagnostic algorithm for familial chylomicronemia syndrome. *Atheroscler Suppl*. 2017;23:1-7.
- Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia—current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(6):352-362.
- Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-196.
- Rabacchi C, Pisciotto L, Cefalu AB, et al. Spectrum of mutations of the LPL gene identified in Italy in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):79-86.
- Lamiquiz-Moneo I, Blanco-Torrecilla C, Bea AM, et al. Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain. *Lipids Health Dis*. 2016; 15:82.
- Alves AC, Etchebarria A, Soutar AK, Martin C, Bourbon M. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 2014;23(7):1817-1828.
- Motazacker MM, Pirruccello J, Huijgen R, et al. Advances in genetics show the need for extending screening strategies for autosomal dominant hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2012;33(11):1360-1366.
- Minicocci I, Santini S, Cantisani V, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hyperlipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res*. 2013;54(12):3481-3490.
- Wang X, Wang D, Shan Z. Clinical and genetic analysis of a family diagnosed with familial hypobetalipoproteinemia in which the proband was diagnosed with diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2015; 239(2):552-556.
- Huijgen R, Sjouke B, Vis K, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-C levels. *Hum Mutat*. 2012;33(2):448-455.
- Hegele RA, Ban MR, Cao H, McIntyre AD, Robinson JF, Wang J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(2):103-113.
- Cefalu AB, Spina R, Noto D, et al. Identification of a novel LMF1 nonsense mutation responsible for severe hypertriglyceridemia by targeted next-generation sequencing. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1): 272-281.e8.
- Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: new results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl*. 2017;29:17-24.
- Vetro A, Godin D, Lesende I, et al. Diagnostic application of a capture based NGS test for the concurrent detection of variants in sequence and copy number as well as LOH. *Clin Genet*. 2017;93(3):545-556.
- Ellingford JM, Campbell C, Barton S, et al. Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2017;25(6):719-724.
- Iacocca MA, Wang J, Dron JS, et al. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 2017;58:2202-2209.
- Marmontel O, Di Filippo M, Marcias C, et al. Alterations in plasma triglycerides lipolysis in patients with history of multifactorial chylomicronemia. *Atherosclerosis*. 2017;265:22-28.
- Millat G, Chanavat V, Rousson R. Evaluation of a new NGS method based on a custom AmpliSeq library and ion torrent PGM sequencing for the fast detection of genetic variations in cardiomyopathies. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2014;433:266-271.
- Dimassi S, Simonet T, Labalme A, et al. Comparison of two next-generation sequencing kits for diagnosis of epileptic disorders with a user-friendly tool for displaying gene coverage, DeCovA. *Appl Transl Genomics*. 2015;7:19-25.
- Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2013;15(9):733-747.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4): 248-249.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol*. 1997;4(3): 311-323.
- Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol*. 2004;11(2-3):377-394.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67.
- Leigh S, Futema M, Whittall R, et al. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet*. 2017;54(4):217-223.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*. 2017;136(6):665-677.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015;17(5):405-424.
- Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B

- gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 1998;338(22):1577-1584.
41. Rabès 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(10):E76-E82.
 42. Wagner RD, Krul ES, Tang J, et al. ApoB-54.8, a truncated apolipoprotein found primarily in VLDL, is associated with a nonsense mutation in the apoB gene and hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 1991;32(6):1001-1011.
 43. Leren TP, Berge KE. Identification of mutations in the apolipoprotein B-100 gene and in the PCSK9 gene as the cause of hypocholesterolemia. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2008;397(1-2):92-95.
 44. Noto D, Cefaliù AB, Valenti V, et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB gene mutations in subjects with combined hypolipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):805-809.
 45. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1240-1249.
 46. Ishimura-Oka K, Semenkovich CF, Faustinella F, et al. A missense (Asp250→Asn) mutation in the lipoprotein lipase gene in two unrelated families with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Lipid Res*. 1992;33(5):745-754.
 47. Talmud PJ, Martin S, Taskinen M-R, et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res*. 2004;45(4):750-756.
 48. Hooper AJ, Nguyen LT, Bumett JR, et al. Genetic analysis of familial hypercholesterolaemia in Western Australia. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):430-434.
 49. Taylor A, Wang D, Patel K, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet*. 2010;77(6):572-580.
 50. Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2016;18(4):316-324.
 51. Bertolini S, Pisciotto L, Rabacchi C, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013;227(2):342-348.
 52. Wang J, Dron JS, Ban MR, et al. Polygenic versus monogenic causes of hypercholesterolemia ascertained clinically. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(12):2439-2445.
 53. Radovica-Spalvina I, Latkovskis G, Silamikelis I, et al. Next-generation-sequencing-based identification of familial hypercholesterolemia-related mutations in subjects with increased LDL-C levels in a latvian population. *BMC Med Genet*. 2015;16:86.
 54. Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. 2014;55(4):765-772.
 55. 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(3):1225-1234.
 56. Huijgen R, Kindt I, Defesche JC, Kastelein JJP. Cardiovascular risk in relation to functionality of sequence variants in the gene coding for the low-density lipoprotein receptor: a study among 29 365 individuals tested for 64 specific low-density lipoprotein-receptor sequence variants. *Eur Heart J*. 2012;33(18):2325-2330.

SUPPORTING INFORMATION

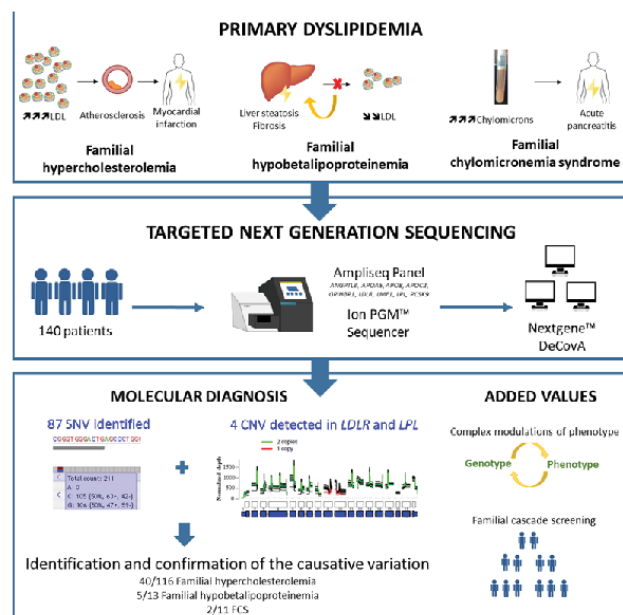
Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Marmontel O, Charrière S, Simonet T, et al. Single, short in-del, and copy number variations detection in monogenic dyslipidemia using a next-generation sequencing strategy. *Clin Genet*. 2018;1-9. <https://doi.org/10.1111/cge.13250>

Graphical abstract

Single, short in-del, and copy number variations detection in monogenic dyslipidemia using a next-generation sequencing strategy

O. Marmontel, S. Charrière, T. Simonet, V. Bonnet, S. Dumont, M. Mahl, C. Jacobs, S. Nony, K. Chabane, D. Bozon, A. Janin, N. Peretti, A. Lachaux, C. Bardel, G. Millat, P. Moulin, C. Marçais, and M. Di Filippo



Supplementary data for materials and methods

Lipid profiles

Total cholesterol (TC), TG, high density lipoprotein cholesterol (HDLc), apoB levels were determined using commercial kits on an Architect C16000 autoanalyzer (ABBOTT Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). LDLc was either calculated by the Friedewald formula if TG levels were under 3.9 mmol/L or determined after preparative ultracentrifugation ($d=1.006$ kg/l) using a Sorval Discovery M150 SE ultracentrifuge (Sorval S140 AT 017 Rotor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1 050 560 g; 70 minutes). After VLDL and chylomicron removal, TC was determined in the remaining fraction (LDL + HDL). LDLc was obtained by the subtraction of the directly measured HDLc (1).

Library preparation

Genomic DNA was extracted from blood samples using the Nucleon Bac3 kit (GE Healthcare[®], Little Chalfont, UK) or the Nucleospin strategy (Macherey Nagel[®], Hoerd, France). Using the Ion AmpliSeq[™] designer software (www.ampliseq.com), the panel was designed to identify disease-causing variation in coding DNA sequence and flanking introns (exon padding: ± 20 bp) in the following genes: *ANGPTL3*, *APOA5*, *APOC2*, *APOB*, *CREB3L3*, *GPIHBP1*, *LDLR*, *LMF1*, *LPL*, *PCSK9*. This panel consisted of two separate PCR primer pools and allowed analysis of 108 coding exons (padding: ± 20 bp) by the targeted sequencing of 274 amplicons (global size: 32.2 kb/patient). Libraries were constructed using the Ion AmpliSeq Library Kit v2.0. Various samples were distinguished by unique barcodes (Ion Xpress[™] Barcode Adapters Kit; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Validation of enrichment and quantification of enriched target DNA were performed on the Caliper LabChip GX using the High Sensitivity assay Kit (Caliper LifeSciences, Waltham, MA, USA) and then pooled in equimolar concentrations.

Ion torrent PGM sequencing

Amplified libraries were submitted to emulsion PCR thanks to the Ion OneTouch[™] 2 system using the Ion PGM[™] Template OneTouch 200 Kit v2 (Life Technologies). Ion sphere particles (ISP) were enriched using the E/S module. Resultant live ISPs were loaded and sequenced on an Ion 316 chip (22

patients) or Ion 318 chip (36 patients; Life Technologies). Samples from the training group were all studied on Ion 316 chip whereas samples from the test group were studied either on Ion 316 chips (6 separate runs) or on two Ion 318 chips.

NGS bioinformatic analyses

Bioinformatic analyses were performed as previously described, except for the adjusted alignment settings (2). Briefly, for each patient an initial analysis was performed using the NextGENe[®] software (SoftGenetics, State College, PA, USA): the FASTA files were aligned against the hg19 reference genome using either default or adjusted alignment settings (default settings except for an activation of the “detect large in-del”, a deactivation of the “hide unmatched ends” functionalities, a decrease of the in-dels mutation percentage to 15% and a homopolymer in-del balance frequency set at 20%). After alignment, variation and expression reports were created on NextGENe[®]. Variations identified in less than 3 patients or recurrent variations identified as different in terms of homogeneity in the chip (2 standard deviations) were selected using the concatenate function of Excel (Microsoft, Albuquerque, NM, USA) (concatenation of “Mutation Call” and “chromosome position” columns) (2).

Droplet digital PCR

QX200ddPCR EVAGREEN Supermix (10 µL) and 5 µL sample DNA (5 ng) were used, with the primer concentrations (100 nM final). After droplet generation, 40 µL of the generated droplet emulsion was transferred to a new 96-well PCR plate (Eppendorf) and amplified in a T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad). The amplification conditions were 5 min DNA polymerase activation at 95°C, followed by 40 cycles of a two-step thermal profile of 30 s at 95°C for denaturation, and 105 s at 58°C for annealing and extension, followed by a final hold of 5 min at 4°C then 5 min at 90°C for droplet stabilization and cooling to 12°C. The temperature ramp rate was set to 2.5°C/s, and the lid was heated to 105°C, according to the Bio-Rad recommendations. After the thermal cycling, the plates were transferred to a droplet reader (Bio-Rad). The DNA was detected and quantified using the QX200[™] Droplet Digital[™] PCR system (Bio-Rad, Pleasanton, CA, USA). The software package provided with the ddPCR system (QuantaSoft 1.3.2.0, Bio-Rad) was used for data acquisition.

Minigene splicing reporter assay

Minigene splicing reporter assay was performed as previously described (3,4) using a 922 bp *APOB* fragment (the 182 bp of intron 21, 176 bp of exon 22, 109 bp of intron 22, 188 bp of exon 23 and 268 bp of intron 24) amplified from the patient's DNA

Supplementary data for results of method validation

Sequencing data

Sequencing statistics are summarized in supplemental table 1. Both Ion316 and Ion318 chips could be used to perform these analyses. The expected *in silico* coverage was 97.5% (manufacturer data). The AmpliSeq custom panel allowed us to explore 106/129 amplicons designed for previous methods (supplemental figure 1) with a read depth >30X, corresponding to 95.1% of targeted regions. The most poorly covered regions were located in genes involved in HTG (84.9% vs. 97.5%, $p < 0.001$), probably due to a high GC content. Cumulated missed regions corresponded to 1473 bp (read depth >30X) of target regions (coding exons ± 20 bp; supplemental table 2 and supplemental figure 2).

Mutation identification in the training group

Overall, we expected to identify 15 different substitutions and 56 different in-dels (from 1 to 22 bp) in the covered regions (supplemental table 3), 12 of them being located in homopolymer regions, known challenging regions for Ion Torrent strategy. Default alignment settings led to identification of all substitutions. However one of them, the c.526G>A in *PCSK9*, had an incorrect calling (c.525_526insG; c.[526G>A]+[=]). Among these substitutions, the rs5742904 (c.10580G>A, p.Arg3527Gln) recurrent variation in *APOB* was tested once and identified. On the 56 expected in-dels, the c.350_372dup in *LDLR*, and the c.741_745del in *APOB* were not identified by NGS using default alignment settings. In addition, 9 of the 54 in-dels found were incorrectly called (supplemental table 3). Using adjusted alignment settings, all the gene variations previously identified with default settings as well as all the missing in-dels were detected, leading to an analytical sensitivity of 100%.

Mutation reports provided by NextGENe[®] led to the identification of a mean $\pm$ SD of 101 ± 22 gene variations per patient. A mean $\pm$ SD of $89.3 \pm 5.0\%$ of the variants were present in more than 3 patients and were automatically discarded. On average, there was a mean $\pm$ SD of 2.1 ± 2.5 variations per patient (range: 0 to 10) corresponded to false positive in-del calls when concatenation was made intra-assay: it was decreased to a mean $\pm$ SD of 0.2 ± 0.5 (range: 0 to 2) using an inter-assay concatenation. By this way the percentage of patients with false positive in-del calls decreased from

62% to 15%. Using this strategy, no previously identified pathogenic variation was rejected. The 5 CNV previously identified using MLPA in *LDLR* in FH patients were successfully found using our pipeline (supplemental table 4).

Supplemental Table 1. Summary of data of sequencing statistics in our custom AmpliSeq panel

	316-chip	318-chip
n	11	2
Number of samples per chip	22	36
Total sequenced reads	3 352 011 ±886 451	6 243 932
Total sequenced bases (Mb)	469 ± 139	882
Mean read length (bp)	139 ± 6	141
Total alignment base (Mb)	457 ± 135	860
Aligned reads ≥ mapQ20 (Mb)	413 ± 136	759

Variables are presented as mean ± standard deviation if n> 2

Supplemental Table 2. Uncovered amplicons in our custom Ampliseq panel

Gene	Indication	NM number	Exons with depth below 30 reads (<30X)	Position	Total number of nucleotids with depth below 30 reads (<30X)	% of coverage (depth>30X)
LDLR	FH	NM_000527.4	14	c.1998-20_1998-14	7 7	99.8
PCSK9	FH, FHBL	NM_174936.3	1 6	c.206_207+10 c.987_996+20	12 30 42	98.3
APOB	FH, FHBL	NM_000384.2	1 26	c.-20_82+20 c.6470_6494	122 25 147	99.0
ANGPTL3	FHBL	NM_014495.3	1 3 5	c.449_495+20 c.721+2_721+20 c.686_931+20	67 17 266 350	78.4
APOA5	HTG	NM_001166598.1	2 4	c.31 c.395_508 c.701_877	1 114 177 292	75.8
LPL	HTG	NM_000237.2	1 4	-20_88+22 c.430-20_438	128 29 157	90.6
GPIHBP1	HTG	NM_178172.5	4 3'UTR	c.440_555+20 c.*1_*50	136 50 186	74.3
APOC2	HTG	NM_000483.4	3	c.216-20_223	28 28	93.3
LMF1	HTG	NM_022773.2	1 3 6 11	c.1_9 c.504-20_514+20 c.730-20_803 c.1530-20_1619	9 51 94 110 264	87.4
CREB3L3	HTG	NM_032607.2	3 4 6 8 10	c.377_457+20 c.572_576+20 c.793_821+20 c.891-20_975+20 c.1073-20_1185	101 25 49 125 133 433	75.2

Uncovered regions: include only coding exons $\pm$ 20 bp except for *GPIHBP1* (addition of the 50 first

bases of the 3'UTR). FH: familial hypercholesterolemia; FHBL: familial hypobetalipoproteinemia; HTG: hypertriglyceridemia. In bold: total of nucleotides with depth below 30 read per gene.

Supplemental Table 3. List of previously identified variations in the training group

Indication	Gene	Exon/intron	Nucleotide change	Effect on protein	n carrier
FH	<i>APOB</i>	26	c.10580G>A	p.(Arg3527Gln)	1
FH	<i>LDLR</i>	2	c.81C>A	p.(Cys27*)	1
		2	c.178del	p.(Gln60Argfs*146)	1
		3	c.274C>G ^b	p.(Gln92Glu)	1
		3	c.313+1G>C	p.? (splice site)	1
		4	c.350_372dup	p.(Gln125Thrfs*89)	1
		4	c.518del	p.(Cys173Serfs*33)	1
		4	c.609del	p.(Cys204Alafs*2)	1
		4	c.617del	p.(Ser206Metfs*59)	1
		4	c.646del	p.(Cys216Valfs*49)	1
		4	c.654_655del ^c	p.(Gly219Profs*8)	1
		4	c.680_682delins14 ^d	p.(Asp227Alafs*42)	1
		4	c.682G>T	p.(Glu228*)	1
		4	c.683_684insAATCTGAC ^d	p.(Glu228_Glu229insIle*)	1
		4	c.693_694+20del ^d	p.(Ala232Cysfs*7)	1
		7	c.1031del	p.(Phe344Serfs*26)	1
		9	c.1244_1245del	p.(Asp415Alafs*25)	1
		9	c.1285G>A	p.(Val429Met)	1
		10	c.1374_1375del	p.(Arg458Serfs*8)	1
		10	c.1478_1479del	p.(Ser493Cysfs*42)	1
		10	c.1529del	p.(Thr510Serfs*38)	1
		11	c.1629_1652del ^d	p.(Lys543_Asp551delinsAsn)	1
		12	c.1718del	p.(Gly573Alafs*92)	1
		12	c.1730_1738del	p.(Trp577_Asp579del)	1
		12	c.1738_1739insTGT	p.(Asp579_Ser580insLeu)	1
		12	c.1752del	p.(Ile585Serfs*80)	1
		12	c.1829_1831del ^c	p.(Ser610del)	1
		13	c.1871_1873del	p.(Ile624del)	2
		13	c.1961_1965dup	p.(His656Serfs*11)	1
		14	c.2013_2014del ^d	p.(Leu672Glufs*44)	1
		14	c.2030_2042del	p.(Cys677Serfs*28)	1
		14	c.2085_2103del	p.(Ala697Cysfs*6)	1
		15	c.2187_2197del ^d	p.(Lys730Hisfs*48)	1
		17	c.2416del ^c	p.(Val806Serfs*123)	1
		17	c.2416dup ^c	p.(Val806Glyfs*11)	1
		17	c.2447_2450dup ^d	p.(Asn817Lysfs*9)	2
FH	<i>PCSK9</i>	1	c.63_65del ^b	p.(Leu23del)	1
		1	c.137G>T ^b	p.(Arg46Leu)	1
		4	c.526G>A	p.(Gly176Arg)	1
FHBL	<i>ANGPTL3</i>	1	c.363_367del	p.(Asn121Lysfs*3)	1

Indication	Gene	Exon/intron	Nucleotide change	Effect on protein	n carrier
FHBL	APOB	6	c.614del	p.(Thr205Metfs*27)	1
		7	c.741_745del	p.(Thr248Glyfs*3)	1
		14	c.1999del	p.(Leu667Phefs*7)	1
		15	c.2115del ^c	p.(Phe705Leufs*30)	1
		21	c.3264_3267del	p.(Ser1089Thrfs*21)	1
		23	c.3565del ^c	p.(Met1189*)	1
		23	c.3634C>A ^b	p.(Leu1212Met)	1
		23	c.3656_3661del ^d	p.(Thr1219_Asp1220del)	1
		26	c.4375A>G	p.(Ser1459Gly)	1
		26	c.4715_4716del	p.(Ser1572*)a	1
		26	c.5263_5266del	p.(Asn1755Valfs*2)	1
		26	c.5347del ^c	p.(Thr1783Leufs*12)	1
		26	c.6286_6287del	p.(Gln2096Glufs*9)	1
		26	c.6639_6641del ^b	p.(Asp2213del)	1
		26	c.7387del	p.(Ala2463Leufs*4)	1
		26	c.8544del	p.(Asn2848Lysfs*26)	1
		26	c.8555del	p.(Gly2852Glufs*22)	1
		26	c.9618dup	p.(His3207Alafs*3)	1
		26	c.10453del ^c	p.(Ser3485Alafs*37)	1
		29	c.12116T>G	p.(Phe4039Cys)	1
HTG	APOA5	3	c.295_297del ^c	p.(Glu99del)	1
		4	c.327dup ^{c,d}	p.(Tyr110Leufs*158)	1
		4	c.427del	p.(Arg143Alafs*57)	2
		4	c.614_624del	p.(His205Profs*59)	1
		4	c.654del ^c	p.(Ala219Profs*78)	2
HTG	LPL	3	c.272G>A	p.(Trp91*)	1
		4	c.438del ^c	p.(Phe146Leufs*26)	1
		4	c.542-1G>A	p.? (splice site)	1
		5	c.590G>T	p.(Arg197Leu)	1
		5	c.596del	p.(Ser199Phefs*8)	1
		9	c.1394G>A	p.(Cys465Tyr)	1

FH: familial hypercholesterolemia; FHBL: familial hypobetalipoproteinemia; HTG: hypertriglyceridemia.

LDLR: NM_000527.4; *PCSK9*: NM_174936.3; *ANGPTL3*: NM_014495.3; *APOB*: NM_000384.2; *APOA5*: NM_001166598.1; *LPL*: NM_000237.2.

a: found at homozygous state; b: non-causative variation; c: in homopolymer or repetitive regions; d: incorrect calling in NGS strategy.

Supplemental Table 4. List of previously identified CNV in *LDLR* in the training group

Exons	Nucleotide change	Predicted protein if recombination between Alu not affecting splice site
1, 2, 3,4, 5, 6	c.(?-1)_(940+1_941-1)del	no protein
5	c.(694+1_695-1)_(817+1_818-1)del	p.(Ala232_Asn272del)
7, 8	c.(940+1_941-1)_(1186+1_1187-1)del	p.(Thr315_Gly396del)
11, 12	c.(1586+1_1587-1)_(1845+1_1846-1)del	p.(Phe530Thrfs*49)
15, 16, 17, 18	c.(2140+1_2141-1)(*1?)del	p.(Glu714_Ala860delins13)

LDLR: NM_000527.4

Supplemental Table 5. Complete list of variations previously identified in the study group

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
FH	APOB	15	c.2188G>A	p.(Val730Ile) ⁿ	1	rs12691202	2.50%	D	POSDA	Poly	Benign to VUS	(5,6)	Benign
FH	APOB	21	c.3220G>A	p.(Gly1074Arg) ⁿ	1	rs72653074	0.0025%	D	PRODA	DC	NA	(7)	VUS
FH	APOB	22	c.3383G>A	p.(Arg1128His)	1	rs12713843	0.37%	D	B	DC	VUS	(8)	Benign
FH	APOB	22	c.3427C>T	p.(Pro1143Ser)	2	rs72653077	0.14%	T	B	Poly	Likely benign to VUS	(9)	VUS
FH	APOB	23	c.3679G>A	p.(Gly1227Ser) ^f	1	NA	NA	T	POSDA	DC	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.4733A>G	p.(Tyr1578Cys) ^o	1	rs376571830	0.00042%	D	PRODA	Poly	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.5741A>G	p.(Asn1914Ser) ^{j, q, u}	3	rs1801699	2.01%	D	POSDA	Poly	Begnin to likely benign	(5)	Benign
FH/FHBL	APOB	26	c.5768A>G	p.(His1923Arg)	3	rs533617	3.12%	D	PRODA	Poly	Benign to VUS	(10)	Benign
FH/FHBL	APOB	26	c.6895G>C	p.(Asp2299His) ^{h, p}	3	rs12713681	0.16%	D	PRODA	DC	Benign VUS	NA	VUS
FH	APOB	26	c.7336G>A	p.(Val2446Met)	1	rs777259835	0.0049%	T	B	Poly	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.7696 G>A	p.(Glu2566Lys) ^{b, r}	5	rs1801696	0.27%	D	B	Poly	Benign to VUS	(11,12)	VUS
FH	APOB	26	c.9242G>C	p.(Ser3081Thr)	1	rs72653100	0.098%	T	B	Poly	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.9727C>T	p.(Pro3243Ser)	1	rs372260836	0.00083%	T	POSDA	DC	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.9835A>G	p.(Ser3279Gly)	1	rs12720854	0.44%	T	PRODA	Poly	Benign to VUS	(7)	Benign
FH	APOB	26	c.9880 T>C	p.(Ser3294Pro)	1	rs12720855	0.48%	D	POSDA	DC	Benign to VUS	NA	Likely Benign
FH	APOB	26	c.10114T>G	p.(Ser3372Ala)	1	rs138850232	0.0017%	T	PRODA	DC	NA	NA	VUS
FH	APOB	26	c.10294 C>G	p.(Gln3432Glu) ^o	1	rs1042023	0.76%	T	POSDA	Poly	Begnin to likely benign	(5)	VUS
FH	APOB	26	c.10580G>A	p.(Arg3527Gln) ^b	4	rs5742904	0.023%	D	PRODA	DC	VUS to pathogenic	(13,14)	Pathogenic
FH	APOB	26	c.10672C>T	p.(Arg3558Cys)	1	rs12713559	0.035%	D	PRODA	DC	VUS to pathogenic	(15–17)	VUS

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
FH	APOB	26	c.10740C>G	p.(Asn3580Lys) ^g	1	rs150312765	0.0058%	T	B	Poly	Pathogenic	NA	Likely benign
FH	APOB	26	c.10913G>A	p.(Arg3638Gln)	1	rs1801701	6.89%	T	B	Poly	Likely benign to benign	LOVD	Benign
FH	APOB	26	c.11138A>C	p.(Asn3713Thr) ^t	1	NA	0.00041%	D	POSDA	Poly	NA	NA	VUS
FH	APOB	29	c.12116T>G	p.(Phe4039Cys) ^f	1	rs765643246	0.0017%	D	POSDA	Poly	NA	NA	VUS
FH	APOB	29	c.12382G>A	p.(Val4128Met)	1	rs1801703	0.59%	T	B	Poly	Benign to VUS	NA	Likely benign
FH	APOB	29	c.12794T>C	p.(Val4265Ala)	1	rs61743502	0.51%	D	B	Poly	Benign	(9)	Benign
FH	LDLR	2	c.81C>G	p.(Cys27Trp)	1	rs2228671	0.0017%	D	PRODA	DC	Likely benign to pathogenic	(18,19)	Likely pathogenic
FH	LDLR	2	c.185C>G	p.(Thr62Arg)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic	NA	Likely pathogenic
FH	LDLR	3	c.241C>T	p.(Arg81Cys)	1	rs730882078	0.00082%	D	PRODA	DC	VUS to likely pathogenic	(18,20)	VUS
FH	LDLR	3	c.267C>G	p.(Cys89Trp)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic	(18)	Likely pathogenic
FH	LDLR	3	c.301G>A	p.(Glu101Lys) ^u	1	rs144172724	0.00082	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	Likely pathogenic
FH	LDLR	4	c.337G>T	p.(Glu113*)	1	NA	0.0000041%	NA	NA	NA	Likely pathogenic to pathogenic	(18,19)	Pathogenic
FH	LDLR	4	c.427T>G	p.(Cys143Gly)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(21)	Likely pathogenic
FH	LDLR	4	c.542C>G	p.(Pro181Arg) ^k	1	rs557344672	0.0024%	D	PRODA	DC	Likely Benign to likely pathogenic	(18,20)	Likely benign
FH	LDLR	4	c.662A>G	p.(Asp221Gly) ^r	1	rs373822756	0.0053%	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(20,22,23)	Pathogenic
FH	LDLR	4	c.682G>T	p.(Glu228*) ^k	1	rs121908029	0.00082%	NA	NA	NA	Likely pathogenic to pathogenic	(18,19)	Pathogenic

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
FH	<i>LDLR</i>	6	c.829 G>A	p.(Glu277Lys) ^d	1	rs148698650	0.050%	T	B	DC	Benign to pathogenic	(18,24)	Benign
FH	<i>LDLR</i>	6	c.940+2T>G	p.? ^f	1	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic	NA	Pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	6	c.940+9C>T	p.? ^w	1	rs17242906	0.22%	NA	NA	NA	Likely benign	NA	Likely benign
FH	<i>LDLR</i>	7	c.941-4G>A	p.? ^w	1	rs116405216	0.24%	NA	NA	NA	Likely Benign to likely pathogenic	(18)	Likely benign
FH	<i>LDLR</i>	7	c.974G>T	p.(Cys325Phe)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	NA	(25)	Likely pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	7	c.1027G>A	p.(Gly343Ser)	2	rs730882096	0.0025%	D	PRODA	DC	VUS to pathogenic	(16–18)	Likely pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	8	c.1061-8T>C	p.? ^s	1	rs72658861	0.64%	NA	NA	NA	Benign to likely pathogenic	(18,26)	Benign
FH	<i>LDLR</i>	8	c.1118G>A	p.(Gly373Asp)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18,27)	Likely pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	8	c.1124A>G	p.(Tyr375Cys) ^j	1	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic	(18)	Likely pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1216C>T	p.(Arg406Trp)	1	rs121908043	0.0017%	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	VUS
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1222G>A	p.(Glu408Lys)	1	rs137943601	0.00083%	D	PRODA	DC	Likely benign to pathogenic	(18,19)	Likely pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1268 T>C	p.(Ile423Thr) ^d	1	NA	NA	D	POSDA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18,24)	Pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1301 C>A	p.(Thr434Lys) ^c	1	NA	0.00041%	T	PRODA	Poly	Likely benign	(18)	VUS
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1329 G>C	p.(Trp443Cys) ^q	2	NA	NA	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18,19)	Pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	9	c.1359-1G>A	p.?	1	rs139617694	NA	NA	NA	NA	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	Pathogenic
FH	<i>LDLR</i>	10	c.1414G>A	p.(Asp472Asn) ^h	1	NA	NA	T	B	Poly	NA	NA	Likely pathogenic

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
FH	LDLR	10	c.1444G>A	p.(Asp482Asn)	1	rs139624145	0.0041%	D	PRODA	DC	VUS to pathogenic	(18)	Pathogenic
FH	LDLR	10	c.1519A>G	p.(Lys507Glu)	1	NA	NA	T	POSDA	DC	VUS	(21)	VUS
FH	LDLR	10	c.1529del	p.(Thr510Serfs*38) ^g	2	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic	NA	Pathogenic
FH	LDLR	10	c.1567G>A	p.(Val523Met) ^c	1	rs28942080	0.0012%	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	Pathogenic
FH	LDLR	10	c.1586+5G>A	p.? ^t	1	rs781362878	0.0034%	NA	NA	NA	VUS to likely pathogenic	(28)	Pathogenic
FH	LDLR	11	c.1618G>A	p.(Ala540Thr)	1	rs769370816	0.00081%	T	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	VUS
FH	LDLR	12	c.1820_1822dup	p.(His607dup) ^m	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Likely pathogenic
FH	LDLR	12	c. 1829_1831del	p.(Ser610del)	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	(21)	Likely pathogenic
FH	LDLR	13	c.1957G>T	p.(Val653Phe)	1	NA	NA	T	POSDA	DC	VUS to likely pathogenic	(18)	Likely pathogenic
FH	LDLR	14	c.2054C>T	p.(Pro685Leu)	1	rs28942084	0.0028%	D	PRODA	DC	Likely pathogenic to pathogenic	(18,20)	Pathogenic
FH	LDLR	14	c.2087G>C	p.(Cys696Ser)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	NA	NA	Likely pathogenic
FH	LDLR	14	c.2140G>T	p.(Glu714*)	2	NA	0.00082%	NA	NA	NA	Likely pathogenic to pathogenic	(18)	Pathogenic
FH	LDLR	15	c.2177C>T	p.(Thr726Ile) ^s	1	rs45508991	0.63%	D	B	Poly	Benign to VUS	(18,20)	Benign
FH	LDLR	17	c.2416dup	p.(Val806Glyfs*11)	1	rs773618064	0.0024%	NA	NA	NA	VUS to pathogenic	(18,29)	Pathogenic
FH	LDLR	9 -10	c.(1186+1_1187- 1)(1586+1_1587- 1)del	p.(Gly396Alafs*19)	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FH	LDLR	2 - 5	c.(67+1_68- 1)(817+1_818-1)del	p.(Gly24_Val273del)	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic

Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
FH	PCSK9	2	c.384C>T	p.(=) ^m	1	rs72646503	0.012%	NA	NA	NA	NA	NA	Likely benign
FH	PCSK9	5	c.753C>T	p.(=)	1	rs28385710	0.41%	NA	NA	NA	Likely Benign to benign	NA	Likely benign
FH	PCSK9	9	c.1394C>T	p.(Ser465Leu) ^s	1	ND	0.0024%	T	PRODA	Poly	VUS pathogenic	NA	VUS
FHBL	ANGPTL3	1	c.228C>G	p.(Asn76Lys) ^a	1	rs149086653	0.18%	T	PRODA	DC	NA	NA	VUS
FHBL	ANGPTL3	1	c.286_288del	p.(Glu96del) ^x	1	rs537365761	0.013%	NA	NA	NA	NA	(30)	Likely pathogenic
FHBL	ANGPTL3	1	c.379C>T	p.(Leu127Phe) ^y	1	rs72649573	0.70%	D	POSDA	DC	Likely benign	NA	VUS
FHBL	APOB	5	c.433C>T	p.(Pro145Ser) ^a	2	rs6752026	1.13%	D	PRODA	Poly	Benign to likely benign	NA	Likely benign
FHBL	APOB	14	c.1920C>A	p.(Tyr640*) ^x	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	15	c.2222C>A	p.(Thr741Asn) ^a	1	rs12714192	0.57%	D	B	Poly	Likely benign to VUS	NA	Benign
FHBL	APOB	22	c.3365del	p.(Gly1122Valfs*63) ^v	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	23	c.3634C>A	Leu1212Met ^a	1	rs61736761	0.76%	D	PRODA	Poly	Benign to VUS	NA	Benign
FHBL	APOB	26	c.6316C>T	p.(Gln2106*)	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	26	c.7537C>T	p.(Arg2513*) ^e	1	NA	0.00082%	NA	NA	NA	NA	(31)	Pathogenic
FHBL	APOB	26	c.10848del	p.(Gly3617Alafs*6)	1	NA	0.00081%	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic
FHBL	APOB	26	c.11401T>A	p.(Ser3801Thr) ^y	1	rs12713540	0.10%	T	POSDA	Poly	Likely benign to VUS	NA	VUS
FHBL	APOB	29	c.12699G>A	p.(=) p.Ser4233Ser ^e	1	rs56675344	0.051%	NA	NA	NA	NA	NA	Likely benign
FHBL	LDLR	5	c.806G>A	p.(Gly269Asp) ^v	1	rs143992984	0.019%	T	B	DC	Likely benign to VUS	(18,20)	Likely benign
FHBL	PCSK9	1	c.137G>T	p.(Arg46Leu) ^p	1	rs11591147	1.2%	T	B	Poly	Benign to VUS	(32,33)	Benign, association
HTG	APOA5	3	c.56C>G	p.(Ser19Trp)	5	rs3135506	7,9%	D	PRODA	Poly	Risk factor	(34)	Risk factor

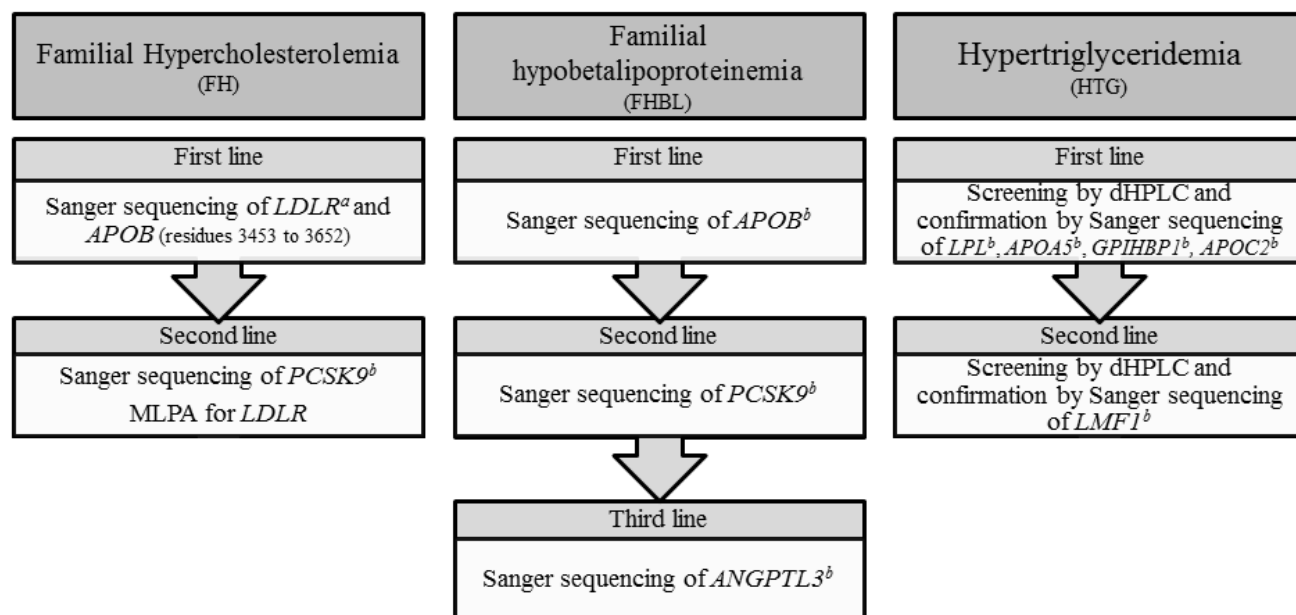
Indication	Gene	Exon/ intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	n carrier	rs	ExAC frequency (All, %)	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	ClinVar	Ref	ACMG Interpretation
HTG	APOA5	4	c.887T>G	p.(Ile296Arg)	1	rs761343549	0.0037%	D	PRODA	DC	NA	NA	VUS
HTG	LPL	5	c.642A>C	p.(Arg214Ser)	1	NA	NA	D	PRODA	DC	NA	NA	Likely pathogenic
HTG	LPL	6	c.829G>A	p.(Asp277Asn)	1	rs118204068	0.00082%	T	POSDA	DC	Pathogenic	(35,36)	Pathogenic
HTG	LPL	3-7	c.(249+1_250- 1)_(1139+1_1140- 1)del	p.(Val84Alafs*2)	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Pathogenic

FH: familial hypercholesterolemia; FHBL: familial hypobetalipoproteinemia; HTG: hypertriglyceridemia.

B: Benign; D: deleterious; DC: Disease causing; NA: not applicable; Poly: polymorphism; POSDA: possibly damaging; PRODA: probably damaging; T: tolerated; VUS: variant of unknown significance.

LDLR: NM_000527.4; *PCSK9*: NM_174936.3; *ANGPTL3*: NM_014495.3; *APOB*: NM_000384.2; *APOA5*: NM_001166598.1; *LPL*: NM_000237.2

Letters a to y indicates variations that have been identified in same patient (one letter per patient except for b, n=4).



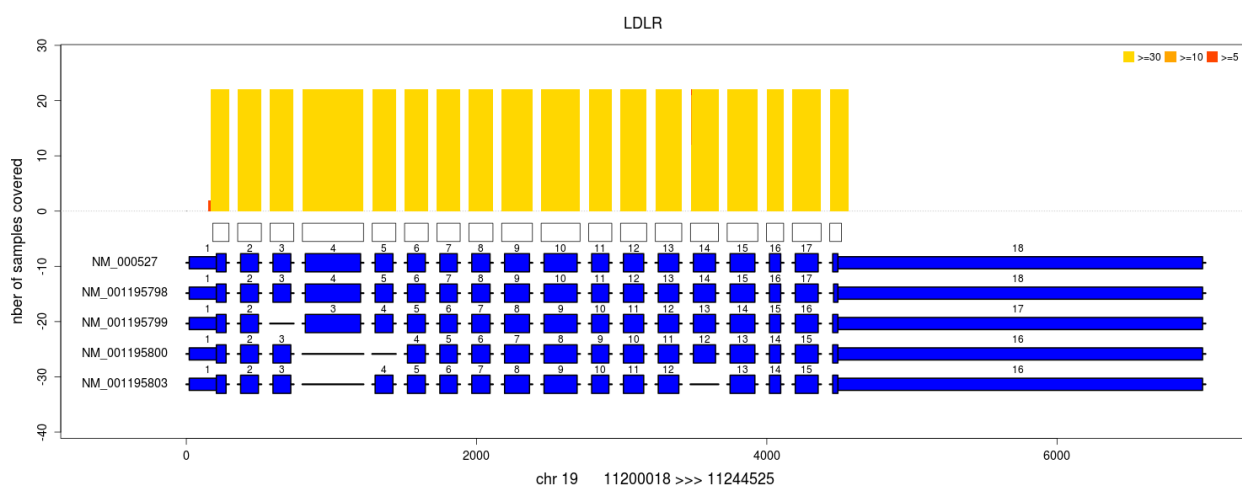
Supplemental Data Figure 1. Previous sequential strategy for molecular diagnosis of primary dyslipidemia in our lab

^acoding exons and promoter region

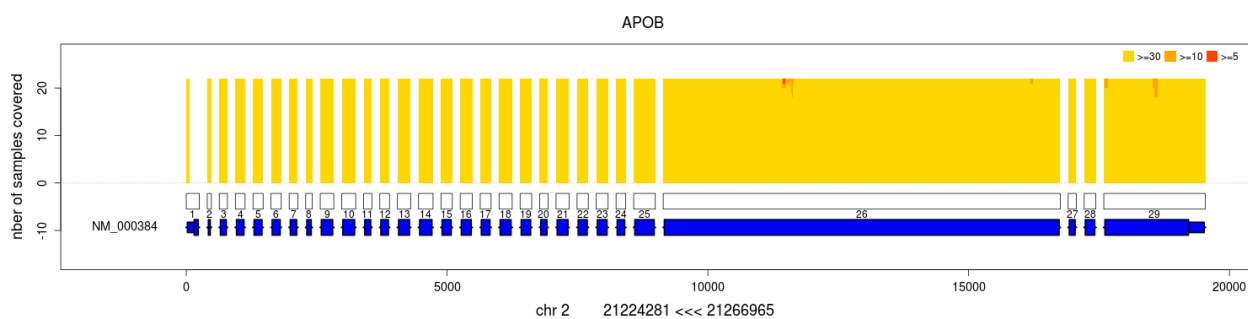
^bcoding exons

To progress to the next level, clinical arguments were mandatory. For FH, second line exploration was performed in case of DLNC score above 5.

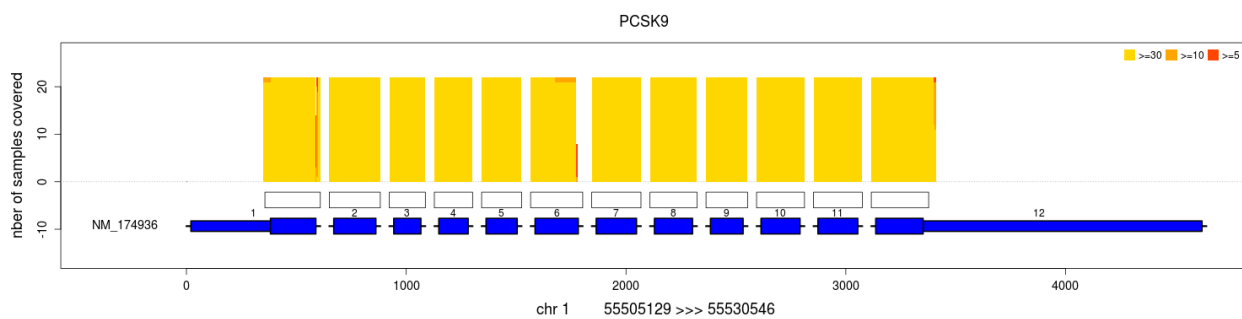
(A)



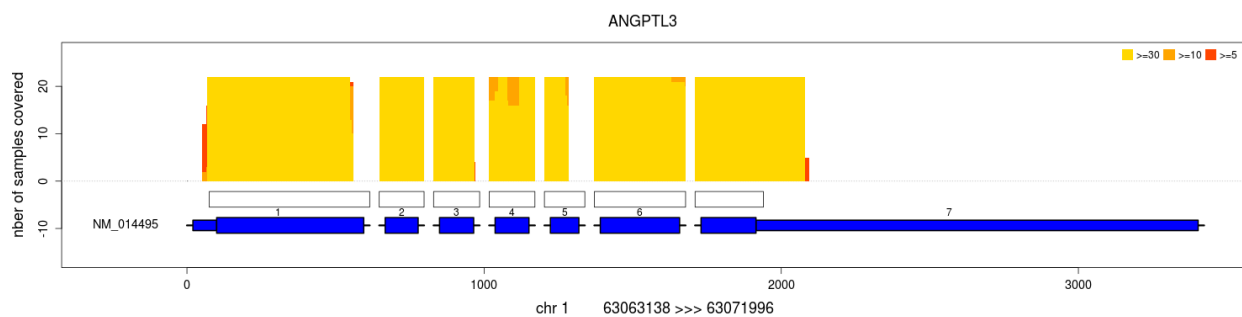
(B)



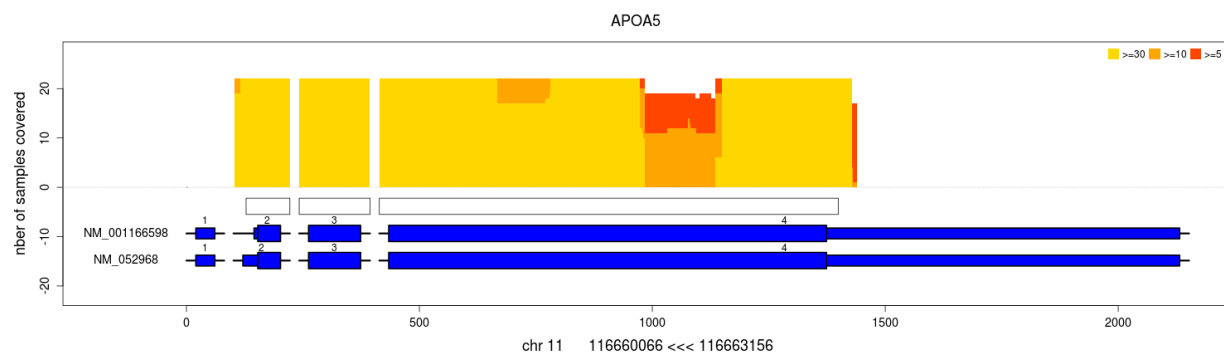
(C)



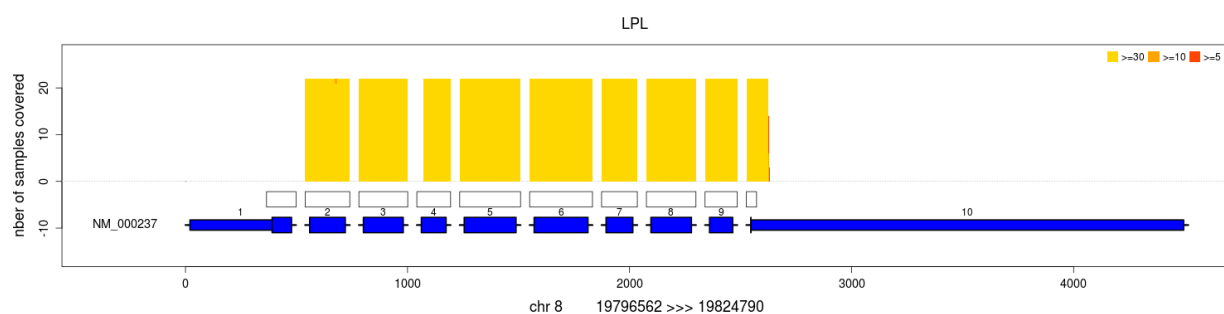
(D)



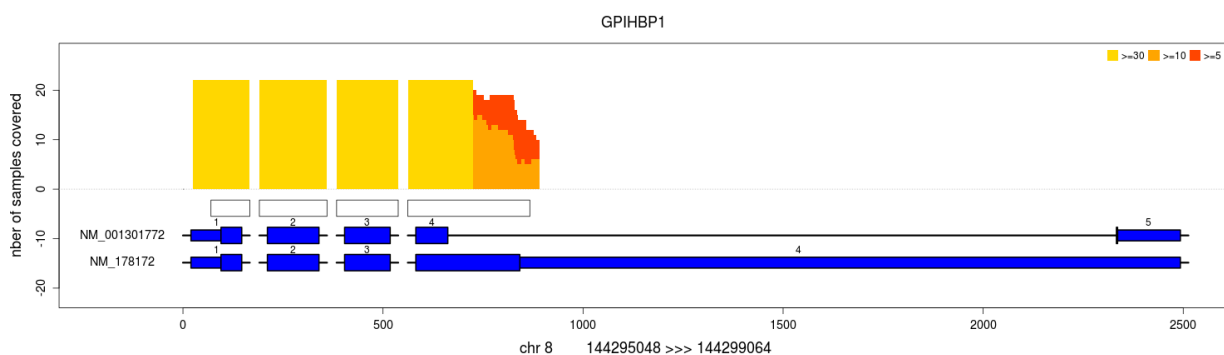
(E)



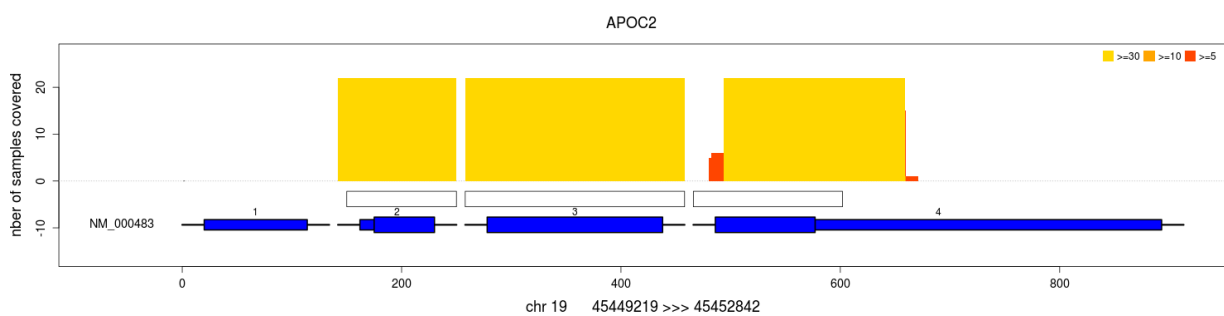
(F)



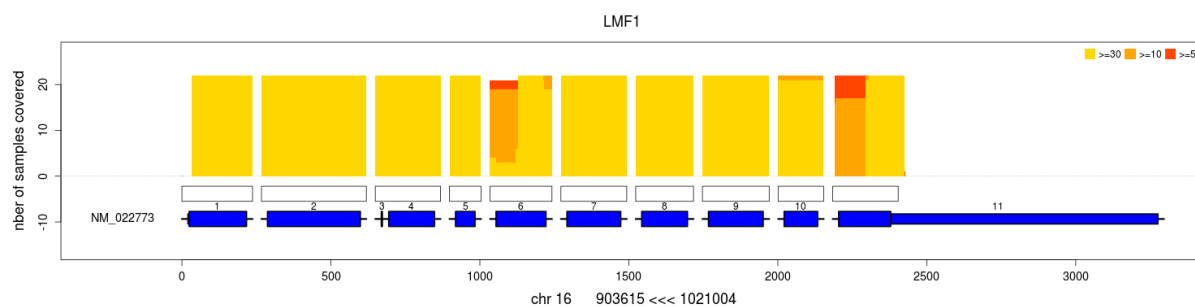
(G)



(H)

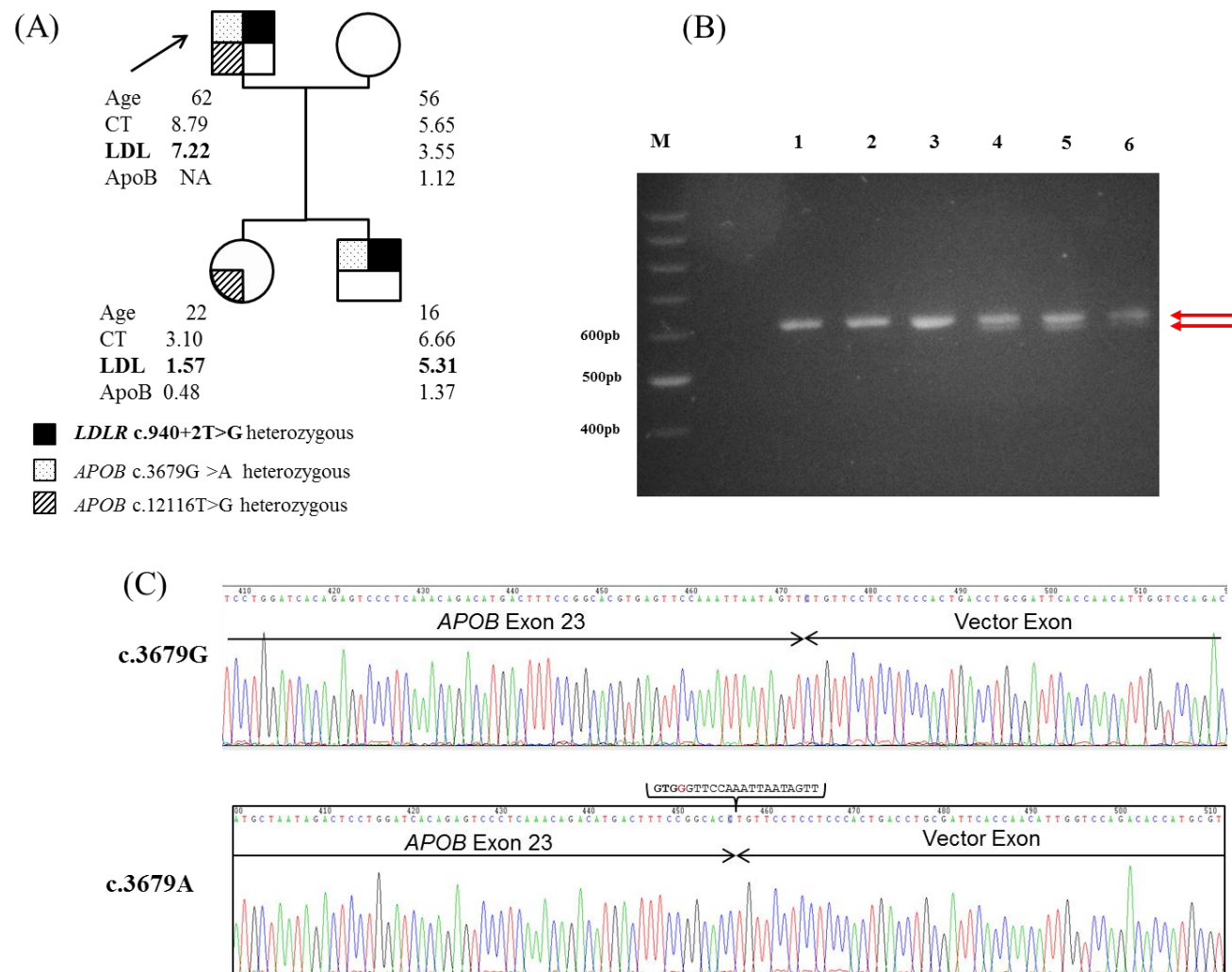


(I)



Supplemental Data Figure 2. Illustration of the sum coverage obtained using DeCovA for *LDLR* (A), *APOB* (B), *PCSK9* (C), *ANGPTL3* (D), *APOA5* (E), *LPL* (F), *GPIHBP1* (G), *APOC2* (H) and *LMF1* (I)

The vertical axis shows the number of patients with a coverage $\geq 30\times$ (yellow), $10\times$ (orange), and $5\times$ (red). The horizontal axis shows the different exons (large blue rectangles), and UTR regions (thin blue rectangles) for the corresponding isoforms, and the unfilled rectangles stand for target regions from bed file. Sum coverage were obtained with 22 samples.



Supplemental Data Figure 3. Family with both hypercholesterolemia and hypobetalipoproteinemia.

A. Pedigree.

The proband is indicated by a black arrow, squares indicate male subjects and circles female subjects. The column of 4 values next to each symbol indicates, from top to bottom: age expressed in years, total cholesterol (TC), LDL cholesterol (LDLc) expressed in mmol/L and apolipoprotein B (apoB) expressed in g/L.

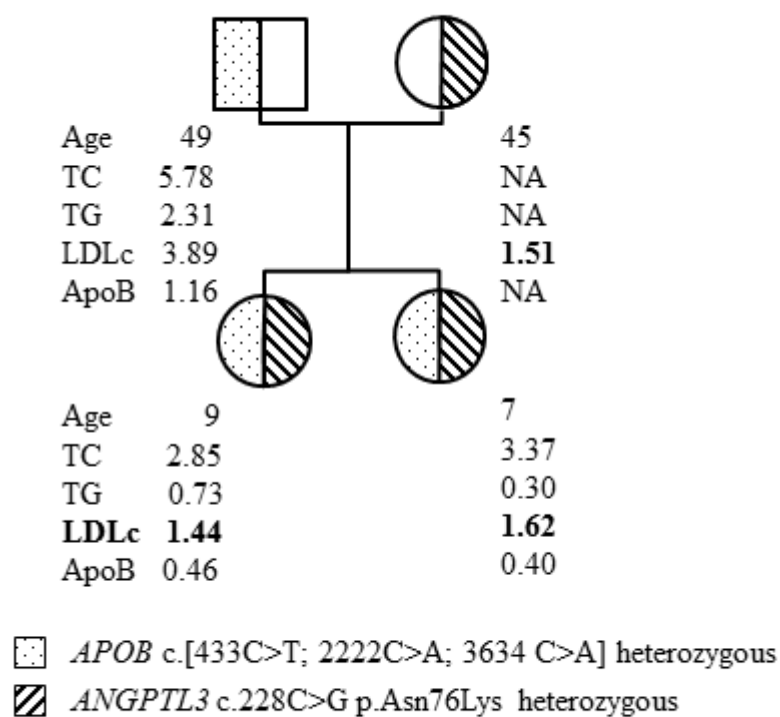
B. Size separation of RT-PCR products as determined by 2% agarose gel electrophoresis during 5h.

M: molecular weight marker. Lanes 1, 2 and 3: normal minigene. Lanes 4, 5 and 6: mutant (c.3679G >A) minigene

Transfection of the wild-type minigene into HeLa cells produced, as expected, a 610 bp fragment (lanes 1, 2 and 3). In contrast, transfection of the mutant c.3679G>A minigene produced two different RT-PCR fragments: a large amount of a fragment of a normal size (610 bp) and a small amount of a smaller fragment (lanes 4, 5 and 6).

C. Sequence of the RT-PCR products.

The sequence of 610 bp PCR product includes exons 22 and 23 of *APOB*, whereas the other product missed 21 bp of exon 23. This result shows a partial effect on splicing leading to an in-frame deletion of 21 bp and consequently 7 residues (Val1226 to Val1232).



Supplemental Data Figure 4. Pedigree of family with Marfan syndrome and persistent low LDLc.

Squares indicate male subjects and circles female subjects. The column of 5 values next to each symbol indicates, from bottom to top: age expressed in years, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), LDL cholesterol (LDLc) expressed in mmol/L and apolipoprotein B (apoB) expressed in g/L.

Supplemental references

1. Marmontel O, Di Filippo M, Marcais C, Nony S, Dumoux M, Serveaux-Dancer M, et al. Alterations in plasma triglycerides lipolysis in patients with history of multifactorial chylomicronemia. *Atherosclerosis*. 2017 Oct;265:22–8.
2. Millat G, Chanavat V, Rousson R. Evaluation of a new NGS method based on a custom AmpliSeq library and Ion Torrent PGM sequencing for the fast detection of genetic variations in cardiomyopathies. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2014 Jun 10;433:266–71.
3. Di Filippo M, Créhalet H, Samson-Bouma ME, Bonnet V, Aggerbeck LP, Rabès J-P, et al. Molecular and functional analysis of two new MTTP gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 2012 Mar;53(3):548–55.
4. Crehalet H, Latour P, Bonnet V, Attarian S, Labauge P, Bonello N, et al. U1 snRNA mis-binding: a new cause of CMT1B. *Neurogenetics*. 2010 Feb;11(1):13–9.
5. Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, MacDonald A, Carter DE, McIntyre AD, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. 2014 Apr;55(4):765–72.
6. Lam MCW, Singham J, Hegele RA, Riazzy M, Hiob MA, Francis G, et al. Familial hypobetalipoproteinemia-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Case Rep Gastroenterol*. 2012 May;6(2):429–37.
7. Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, Cefalù AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):e19-27.
8. Lancellotti S, Di Leo E, Penacchioni JY, Balli F, Viola L, Bertolini S, et al. Hypobetalipoproteinemia with an apparently recessive inheritance due to a “de novo” mutation of apolipoprotein B. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jan 20;1688(1):61–7.
9. Leren TP, Berge KE. Identification of mutations in the apolipoprotein B-100 gene and in the PCSK9 gene as the cause of hypocholesterolemia. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2008 Nov;397(1–2):92–5.
10. Meng QH, Pajukanta P, Ilmonen M, Schuster H, Schewe CK, Andersson LC, et al. Analysis of novel apolipoprotein B mutations using a modified U937 cell line LDL binding assay. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1996 Dec 9;256(1):27–36.
11. Radovica-Spalvina I, Latkovskis G, Silamikelis I, Fridmanis D, Elbere I, Ventins K, et al. Next-generation-sequencing-based identification of familial hypercholesterolemia-related mutations in subjects with increased LDL-C levels in a latvian population. *BMC Med Genet*. 2015 Sep 28;16:86.
12. Huijgen R, Sjouke B, Vis K, de Randamie JSE, Defesche JC, Kastelein JJP, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant

hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-C Levels. *Hum Mutat.* 2012 Feb;33(2):448–55.

13. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(2):587–91.

14. März W, Baumstark MW, Scharnagl H, Ruzicka V, Buxbaum S, Herwig J, et al. Accumulation of “small dense” low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patients with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogenous interaction of LDL subfractions with the LDL receptor. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2922–33.

15. Pullinger CR, Gaffney D, Gutierrez MM, Malloy MJ, Schumaker VN, Packard CJ, et al. The apolipoprotein B R3531C mutation. Characteristics of 24 subjects from 9 kindreds. *J Lipid Res.* 1999 Feb;40(2):318–27.

16. Rabès JP, Varret M, Devillers M, Aegerter P, Villéger L, Krempf M, et al. R3531C mutation in the apolipoprotein B gene is not sufficient to cause hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Oct;20(10):E76-82.

17. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 1998 May 28;338(22):1577–84.

18. Leigh S, Futema M, Whittall R, Taylor-Beadling A, Williams M, den Dunnen JT, et al. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet.* 2017 Apr;54(4):217–23.

19. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1(6):445–66.

20. Thormählen AS, Runz H. Systematic Cell-Based Phenotyping of Missense Alleles. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1601:215–28.

21. Marduel M, Carrié A, Sassolas A, Devillers M, Carreau V, Di Filippo M, et al. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Hum Mutat.* 2010 Nov;31(11):E1811-1824.

22. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, 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 Sep;20(9):E41-52.

23. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):3092–101.

24. Ekström U, Abrahamson M, Sveger T, Sun XM, Soutar AK, Nilsson-Ehle P. Expression of an LDL receptor allele with two different mutations (E256K and I402T). *Mol Pathol* MP. 2000 Feb;53(1):31–6.
25. Wintjens R, Bozon D, Belabbas K, MBou F, Girardet J-P, Tounian P, et al. Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France. *J Lipid Res*. 2016 Mar;57(3):482–91.
26. Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, Medeiros AM, Marques L, Soutar AK. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet*. 2009 May;46(5):352–7.
27. Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rolleri M, et al. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Feb;19(2):408–18.
28. Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, Cefalù AB, Noto D, Fasano T, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013 Apr;227(2):342–8.
29. Nobe Y, Emi M, Katsumata H, Nakajima T, Hirayama T, Wu LL, et al. Familial hypercholesterolemia in Utah kindred with novel 2412-6 Ins G mutations in exon 17 of the LDL receptor gene. *Jpn Heart J*. 1999 Jul;40(4):435–41.
30. Noto D, Cefalù AB, Valenti V, Fayer F, Pinotti E, Ditta M, et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB gene mutations in subjects with combined hypolipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Mar;32(3):805–9.
31. Wagner RD, Krul ES, Tang J, Parhofer KG, Garlock K, Talmud P, et al. ApoB-54.8, a truncated apolipoprotein found primarily in VLDL, is associated with a nonsense mutation in the apoB gene and hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 1991 Jun;32(6):1001–11.
32. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006 Mar 23;354(12):1264–72.
33. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008 Mar 20;358(12):1240–9.
34. Talmud PJ, Martin S, Taskinen M-R, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res*. 2004 Apr;45(4):750–6.
35. Ishimura-Oka K, Semenkovich CF, Faustinella F, Goldberg IJ, Shachter N, Smith LC, et al. A missense (Asp250----Asn) mutation in the lipoprotein lipase gene in two unrelated families with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Lipid Res*. 1992 May;33(5):745–54.

36. Minnich A, Kessling A, Roy M, Giry C, DeLangavant G, Lavigne J, et al. Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J Lipid Res.* 1995 Jan;36(1):117–24.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

ETUDE D'UNE COHORTE DE PATIENTS PRESENTANT UN SYNDROME DE CHYLOMICRONEMIE MULTIFACTORIELLE

Cette étude avait pour but d'explorer phénotypiquement 62 patients présentant un MCS et chez lesquels, les gènes classiquement impliqués dans les HTG sévères avaient été explorés. Par ailleurs, cette étude a confirmé qu'un tiers des patients MCS ne présentent aucun variant (rare ou fréquent) sur les gènes classiquement étudiés dans les HTG, et que certains variants fréquents étaient surreprésentés dans des proportions équivalentes à ce qui avait été observé dans d'autres cohortes européennes (99,319,324). Les résultats de cette étude confirment également que les 6 patients porteurs d'un variant hétérozygote *APOA5* n'avaient pas de diminution permanente de l'activité LPL lorsqu'ils étaient explorés à distance de leur décompensation (142,143,145,146,405,406). L'effet stimulateur *in-vitro* de l'ApoA-V sur l'activité LPL est un sujet de controverse (129,137,138), probablement lié aux concentrations très importantes et variables utilisées d'ApoA-V et aux écarts entre un modèle expérimental et la physiologie (305). Ainsi, des variants additionnels pourraient être nécessaires pour observer une diminution de l'activité LPL chez les porteurs de variants délétères d'*APOA5* (77,407)

Intérêt diagnostique de la détermination de la concentration en LPL

Notre étude a mis en évidence une diminution de la concentration en LPL pré-héparinique d'environ 50 % comparée à une population témoin. En dehors de population FCS, peu de données de la littérature sont disponibles sur la concentration pré-héparinique en LPL. Watanabe *et al.* ont montré que la concentration pré-héparinique était significativement plus basse chez des patients présentant une HTG modérée (Type IV de la classification de Frederickson) comparée aux témoins : le pourcentage de baisse n'est pas explicitement précisé dans l'article mais la concentration semble diminuée de 30% d'après une figure (408). Coca-Prieto *et al.* ont rapporté les concentrations pré-hépariniques de sujets HTG sévères, ayant présenté ou non une pancréatite aiguë : les valeurs obtenues sont comparables à celles de notre

étude (de l'ordre d'une vingtaine de ng/mL) (409). Cependant, l'absence de détermination chez des sujets témoins et la différence dans le protocole d'injection d'héparine rend la comparaison difficile.

Cette diminution semble peu spécifique puisque 32% des patients MCS présentent une concentration comprise dans l'intervalle de référence et qu'inversement 3 sujets contrôles ont une concentration inférieure à l'intervalle de référence. Il existe donc une « zone grise » importante de recouvrement entre les concentrations des patients MCS et des sujets témoins, comme l'avait suggéré l'étude de Kern et *al.* (349). Plusieurs études ont montré une variation de la concentration LPL pré-héparinique dans d'autres conditions physiopathologiques pouvant expliquer ce manque de spécificité (410,411). En effet, Miyashita et *al.* ont montré une diminution d'environ 30% chez les sujets diabétiques comparée à des sujets contrôles (412) et Saiki et *al.* ont montré une diminution du même ordre chez les patients présentant un IMC >25 kg/m² (413). Il a également été montré que cette concentration était corrélée à d'autres marqueurs métaboliques tels que l'HbA1c (négativement) (410), l'adiponectine (positivement) (413) et la CRP (négativement) (411).

Conformément à la littérature, nous avons observé une corrélation positive entre la concentration et l'activité post-héparinique ($r^2=0.86$, $p<0.001$ et $r^2=0.68$, $p<0.001$ pour les groupes avec une LPL normale et diminuée respectivement, 60 minutes après injection d'héparine) (408,411,414), ainsi dans la majorité des cas, il n'est pas utile de déterminer la concentration en LPL post-héparinique en plus de l'activité. Cependant, la détermination concomitante de l'activité et de la concentration post-héparinique de la LPL permet de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme (415). La détermination de l'activité spécifique peut constituer une aide à la caractérisation des déficits en LPL et implicitement à la caractérisation des variants *LPL*, en particulier les variants faux-sens (348,415), en différenciant les déficits quantitatifs des déficits qualitatifs, voire permettre d'identifier des déficits de liaison à l'héparine lorsque la concentration pré-héparinique est également déterminée (348). La détermination de l'activité spécifique de la LPL chez les sujets MCS de notre cohorte n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative 10 minutes après l'injection d'héparine que ce soit en comparaison aux sujets contrôles ou des groupes entre eux (non présenté dans l'article :

$p > 0,05$ pour chaque comparaison, avec $n=29$ pour les sujets contrôles, $n=11$ pour le groupe MCS avec activité LPL normale 60 minutes après injection d'héparine et $n=26$ pour le groupe MCS avec activité LPL diminuée 60 minutes après injection d'héparine).

Une étude spécifique sur les performances diagnostiques de la détermination de la concentration et de l'activité LPL pour le diagnostic différentiel des FCS et MCS est nécessaire et est en cours au laboratoire.

Intérêt diagnostique de la détermination de l'activité LPL 60 minutes après l'injection d'héparine.

A côté de l'exploration génétique, la détermination de l'activité LPL 10 à 15 minutes après l'injection d'héparine reste le test de référence pour l'exploration des HTG sévères, bien que son intérêt soit débattu (75,300). Nous confirmons dans cette cohorte, que le déficit en LPL est rare chez les patients MCS puisque la majorité des patients ont une activité LPL dans l'intervalle de référence (99,149). De manière paradoxale, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité LPL chez 12/62 patients, observation déjà faite par Coca-Prieto *et al.* sur une cohorte plus restreinte : le nombre de patients n'est pas explicitement précisé dans l'article mais semble de l'ordre d'une quinzaine de patients sur 55 d'après une figure (409). La détermination de l'activité LPL à ce temps n'est donc pas discriminante dans l'exploration des patients MCS. En effet, cette mesure correspond au maximum de relargage de LPL après l'injection d'héparine permettant un diagnostic aisé d'un déficit complet mais qui est mis en défaut pour mettre en évidence des variations plus subtiles.

Plusieurs arguments de la littérature ont donc motivé notre équipe à réaliser des activités LPL sur des temps post-hépariniques plus tardifs, jusqu'à 60 minutes.

- Premièrement, l'injection d'héparine chez des souris KO *gpihbp1*^{-/-} entraîne un relargage retardé de la LPL, avec un maximum atteint en 15 minutes environ contre 1 à 3 minutes chez les souris WT (113). Trois études (114,117,119) ont ensuite été menées chez des patients homozygotes pour des variants délétères *GPIHBP1*, confirmant pour deux d'entre elles, une apparition lente et progressive de la LPL jusqu'à 60 minutes

après injection d'un bolus (119) et 360 minutes d'infusion d'héparine (114), mais qui reste bien inférieure aux sujets contrôles.

- Deuxièmement, Brunzell *et al.* avaient déjà montré l'intérêt de la détermination de l'activité LPL sur des prélèvements post-hépariniques tardifs : premièrement ils avaient décrit une normalisation de l'activité LPL après infusion d'héparine pendant 5 heures chez un patient FCS (329) et dans une autre étude, ils avaient mis en évidence des anomalies de relargage de la LPL chez 12 patients diabétiques grâce à la détermination de l'activité LPL après 1 heure d'infusion d'héparine (416).

- Enfin, plusieurs auteurs ont proposé qu'il existe deux pools de LPL : un pool lié à GPIHBP1 à la surface cellulaire, rapidement mobilisable après l'injection d'héparine et un autre probablement extra-vasculaire qui serait mobilisable de façon retardée (113,417,418). L'activité LPL 10 minutes après l'injection d'héparine ne pourrait ainsi permettre d'explorer que le premier pool contrairement aux déterminations plus tardives, comme cela a été également évoqué pour les concentrations faible d'héparine (113,419).

La détermination de l'activité LPL 60 minutes après l'injection d'héparine (T60) dans notre cohorte a mis en évidence deux sous populations au sein des patients MCS : un groupe de patients présentant un défaut de liposabilité et/ou de clairance des LTRG, et un deuxième groupe, plus important, avec des patients présentant un défaut de biodisponibilité de la LPL. Le protocole d'injection d'héparine est critique puisque la réponse de relargage de la LPL est dose dépendante (419,420). Malheureusement, les protocoles d'injection d'héparine ne sont pas standardisés et varient beaucoup d'une étude à l'autre, par la dose d'héparine (10 à 100 UI/L), par les modalités d'injection (bolus ou en infusion continue) et les temps de prélèvements post-hépariniques (20 à 360 minutes) (114,117,349,415,419-423). Il est donc très difficile de comparer nos observations aux données de la littérature cependant, deux études utilisent un protocole d'injection similaire et sont partiellement informatives du fait d'un très faible nombre de sujets. Kern *et al.* ont étudié le relargage de la LPL par Western blot chez 5 patients hyperchylomicronémiques et un témoin (349). Reardon *et al.* ont décrit pour leur part la cinétique de l'activité LPL chez deux patients présentant une HTG modérée mais aucun sujet témoin (422). Ces études ont montré que les profils de relargage différaient

beaucoup d'un patient à l'autre et ont observé une corrélation positive de l'activité LPL avec le catabolisme des VLDL (FCR).

La première information importante de notre étude est que chez les témoins, l'activité LPL à T60 n'est pas significativement différente de celle à 10 minutes, suggérant une libération soutenue et prolongée de LPL. Chez les patients MCS, une majorité des patients présente une diminution de l'activité et de la concentration de LPL à T60 alors qu'un petit groupe présente une activité stable et élevée 60 minutes après l'injection d'héparine, comparable aux témoins. Malgré l'identification de deux populations, pour l'instant la détermination de l'activité à T60 ne peut constituer un test diagnostic car nos explorations phénotypiques et génétiques ont échoué à mettre en évidence le mécanisme physiopathologique sous-jacent. En revanche, nous pouvons établir des hypothèses différentes dans le mécanisme de développement de l'HTG sévère chez ces groupes de patients et en classant ces patients en fonction de ces hypothèses, nous pouvons : 1/ chercher de nouveaux gènes impliqués ; 2 / évaluer les nouvelles thérapeutiques de façon ciblée.

Comment expliquer le développement d'une HTG sévère chez les patients ne présentant pas d'anomalie du relargage de la LPL.

Une minorité des patients MCS présente un profil de relargage de la LPL et une activité LPL à T60 similaires aux sujets contrôles. De façon intéressante et paradoxale, ils présentent également une HTG plus sévère. Ces données suggèrent que le développement de cette HTG sévère est plutôt LPL-indépendant et qu'il pourrait exister chez ces patients des facteurs interférants avec la lipolysabilité des LRTG et/ou avec leur recapture hépatique. Cette hypothèse est soutenue par les profils de migration électrophorétique des lipoprotéines post-hépariniques : les modifications de migration électrophorétique induites *in vivo* par l'injection d'héparine persistent jusqu'à 60 minutes et la fraction VLDL ne disparaît pas. Ce groupe semble particulièrement intéressant pour l'identification de nouveaux mécanismes et/ou l'implication de nouveaux acteurs dans le développement des HTG sévères.

Les données de la littérature sont controversées sur la possibilité d'une altération de l'affinité relative de la LPL pour les LRTG. Le ratio TG/ApoB des VLDL est le principal facteur déterminant le K_m de la LPL *in vitro* : plus le ratio TG/ApoB augmente et donc la taille des LRTG, plus l'affinité apparente de la LPL s'accroît (253,298,424). Ainsi, l'augmentation du ratio TG/ApoB chez ce groupe de patients est en faveur de la disponibilité d'un substrat affiné pour la LPL et la diminution de ce ratio suite à l'injection d'héparine semble indiquer que les LRTG sont correctement hydrolysées.

De plus, Van Barlingen *et al.* ont isolé des VLDL de patients présentant une hyperlipidémie combinée familiale ou une HTG familiale : ils ont montré qu'en utilisant ces VLDL comme substrat, l'activité LPL n'était pas différente *in vitro*, malgré une composition différente en lipides et apolipoprotéines. En particulier qu'il n'y avait pas de modification du K_m et du V_{max} de la LPL comparé à des VLDL de sujets sains (425). Cependant, les auteurs ont utilisé de la LPL bovine et non pas humaine, et en grande quantité (0,2 μ g alors que nous utilisons des quantités de l'ordre du ng dans nos essais). L'éloignement de ces conditions par rapport aux conditions physiologiques pourrait expliquer que cette étude ait échoué à mettre en évidence une altération de lipolysabilité du substrat. Ensuite, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'ApoE4 serait capable d'inhiber la LPL en diminuant la concentration d'ApoC-II à la surface des VLDL (190,196,426).

Dans notre étude, chez ce sous-groupe particulier, il existe une surreprésentation de l'allèle $\epsilon 4$, qui n'est pas observée dans le 2^{ème} groupe ni dans les autres cohortes de patients MCS (99,319,324). Pour ces raisons, nous avons envisagé de tester la lipolysabilité des VLDL de ces patients grâce à notre technique de mesure de l'activité LPL (149). Les essais préliminaires ont mis en évidence que l'activité LPL d'un pool contrôle était significativement plus basse avec un substrat VLDL issu de ces patients comparé à un pool de VLDL contrôle (données non publiées, $n=6$ versus $n=12$; $p=0,017$) alors qu'elle n'est pas significativement différente avec un substrat VLDL issu des patients du deuxième groupe ($n=6$ versus $n=12$ $p=0,74$) (Annexe 4). En revanche, cette observation n'a pas été confirmée en utilisant les activités LPL des plasmas post-hépariniques des patients ($p=0,48$, $n=6$ pour chaque groupe également), nécessitant une poursuite de ces essais pour confirmer ces observations préliminaires. Enfin, en plus de

l'affinité *stricto sensu* de la LPL, il n'est pas possible d'exclure avec les méthodes d'évaluation *in vitro* classiques un défaut de la mise en place de la plateforme lipolytique, complexe moléculaire dont la régulation n'est toujours pas complètement élucidé à l'heure actuelle (63,249,250). Ceci ouvrirait la piste d'un éventuel gène inconnu comportant un variant chez ces malades MCS particuliers.

Le premier argument en faveur d'un défaut de recapture est l'absence de diminution significative de l'ApoB, contrairement au deuxième groupe. Cette observation suggère qu'il n'y a pas de diminution du nombre de particules en 60 minutes malgré la production de remnants (diminution du rapport TG/ApoB), alors que le $t_{1/2}$ de capture est de l'ordre d'une dizaine de minutes pour les récepteurs offrant la cinétique de clairance la plus rapide (262,263). De plus, le ratio ApoC-III/ApoB est augmenté chez ces patients : ceci est important à noter puisque l'ApoC-III est impliquée dans la capture hépatique des LRTG (10,11,281). Cependant, il est à noter que le ratio ApoC-III/ApoB-48 n'est pas modifié quant à lui, suggérant que l'ApoC-III interférerait ici majoritairement avec la clairance des VLDL plutôt que celle des remnants des CM. Il a également été proposé que l'ApoE2 puisse contribuer à diminuer la clairance hépatique des remnants de CM chez des patients porteurs de variants additionnels altérant l'activité LPL (299). Cependant, l'allèle $\epsilon 2$ n'est pas surreprésenté de façon significative dans ce groupe (fréquence allélique à 0,194 contre 0,106 en population européenne, avec $p > 0,1$). Enfin, bien que l'hypothèse d'un défaut de recapture soit séduisante, il est peu probable que nous découvrions des défauts génétiques majeurs affectant les gènes impliqués dans la synthèse des HSPG et altérant sélectivement le métabolisme des LRTG puisque les seuls variants décrits sont létaux de façon précoce par anomalies vasculaires et saignements (305) ou responsables d'autres syndromes sévères (427,428).

Comment expliquer une diminution de l'activité LPL 60 minutes après l'injection d'héparine sans anomalie 10 minutes après l'injection d'héparine.

La majorité des patients MCS présente une diminution de l'activité LPL à T60, alors qu'elle est similaire aux témoins 10 minutes après l'injection d'héparine. Ces patients présentent également une HTG modérée le jour du test, et leur concentration

maximale en TG observée n'est pas différente du premier groupe. Il est donc possible que la LPL soit fonctionnelle et présente en quantité suffisante pour assurer la lipolyse en conditions normales, mais que sa biodisponibilité ne soit pas suffisante en conditions de stress et que le système soit dépassé/saturé entraînant une HTG sévère. Les profils de migration électrophorétique montrent une disparition des VLDL très rapide suite à l'injection d'héparine, suggérant une mobilisation de la LPL et une lipolyse efficace après stimulation.

Comme mentionné précédemment, il existerait au moins deux pools de LPL : un pool lié à GPIHBP1 à la surface cellulaire et un autre probablement extravasculaire (113,417,418). Il existerait des systèmes d'échanges rapides entre ces deux secteurs (418,429). D'autre part, chez le rat et chez l'homme, des injections d'héparine répétées n'entraînent plus de pic d'activité de LPL, reflétant un épuisement de ces stocks extravasculaires (418,430). De façon intéressante, Chevreuil *et al.* ont montré chez le rat, qu'une heure après une première injection de decasaccharides (analogue de l'héparine à demi-vie plus courte), non seulement l'activité LPL post-héparinique était réduite de 75 % mais aussi que la clairance de CM radiomarqués était retardée de 30 minutes à 2 heures (431). Persson *et al.* ont fait une observation similaire chez des patients traités par perfusion d'héparine pour thrombose veineuse profonde, en montrant une réduction de 44 % de la clairance d'une émulsion lipidique injectée par voie intraveineuse (432). Ainsi, la diminution de l'activité LPL à T60, et par conséquent l'HTG sévère, pourrait être expliquée par une quantité plus limitée du stock de LPL extravasculaire soit par un défaut de recrutement d'enzyme nouvellement synthétisées ou par augmentation de sa dégradation (113,418,430).

En accord avec cette hypothèse, le variant *LMF1* p.(Arg364Gln) est surreprésenté dans ce groupe de patients (fréquence allélique à 0,0676 contre 0,0356 en population européenne, avec $p < 0,05$). En effet, ce variant fréquent (>1%) est prédit délétère par les logiciels de prédiction *in silico* (SIFT et Polyphen). Une diminution de l'activité LPL (60 % de l'activité WT) a été mise en évidence *in vitro* grâce au modèle publié récemment par notre équipe (100) alors que Surendran *et al.* n'avait décrit qu'une diminution non significative (99). En revanche, le variant fréquent *GPIHBP1* p.(C14F) n'est pas surreprésenté dans ce groupe alors que c'était un excellent candidat : GPIHBP1 permet

la disponibilité de la LPL au niveau de l'endothélium vasculaire (103,109–111) mais protège également la LPL de la dégradation (102,107,108) ; et notre équipe a montré que le variant p.C14F réduisait l'expression de GPIHBP1 à la surface cellulaire *in vitro* (116).

Les angiopoïétines seraient également de bons candidats via une augmentation de la dégradation de la LPL. Romeo *et al.* ont mis en évidence des variants d'*ANGPTL3*, *ANGPTL4*, *ANGPTL5*, *ANGPTL6* et *ANGPTL8* associés à une triglycéridémie > 75^{ème} percentile (227). Malheureusement, ces gènes ne font pas partie du panel génétique testé et nous n'avons pas pu évaluer la fréquence de ces variants dans ce groupe de patients. Cependant, pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré les concentrations circulantes d'*ANGPTL3* dans notre cohorte MCS (Quantikine® ELISA, R&D System, MN, Etats Unis). La concentration plasmatique d'*ANGPTL3* est significativement plus élevée chez les patients MCS (+22 % par rapport aux témoins) mais il n'existe pas de différence significative entre nos deux groupes identifiés ($p=0,6$, $n=10$ et $n=11$ pour les groupes avec une LPL à T60 normale et diminuée respectivement). Les données dans la littérature sont contradictoires. D'un côté, Mehta *et al.* ont montré que les concentrations en *ANGPTL3* et *4* sont positivement corrélées aux LDL-c et HDL-c, ainsi qu'aux TG plasmatiques pour *ANGPTL4* (357). D'un autre côté, Tika *et al.* n'ont pour leur part pas montré de corrélation, ni de différence de concentration d'*ANGPTL3* et *4* entre des patients hypolipidémiques et hyperlipidémiques (433).

Cependant, ces observations ne permettent pas d'exclure l'implication des angiopoïétines. Premièrement, l'inactivation de la LPL, notamment par *ANGPTL4*, a lieu en partie au niveau du sous-endothélium et il est possible que les concentrations soit augmentées seulement localement et que la concentration plasmatique ne reflète pas la concentration au niveau du sous-endothélium (209,250). Deuxièmement, dans le modèle proposé par Zhang *et al.* (208), la concentration en *ANGPTL3* est stable, quel que soit le statut nutritionnel, mais nécessite une activation par *ANGPTL8*, qui est lui induit par l'alimentation. Ainsi, *ANGPTL8* serait le facteur limitant de l'inactivation de la LPL par *ANGPTL3* et il semble donc pertinent d'également évaluer la concentration en *ANGPTL8*.

Enfin, il est également possible que la diminution du stock extravasculaire soit la conséquence d'une diminution de la synthèse de LPL par régulation épigénétique, non explorée dans notre étude. En effet, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré que l'expression des protéines dont la LPL pouvait être modulée par des miARN (73,434,435). Il pourrait donc être intéressant d'explorer les régions 3'UTR des gènes impliqués dans la cascade lipolytique chez ce groupe de patients à la recherche de variants entraînant l'apparition de site de fixation de miARN, d'étudier les profils d'expression de ces gènes au niveau des adipocytes ou des myocytes chez ces patients ainsi que les profils de miARN circulants.

Des études menées sur des cœurs perfusés ont montré que la durée de vie de la LPL à la surface de l'endothélium était assez courte (436,437). Un des mécanismes proposés est que la LPL est déplacée dans le sang circulant puis captée par le foie où elle est dégradée. Ainsi, il a été montré chez le rat que la LPL était captée par le foie avidement, suivi d'une perte de son activité catalytique (438,439). Il existerait donc un flux continu de LPL, du plasma vers le foie, et ce transport serait accéléré par l'héparine (418,439,440). Une accélération de ce flux pourrait être responsable d'une déplétion du pool extravasculaire mais seules des études cinétiques *in vivo* avec radio-traceurs permettraient d'explorer cette hypothèse. La LPL circule également liée aux TGRL (338–340) et leur recapture pourrait augmenter la clairance de la LPL (259). Cependant, cette hypothèse semble peu probable puisque nous n'observons pas de différence significative chez les témoins entre les activités 10 et 60 minutes après l'injection alors qu'ils présentent une clairance hépatique présumée optimale.

VALIDATION D'UNE STRATEGIE DE SEQUENÇAGE HAUT DEBIT POUR LA DETECTION DES VARIATIONS DE NUCLEOTIDES, DES PETITES INSETIONS-DELETION ET DES GRANDS REARRNGEMENTS DANS LES DYSLIPIDEMIES MONOGENIQUES

Cette étude rapporte la performance d'un nouveau panel ciblé de NGS pour le diagnostic moléculaire des dyslipidémies monogéniques par : 1/une validation de méthode sur une cohorte de 75 patients présentant des variants délétères déjà identifiés par les techniques conventionnelles ; 2/une évaluation de son utilisation pour le diagnostic moléculaire de routine sur une cohorte prospective de 140 patients.

Intérêt de la détection des CNV dans les dyslipidémies primitives

Les CNV responsables d'une perte de fonction du *LDLR* sont reconnus depuis longtemps comme une cause moléculaire significative d'hypercholestérolémie familiale, puisque d'après la base de données ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) et plusieurs cohortes publiées, ils représentent environ 10% des variants *LDLR* (369,441–444). En effet, au cours des trente dernières années, les études moléculaires ont montré un nombre important d'occurrence naturelle de grands réarrangements du *LDLR* : 118 grands réarrangements sont décrits dans la base de données de l'université de Londres (<https://www.LOVD.nl/LDLR>) alors que 1589 variants ponctuels sont rapportés (368). Parmi les 98 séquences *Alu* du *LDLR*, 95 sont introniques et représentent 85% des séquences introniques en dehors des régions d'épissage, expliquant pourquoi la plupart de ces grands réarrangements sont *in frame* et concernent des exons entiers (445). Sur ces arguments et en disposant simultanément d'une méthode de référence pour comparaison (kit MLPA), le gène *LDLR* a été le premier à être évalué pour la détection de CNV dans les dyslipidémies. En 2017, Iacocca *et al.* ont montré une sensibilité de 100% de la détection de CNV par études bio-informatiques des données de séquençage ciblé haut débit (403). Ces données sont confirmées avec notre stratégie Ampliseq™ suggérant que ces stratégies pourraient ainsi remplacer la MLPA dans le diagnostic des dyslipidémies.

L'implication des CNV dans les autres dyslipidémies reste largement non explorée. En effet, durant les vingt dernières années, les explorations génétiques étaient concentrées sur les variants ponctuels, du fait de stratégies de séquençage exon par exon (445). Concernant les HTG sévères, l'implication des CNV a déjà été décrite de façon anecdotique pour les gènes *LPL* (304,392), *GPIHBP1* (117,121) et *APOA5* (405) et l'exploitation bio-informatique des données de séquençage devrait permettre une détection plus aisée techniquement et moins onéreuse. Notre étude a été la première à mettre en évidence une délétion de 5 exons du gène *LPL* grâce à une stratégie de séquençage haut débit ciblée. En effet, Patni *et al.* ont mis en évidence une délétion homozygote de 54 kb comprenant le gène *GPIHBP1* seulement grâce à une stratégie de séquençage génome entier avec analyse bio-informatique, alors que leur stratégie de séquençage NGS ciblé n'avait pas mis en évidence de variants pour les gènes *LPL*, *LMF1*, *GPIHBP1*, *APOC2* et *APOA5* (446) ; il n'est pas précisé dans la publication si leur stratégie ciblée permet ou non la détection des CNV. D'autre part, Kerkhof *et al.* ont validé la détection de CNV par NGS dans plusieurs panels de séquençage NGS ciblés, dont un de 72 gènes pour les dyslipidémies comprenant les principaux gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques (447). Sur une cohorte de 391 patients, ils ont mis en évidence des CNV pour *ABCA1*, *AGPAT2*, *LDLR*, *LPIN1* et *MTTP* mais pour aucun gène concernant les HTG sévères. Cependant, les descriptions devraient se multiplier très rapidement compte tenu de l'accroissement de l'utilisation des techniques de séquençage haut débit dans les laboratoires de diagnostic, comme le laisse présager le résumé présenté par Dron *et al.* au congrès international d'athérosclérose de Toronto en juin 2018, décrivant la détection d'une délétion partielle du gène *LPL* et d'une délétion complète du gène *APOA5* (404).

Adéquation de la technologie et du choix du panel dans la problématique diagnostique

La conception du panel Ampliseq™ a été réalisée entre 2012 et 2013. A cette date, nous avons pris en compte les gènes principaux des dyslipidémies monogéniques sauf le gène *APOE*, en raison des difficultés connues d'amplification liées à son contenu important en GC (448,449). Les capacités de séquençage de la technique Ampliseq™

étant limitées à 300 – 600 mégabases pour une puce 316 (données fournisseurs), il était nécessaire de trouver un compromis entre le nombre de gènes séquencés et le nombre de patients inclus dans chaque série. Nous avons donc décidé de ne pas inclure les gènes impliqués dans dyslipidémies rares et/ou de transmission récessive (*MTPP*, *SAR1B*, *LIPA*, *LDLRAP1*, *ABCG5*...) (359,450,451) pour cette raison mais aussi sur les arguments suivants :

- à l'époque l'exploration de ces gènes était souvent réservée à de rares cas et réalisée dans un seul laboratoire en France (par exemple à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière pour les hypercholestérolémies récessives).

- Dans la plupart des cas, le phénotype lipidique et l'histoire familiale peuvent fournir une présomption forte, comme pour les dysbetalipoprotéïnémies et le gène *APOE* puisqu'il existe des arguments biochimiques d'orientation (452–454) (voir Annexe 5 et Annexe 6) ou pour la maladie d'Anderson et le gène *SAR1B* dont le phénotype clinico-biologique est très évocateur (455). A cela s'ajoutait une motivation économique puisque ces gènes contiennent moins de 10 exons, le séquençage Sanger restait moins onéreux.

- A l'époque, la détection des CNV sur les données de séquençage haut débit n'avait pas été publiée (voir paragraphe 3.1.3)

Notre étude a montré que cette stratégie est robuste et efficace pour le diagnostic moléculaire des variants nucléotidiques et des grands réarrangements dans les gènes connus déterminant les dyslipidémies monogéniques. Malgré une amélioration du diagnostic moléculaire par cette stratégie NGS, après quelques mois d'utilisation nous avons pu constater plusieurs limites de la technique Ampliseq™ :

- les gènes analysés se limitaient aux gènes dont l'implication était prouvée dans les dyslipidémies et seulement dans celles d'origine monogénique.

- 6% des régions n'étaient pas suffisamment couvertes (profondeur < 30X) pour garantir la fiabilité du diagnostic moléculaire. Le reséquençage des régions concernées par séquençage Sanger était chronophage et coûteux.

- la qualité des séquences obtenues par technique Ampliseq™ est inférieure à celle obtenue par les technologies développées *a posteriori* et est connue pour être mise en défaut dans des régions difficile à amplifier (séquences répétées, régions riche en GC) (395).

Enfin, les modifications pour ajouter de nouvelles régions ou pour améliorer les performances initiales passent le plus souvent par le développement d'un nouveau panel qui est onéreux.

Secondairement, il s'est avéré que le développement par la société Illumina® du séquenceur NextSeq 500®, adapté au diagnostic moléculaire de routine présentait un bon compromis entre coût de l'investissement et capacité et qualité de séquençage. Les résultats des essais réalisés par d'autres équipes du CHU nous ont encouragés à faire évoluer notre stratégie (456,457). Ainsi en 2016, nous avons développé une nouvelle stratégie NGS basée sur un panel à façon NimbleGen SeqCapEZ (Roche®) et un séquençage sur NextSeq500® (Illumina®) (voir Annexe 7). Ce panel permet d'analyser 380 gènes incluant non seulement les gènes les plus prévalents des hypercholestérolémies, des hypobetalipoprotéïnémies et des HTG mais aussi des gènes impliqués dans les formes rares, les syndromes incluant une dyslipidémie (Syndromes de Smith-Lemli-Opitz, de McKusick-Kaufman, de Shwachman-Diamond), impliqués dans le métabolisme des lipides ou associés à des variations de cholestérolémie et triglycérémie en population générale.

Les objectifs de cette nouvelle stratégie NGS sont :

- d'identifier des formes de dyslipidémie exceptionnelle : nous avons ainsi mis en évidence une forme atypique de syndrome de Smith-Lemli-Opitz, avec une apparition tardive et une hypocholestérolémie dominant le tableau (voir Annexe 8)
- de mettre en évidence de nouveaux gènes causaux impliqués dans les dyslipidémies. En effet, la découverte de nouveaux gènes reste envisageable en raison de la proportion importante de patients pour lesquels les stratégies classiques ne permettent pas de mettre en évidence de variant génétique : de l'ordre de 30 à 50% pour les HTG sévères (76,299,301), de l'ordre de 30 à 50% dans les hypercholestérolémies avec un score de Dutch supérieur à 5 (444,458) et de 34 à 56 % dans les hypobetalipoprotéïnémie (377,459). A l'heure actuelle, les études de séquençage d'exome et de génome entier par NGS chez des patients présentés comme nouveaux ou atypiques, ont surtout conduit à l'identification de variants dans des gènes déjà connus comme *APOE*, *APOB*, *LIPA*, *ABCA1* et *ANGPTL3* (202,221,372,375,376,460-462).

- améliorer l'évaluation des interactions gène-gène avec mise en évidence de l'association de variants pouvant moduler la sévérité du phénotype et la détermination des scores polygéniques (voir paragraphe suivant).

Les stratégies de NGS en panel sont désormais remises en question par l'amélioration de l'accessibilité aux techniques de type exome et le développement des technologies de séquençage de 3^{ème} génération (« *large fragment single molecule sequencing* », séquençage de fragment long). Ces technologies évitent la mise au point de nouveaux panels et permettront à terme l'utilisation d'une seule technique de séquençage quel que soit la porte d'entrée clinique, améliorant ainsi la prise en charge des patients à phénotype complexe. Cependant, actuellement les qualités de séquençage de ces technologies ne sont pas encore suffisantes pour garantir une qualité de diagnostic équivalente à celle obtenues avec les stratégies de NGS en panel. Notamment, les capacités de mise en évidence des CNV sont insuffisantes (463,464). Enfin, ces technologies permettant l'analyse de l'ensemble des séquences codantes d'un patient, mettent en évidence un grand nombre de variants par patient (environ 18000 variants identifiés pour une analyse de type exome dans l'étude de Musunuru et *al.* (221)) et soulèvent des questions éthiques à propos des découvertes « incidentales » (fortuite). A ce jour, les sociétés savantes américaines (*American College of Medical Genetics and Association of Medical Pathologists*, ACMG) proposent l'analyse systématique de gènes dits « actionnables » (découverte de variants délétères sur des gènes prédisposant aux cancers ou à certaines pathologies pour lesquels il existe un dépistage, une prévention ou un traitement). Parmi eux, les gènes *LDLR*, *APOB* et *PCSK9* ont été décrits pour l'hypercholestérolémie familiale (465).

Apport du NGS dans la compréhension des interactions gènes-gènes

Grâce au séquençage en parallèle des principaux gènes candidats des dyslipidémies, notre stratégie Ampliseq™ améliore la détection de doubles hétérozygotes (variants hétérozygotes pour plusieurs gènes, pour lesquels la coexistence de variants peut annuler ou amplifier leur effet respectif) et l'évaluation des formes polygéniques.

L'identification des doubles hétérozygotes est importante pour le dépistage familial et le traitement de tous les membres atteints (462). Il est d'autant plus intéressant d'explorer tous les gènes candidats des dyslipidémies puisque plusieurs gènes sont impliqués dans les hyper et hypolipidémies : certains gènes présentent à la fois des variants gain de fonction et perte de fonction, comme *ANGPTL3*, *APOC3*, *PCSK9* ou encore le gène *APOB* peut présenter des variants pouvant affecter la sécrétion de l'ApoB ou sa reconnaissance par le LDLR.

Ici encore, en raison de sa fréquence et du déploiement important des capacités de diagnostic moléculaire, l'hypercholestérolémie familiale est pionnière et peut servir d'exemple pour l'étude des interactions gène-gène dans les dyslipidémies. Plusieurs études ont déjà rapporté l'association de variants *LDLR/APOB* (466–471), de l'association de variants *LDLR/PCSK9* (472,473) et l'association de variants *APOB/PCSK9* (462). Ces études rapportent l'effet additif de variants hypercholestérolémiant, mais il a également été décrit l'association de variants hypercholestérolémiant et hypocholestérolémiant pouvant conduire à une abolition des phénotypes (474–476). De façon similaire, dans notre cohorte explorée par la stratégie Ampliseq™, la mise en évidence de deux VSI *APOB*, en plus d'un variant délétère *LDLR*, a motivé une exploration familiale révélant l'existence de phénotypes hypercholestérolémiques et hypocholestérolémiques au sein d'une même famille (voir article 2). Pour évaluer la prévalence de ce type d'association, Huijgen *et al.* ont étudié 4669 patients porteurs de variants responsables d'hypercholestérolémie familiale : parmi eux, seuls 75 (1,6%) des patients présentaient des concentrations de LDL-c inférieures au 50^{ème} percentile (477), montrant la rareté de ces phénotypes. Par séquençage des gènes *APOB*, *PCSK9* et *ANGPTL3*, ils ont mis en évidence que 5/75 patients présentaient des variants perte de fonction *APOB* expliquant l'abolition du phénotype et la majorité des patients présentaient des variants fréquents associés à une diminution du LDL-c. De façon intéressante, 12/75 patients ne présentaient aucun variant additionnel, laissant espérer la découverte d'autres gènes régulateurs.

D'autre part, il a été proposé qu'une grande partie des patients hypercholestérolémiques pour lesquels aucun variant délétère n'a été identifié, présente une forme polygénique, avec l'association de plusieurs variants fréquents entraînant

chacun un faible effet sur la concentration en LDL-c, mais qui cumulés entraînent une augmentation du LDL-c comparable à celle des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (369,478). Plusieurs scores de risque polygénique ont été proposés et évalués sur des cohortes de patients hypercholestérolémiques, combinant 6 (479,480), 10 (369) ou 12 (481,482) variants fréquents (SNP). Les études menées sur de larges cohortes de patients ont montré que ces scores de risque polygénique étaient plus élevés chez les patients hypercholestérolémiques sans variant délétère comparé à une population contrôle (369,480,481), et deux études ont estimé que l'augmentation du score polygénique pouvait expliquer l'augmentation du LDL-c chez 29 à 36 % de ces patients (369,458). Cependant, ces scores sont également augmentés chez les patients porteurs de variants délétères responsables d'hypercholestérolémie familiale. De plus, deux équipes ont montré qu'à l'échelle individuelle, ces scores de risque polygénique ne permettaient pas de différencier les sujets hypercholestérolémiques des sujets sains issus d'une même famille, qu'il existe (479) ou non des variants causaux d'hypercholestérolémie dans ces familles (482).

Ainsi, l'évaluation des scores polygéniques en parallèle du séquençage des gènes candidats permettrait d'acquérir des informations complémentaires :

- par la mise en évidence d'une modulation de la sévérité du phénotype chez des patients présentant par ailleurs un variant délétère ;
- en permettant d'évaluer la charge polygénique afin de motiver ou non la poursuite des explorations.

Plusieurs scores sont disponibles avec une composition en variants différente, alors que la fréquence des variants utilisés semblent directement impacter le pouvoir discriminant de ces scores (480,482). Une évaluation de ces différents scores au sein d'une même cohorte génétiquement bien caractérisée, c'est-à-dire avec recherche systématique de CNV et *a minima* séquençage de l'intégralité du gène *APOB*, voir des gènes moins fréquemment impliqués dans les hypercholestérolémies (*ABCG5*, *ABCG8*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LRP6*, *STAP1*) est nécessaire.

Concernant les HTG sévères, le caractère oligogénique des MCS et la description de patients FCS présentant des variants hétérozygotes composites pour plusieurs gènes

(301) imposent le séquençage en parallèle, par NGS ou non, *a minima* des gènes les plus fréquemment impliqués : *LPL*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1*, *APOC2*. Des scores de risque polygéniques ont également été proposés pour la concentration en TG (483,484) mais aucune étude dans la littérature actuelle ne rapporte leur performance dans des cohortes de patients présentant une HTG sévère. Cependant, Dron *et al.*, ont rapporté l'utilisation d'un score polygénique dans une cohorte de 337 patients avec une concentration en TG > 10 mmol/L, sans préciser les variants utilisés (résumé présenté au congrès de l'IAS à Toronto en juin 2018) (321).

L'augmentation du nombre de gènes avec le panel NimbleGen SeqCapEZ® décuple les possibilités de détection de ces interactions gène-gène. Cependant, à l'heure actuelle, les variants rares identifiés dans les gènes non-candidats sont certes peu informatifs en diagnostic clinique, mais ils permettent de progresser dans la compréhension du métabolisme des lipides et dans les étiologies polygéniques des dyslipidémies (464).

Conséquences de la mise en place des techniques des séquençages haut débit dans le diagnostic moléculaire des dyslipidémies

Le développement de stratégie NGS en diagnostic moléculaire permet l'exploration de plus grandes régions géniques chez un plus grand nombre de patients. Une des conséquences directes est la mise en évidence d'un plus grand nombre de variants. Malgré l'existence de recommandations rédigées par le collège américain des généticiens moléculaires (ACMG) (485), l'interprétation des variants faux-sens et intronique proche site d'épissage reste délicate (486). En effet, ces recommandations sont générales et applicables à toutes les pathologies et par conséquent n'intègrent pas les spécificités des dyslipidémies et il est regrettable qu'il n'existe pas de consensus spécifique à l'heure actuelle (301,487). Ainsi, le nombre de variants de signification inconnue est important, de l'ordre de 46,8 % pour les gènes des hypercholestérolémies d'après une étude de Chora *et al* (487).

Parmi les outils disponibles pour la classification des variants, les bases de données issues des projets de séquençage de génome à grande échelle, tel que ExAC et 1000 Genomes project (488,489), sont précieuses en fournissant les fréquences de variants en population générale et pour différentes ethnies. Cependant, l'utilisation de ces fréquences n'est pas aisée dans les pathologies de transmission récessives. D'autre part, il existe également des bases de données répertoriant les variants identifiés dans une ou plusieurs pathologies ou dans la population générale (368,490,491), avec leur classification en terme de pathogénicité. L'augmentation du contenu de ces bases de données et le perfectionnement des outils bio-informatiques, devrait améliorer l'efficacité du filtrage des variants. A cet effet, plusieurs outils sont d'ores et déjà disponibles sur internet (<https://varsome.com/>) : les critères ACMG sont automatiquement pré-remplies mais sont, à l'heure actuelle, incomplets.

Ensuite, pour appréhender le caractère délétère d'un variant, l'outil le plus accessible aux biologistes moléculaires demeure l'étude de ségrégation familiale du variant (492,493). Cependant, ces études sont fastidieuses et chronophages pour obtenir les résultats d'un nombre suffisant d'apparentés et demandent une collaboration clinico-biologique étroite. De plus, ces études sont parfois non informatives particulièrement en cas de phénotype douteux ou variable, et parfois ne permettent pas de conclure avec certitude ; ceci est d'autant plus vrai pour les pathologies polygéniques telles que les dyslipidémies.

Enfin, les études démontrant un effet délétère *in vitro* ou *in vivo* sont également essentielles à l'interprétation de ces variants bien que plus difficiles d'accès (487,494). Elles ne sont disponibles que pour une faible proportion des variants décrits dans les gènes candidats, par exemple seulement pour 8% des variants décrits dans les gènes des hypercholestérolémies (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) (487). Il est donc indispensable pour un laboratoire de référence de développer et de maîtriser des tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo*, permettant au quotidien ou à des fins scientifiques de caractériser les variants identifiés par notre stratégie NGS. Ainsi, nous avons publié en 2014 une technique de détermination de l'activité LPL (149), et cette détermination est recommandée par un groupe d'expert européens pour établir le caractère délétère de nouveaux variants du gène *LPL* (300). De plus, nous avons également adapté avec succès cette technique afin

de tester *in vitro* la fonctionnalité de variants du gène *LMF1* (100). D'autre part, il est également nécessaire de maîtriser des techniques d'évaluation de l'épissage (495), tel que les études par minigènes, auquel nous avons eu recours dans l'article 2 et dans des études précédentes (496).

Depuis 2014, cette stratégie NGS a permis d'explorer un plus grand nombre de gènes, et par conséquent d'améliorer le diagnostic moléculaire des dyslipidémies en diminuant le temps analytique, à coût technique constant. Cependant, l'interprétation biologique des variants identifiés est plus complexe et implique la mise en œuvre d'analyses complémentaires coûteuses, chronophages et une collaboration multidisciplinaire.

CONCLUSION

L'ensemble de nos résultats souligne la complexité des mécanismes de régulation du métabolisme des LRTG. Ils illustrent en particulier la nécessité de conduire des corrélations phénotypes-génotypes précises et méticuleuses afin d'améliorer et d'approfondir nos connaissances physiopathologiques. Les stratégies d'exploration des anomalies du métabolisme des LRTG ne cessent d'évoluer, en particulier depuis l'arrivée des technologies de séquençage de nouvelle génération qui ont complètement révolutionné ce domaine. Cependant, il reste indispensable d'y associer des études phénotypiques. Depuis sa publication en 2014 (149), deux travaux menés par l'équipe, l'article 1 et les travaux de Marine Dancer (100), ont confirmé que la détermination de l'activité LPL demeure un outil précieux d'étude fonctionnelle de la LPL. Plusieurs pistes sont encore envisageables dans ce domaine, notamment l'évaluation de la lipolysabilité des substrats par détermination d'activité LPL sur les propres VLDL des patients, à confronter à la composition des LRTG par analyses protéomique et lipidomique.

D'autre part, les groupes de MCS identifiés grâce à l'étude de l'article 1, fournissent de nouvelles approches pour identifier de nouveaux mécanismes et/ou l'implication de nouveaux acteurs dans le développement des HTG sévères. Concernant le sous-groupe de MCS ne présentant pas de diminution d'activité LPL 60 minutes après l'injection d'héparine, il pourrait être intéressant d'évaluer la qualité du substrat comme mentionné ci-dessus, d'explorer la recapture hépatique en réalisant des études *in vivo* avec radiotraceur ou d'étudier les gènes impliqués dans la synthèse des protéoglycans. Concernant le sous-groupe présentant une altération de la biodisponibilité de la LPL, les gènes classiquement impliqués et explorés dans la stabilité de LPL n'ont pas montré d'altérations majeures. Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer plus précisément à l'aide de score polygénique si l'accumulation de variants à elle seule permettrait d'expliquer la diminution du stock de LPL. Cependant, une faible proportion d'entre eux (n=6) ne présente aucun variants sur ces gènes, laissant l'opportunité de découvrir de nouveaux acteurs du métabolisme de la LPL ou la mise en évidence de mécanismes de régulation additionnels, épigénétiques par exemple. La poursuite des avancées technologiques de séquençage, avec la mise en place des techniques de séquençage par

nanopores, devrait rendre accessible la détection des variations épigénétiques dans un futur proche.

Enfin, notre première stratégie NGS présentée ici a ouvert la voie à de nouvelles perspectives. En effet, comme évoqué précédemment, les avancées technologiques sont très rapides et nous avons déjà fait évoluer notre stratégie. En effet, en 2016, nous avons développé et validé une nouvelle stratégie NGS basée sur un panel à façon NimbleGen SeqCapEZ® (Roche®) et un séquençage sur NextSeq500® (Illumina®) (voir Annexe 7). L'exploration de 380 gènes incluant non seulement les gènes les plus prévalents des hypercholestérolemies, des hypobetalipoprotéïnemies et des HTG mais aussi des gènes impliqués dans les formes rares, les syndromes incluant une dyslipidémie, impliqués dans le métabolisme des lipides ou associés à des variations de cholestérolémie et triglycéridémie en population générale ouvre de nouveaux horizons pour la mise en évidence des interactions gène-gène, dans la découverte de nouveaux acteurs ou pour préciser le rôle d'acteurs déjà connus.

ANNEXES

Annexe 1. Table des gènes étudiés et des transcrits associés

<i>APOA5</i>	NM_001166598.1
<i>APOB</i>	NM_000384.2
<i>APOC2</i>	NM_000483.4
<i>ANGPTL3</i>	NM_014495.3
<i>GPIHBP1</i>	NM_178172.5
<i>LDLR</i>	NM_000527.4
<i>LMF1</i>	NM_022773.3
<i>LPL</i>	NM_000237.2
<i>PCSK9</i>	NM_174936.3

Annexe 2 . « Systematic assay of lipoprotein Lipase activity and mass in a cohort of patient with history of type V hyperlipidemia », poster présenté au 84^{ème} congrès de l'EAS, 29 mai-01 juin 2016, Innsbruck et au 12^{ème} congrès de la NSFA, Juin 2016, Biarritz

SYSTEMATIC ASSAY OF LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY AND MASS IN A COHORT OF PATIENTS WITH HISTORY OF TYPE V HYPERLIPIDEMIA



Marmontel O^{1,4}, Nony S¹, Marçais C^{3,4}, Caussy 2,4S, Charrière S^{2,4}, Sassolas A^{1,4}, Moulin P^{2,4}, Di Filippo, M^{1,4}

¹Dept of Biochemistry, GHE, Hospices Civils de Lyon, France; ² Dept of Endocrinology, GHE, Hospices Civils de Lyon, France; ³Dept of Biochemistry, CHLS, Hospices Civils de Lyon, France; ⁴Inserm U1060 CarMeN, Univ Lyon1, LYON, France



MATERIAL AND METHODS

LPL phenotypic exploration was undertaken in order to decipher the mechanisms involved in these heterogeneous phenotypes. It might provide valuable information in case of negative or unavailable molecular diagnosis.

Patients 25 patients with documented history of type V dyslipidemia (Plasma TG concentration (TG) > 15 mmol/l or familial history of hypertriglyceridemia with TG >10 mmol/l) and 20 adults control subjects. Criteria of exclusion : carriers of homozygous or compound heterozygous mutations on *LPL*, *GPIIIBP1*, *APOA5* or *APOC2* genes.

Patients and control subjects were hospitalized and received an intravenous heparin bolus (50 IU kg⁻¹ bodyweight) after an overnight fast.

Lipid profiles (serum) were obtained with commercial available kits (Abbott®). LDL-cholesterol was determined both by Friedwald formula and by ultracentrifugation if TG were > 3,9 mmol/L.

Post heparin LPL activities were performed as previously described by Di Filippo et al. LPL mass was measured in plasma using the Alpco® commercially available kit

Clinical data (sex, age, BMI, Thyroid disease, diabetes mellitus, lipids-lowering treatment) were collected.

Statistical analysis. Differences between groups were assessed by t test and Fisher Exact test. Calculations were performed using Graphpad prim software, v.5.

OBJECTIVES

To decipher the functionality of Lipoprotein Lipase in type V dyslipidemia

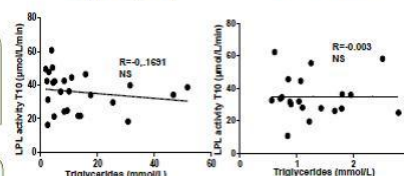
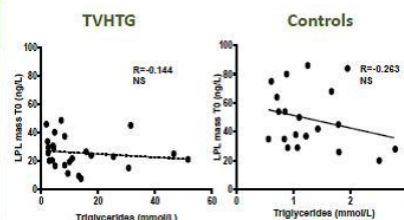
RESULTS AND DISCUSSION

	TVHTG n=25	Controls n=20	
male/female, n	5/20	9/11	NS
Age, years	42 ± 2.0	52 ± 3.7	NS
BMI, kg/m ²	27.7 [26.3-29.0]	NA	
Diabete, n	8/25	NA	
Pancreatitis, n	6/20	NA	
Highest plasma triglyceride levels recorded, mmol/L	39.1 [24.9-53.3]	NA	
Triglycerides, mmol/L	13.4 [7.7-19.0]	1.3 [1.0-1.6]	***
Cholesterol, mmol/L	9.2 [6.9-11.5]	4.0 [3.5-4.5]	***
HDL cholesterol, mmol/L	0.77 [0.68-0.86]	1.1 [0.94-1.26]	***
LDL cholesterol, mmol/L	2.5 [1.8-3.1]	2.4 [2.0-2.8]	NS

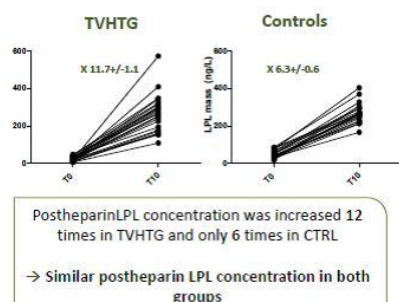
	TVHTG n=25	Controls n=20	
LPL mass T0 ng/L	25.9 [21.3-30.5]	49.0 [39.2-58.7]	***
LPL mass T10 ng/L	266.6 [225.1-307.5]	268.6 [243.2-293.9]	NS
PHLA T10 µmol/L/min	35.9 [31.2-40.6]	34.8 [28.8-40.8]	NS
LPL specific activity mmol/g/min	137.5 [121.1-1539]	128.1 [112.2-144.0]	NS

Preheparin LPL concentration was 47% lower in TVHTG patients, but 14/25 TVHTG patients exhibited LPL mass within the normal range and 2/20 controls exhibited LPL mass below the normal range

No patient had PHLA deficiency (< 10 µmol/L/min) and 6 patients have even LPL activity above the reference interval



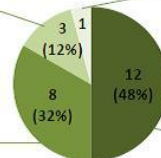
In TVHTG and CTRL, preheparin LPL mass and PHLA were not correlated with plasma triglycerides



Hypothesis for physiopathological mechanisms of TVHTG

Low LPL activity and mass (lower heparin mobilization), suggesting defect in LPL production was found in 3 (12%) of TVHTG

Normal LPL mass and activity suggesting over production and/or alteration in remnant uptake was found in 8 (32%) patients, although there is only a single carrier of ε2



Lower specific LPL activity suggesting defective regulation of the enzyme in only 1/25 TVHTG patient, despite WT sequence of V genes involved in LPL activity, except APOA5 S19W heterozygosity

Low preheparin LPL mass with normal PHLA (successful heparin mobilization) suggesting a partial defect in LPL availability was found 12 (48%) of TVHTG

CONCLUSION

In patients with TVHTG, simultaneous determination of LPL mass and activity (especially preheparin LPL concentration) is valuable to elucidate the type V hyperlipidemia complex heterogeneity.

Annexe 3. « Strong heterogeneity in plasma triglycerides lipolysis in multifactorial chylomicronemia », poster présenté au 85^{ème} congrès de l'EAS, 23-26 Avril 2017, Prague

STRONG HETEROGENEITY IN PLASMA TRIGLYCERIDE LIPOLYSIS IN MULTIFACTORIAL CHYLOMICRONEMIA

Marmontel, O^{1,2}; Di Filippo, M^{1,2}; Marçais C^{2,3}; Nony, S¹; Dumoux, M¹; Dancer, M^{2,3}; Caussy C^{3,4}; Charrière S^{2,3,4}; Moulin P^{2,3,4}

¹Dept of Biochemistry, GHE, Hospices Civils de Lyon, France; ²Inserm U1060 CarMeN, Univ Lyon1, LYON, France; ³Dept of Biochemistry, CHLS, Hospices Civils de Lyon, France; ⁴Dept of Endocrinology, GHE, Hospices Civils de Lyon, France



Heterogeneity and mechanisms of multifactorial chylomicronemia (MCM) remain poorly understood. To gain new insights, lipolysis was measured 60 minutes (PHLA60) after the injection of a bolus of heparin, in addition to the 10 minutes time point (PHLA10) most commonly used

MATERIAL AND METHODS

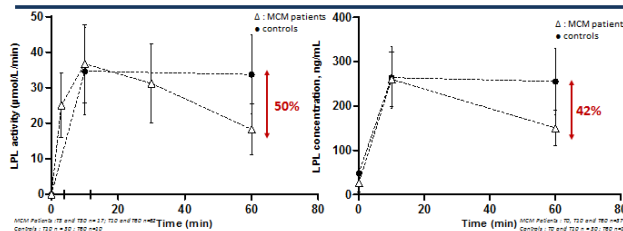
Patients 62 patients with documented history of type V dyslipidemia (Plasma TG concentration (TG) > 15 mmol/l or familial history of hypertriglyceridemia with TG >10 mmol/l) compared to 30 adults control subjects. Criteria of exclusion : carriers of homozygous or compound heterozygous mutations on *LPL*, *GPIIIBP1*, *APOA5*, *APOC2* or *APOE* genes.

Patients and control subjects were hospitalized and received an intravenous heparin bolus (50 IU kg⁻¹ bodyweight) after an overnight fast.

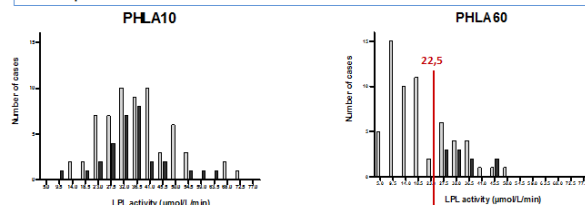
Statistical analysis. Differences between groups were assessed by t test using Graphpad prim software, v.5. Hardy-Weinberg proportion test was applied with Fisher's exact

Lipid profiles (serum) were obtained with commercial available kits (Abbott®). LDL-cholesterol and triglycerides-chylomirons were determined by ultracentrifugation. Post heparin LPL activities were performed as previously described (Di Filippo et al plos one 2014). LPL mass was measured in plasma using the Alpcos® Elisa kit. Clinical data (sex, age, BMI, Thyroid disease, diabetes mellitus, lipids-lowering treatment) were collected.

RESULTS AND DISCUSSION



- Control subjects : PHLA60 and LPL60 did not differ from PHLA10 and LPL10
- MCM patients : PHLA60 and LPL60 both decreased by 50% and 42% compared to PHLA10 and LPL10



- Homogenous and Gaussian distribution of PHLA10
- PHLA60 was normally distributed only in controls whereas in MCM patients, a bimodal distribution was observed
- Individualization of 2 subgroups of patients: one with normal PHLA60 and one with low PHLA60

Heterozygous carrier *	Normal PHLA60	Low PHLA60
<i>LPL</i> mutation	2 (p.W91X, p.I245T)	4 (p.A98T, p.G215E, p.P200LfsX7, p.L209YfsX43)
<i>APOA5</i> mutation	2 (p.Q97X, p.Q295X, R143AFfsX57)	4 (p.Y110LfsX158, p.L198RfsX65, p.L253P, p.A315V)
<i>APOE</i> mutation		1 (p.R163C)

no patient had more than one mutation

Heterozygous mutations for *LPL* and *APOA5* genes were found in both group

→ Low PHLA T60: no increase of genetic defect : defect in LPL bioavailability or stability ?

Lipid profiles performed the day of heparin injection	Normal PHLA60 N=19	Low PHLA60 N=43	p
Sex male/female, n	16/3	29/14	NS
Age, years	43±9	45±12	NS
BMI, kg/m ²	28.8±2.8	27.8±4.8	NS
Pancreatitis, n(%)	4 (21.1%)	13 (30.2%)	NS
Diabetes n (%)	9 (47.4%)	15 (34.8%)	NS
TG, mmol/L	15.79 [13.01-27.29]	5.56 [5.03-8.69]	< 0.001
TG-Chylomicrons, %	20.60 [17.67-44.60]	4.27 [5.56-16.25]	< 0.001
TC, mmol/L	11.31±5.89	6.71±2.42	< 0.001
TG/TC	1.7±0.8	1.0±0.7	0.001
HDLc, mmol/L	0.66±0.16	0.86±0.24	0.001
LDLc, mmol/L	2.04±1.94	2.81±1.62	NS
Apo B, g/L	1.20±0.57	1.13±0.36	NS
TC/Apo B	3.8±1.7	2.3±0.5	< 0.001
TG/Apo B	19.2±15.1	6.6±6.1	< 0.001
Apo CII, g/L	0.224±0.12	0.15±0.07	< 0.05
Apo CIII, g/L	0.62±0.32	0.34±0.23	< 0.01
Apo CII/Apo CIII	0.39±0.12	0.45±0.16	0.17
Apo B48, g/L	0.06±0.04	0.03±0.02	< 0.01
Highest plasma TG levels recorded, mmol/L	31.6 [28.7-57.40]	29.64 [25.99-40.88]	NS

In patients with normal PHLA60

- Apo CII/CIII tends to be decreased
- TGRL were found TG enriched with a higher TG/TC and TG/Apo B ratio
- Defect in VLDL lipolysability or hepatic clearance ?

In patients with low PHLA60

- Lower baseline TG and chylomicron TG
- Better lipid biochemical marker profile in general

Gene	Variation	European population ¹	Allele frequency			
			Normal PHLA60 n=18	HWP test ² χ ²	Low PHLA60 n=42	HWP test ² χ ²
<i>LPL</i>	p.D36N	0.0151	0.0278	0.418	0.0238	0.471
	p.N318S	0.0202	0.0000	0.749	0.0476	3.450
<i>APOA5</i>	p.S19W	0.0864	0.3611	43.500	0.2262	40.400
<i>GPIIIBP1</i>	p.C14F	0.1062	0.0556	1.149	0.0952	1.140
<i>APOC3</i>	c.*40G>C	0.1611	0.0833	1.090	0.1786	1.060
<i>APOE</i>	ε2 (p.C130R)	0.2078	0.3333	0.718	0.1310	3.210
	ε4 (p.R176C)	0.1060	0.1944	4.900	0.1190	0.600

¹ <http://www.kopenbioinformatics.org/>

² Hardy Weinberg proportion test : χ² test, α=0.05

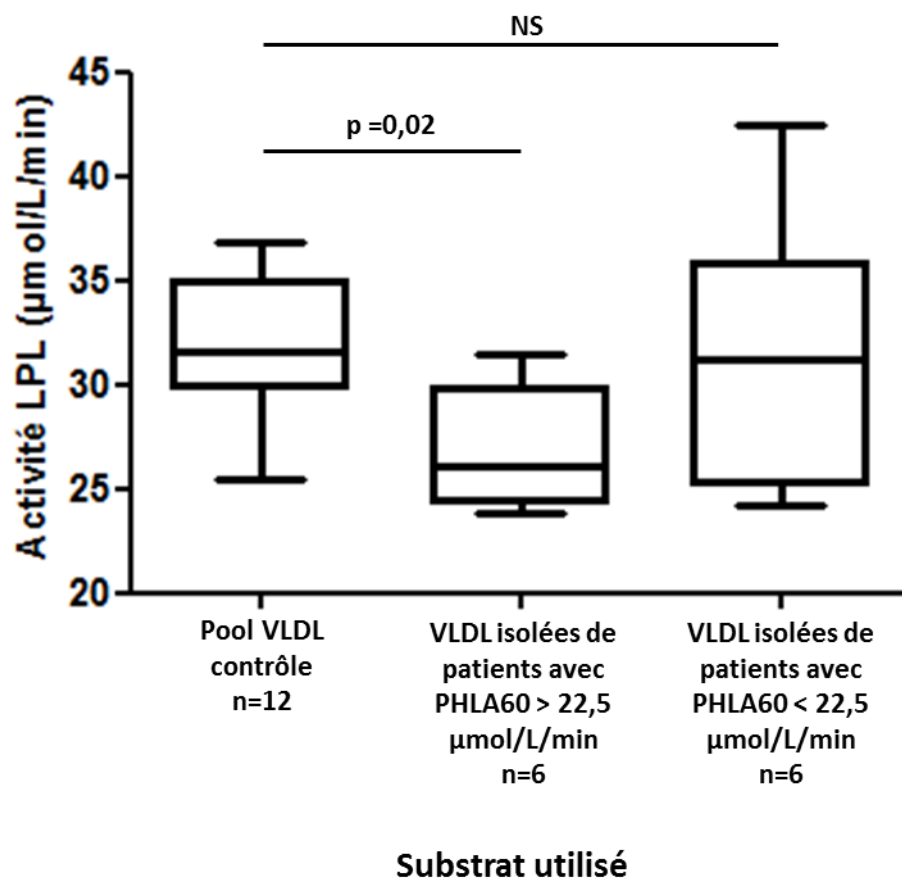
- APOA5* S19W was overrepresented in both group
- ε4 was overrepresented in normal PHLA60 group

CONCLUSION

Our study indicates that assessment of PHLA60 allows the individualization of two subgroups of patients in the heterogeneous population of MCM. One with sustained normal LPL activity the second one with apparently normal LPL activity at PHLA10 and unsustained activity one hour after heparin injection.

The conjunction of phenotypic and genetic data supports the hypothesis of a deregulated balance between triglycerides rich lipoproteins (TGRL) lipolysability, LPL bioavailability, and/or lipoprotein hepatic clearance in MCM

Annexe 4. Détermination de l'activité LPL sur des VLDL isolées de différents patients MCS



La détermination de l'activité de la LPL a été réalisée grâce à un pool de plasma post-héparinique comme décrit précédemment (149).

Le pool de VLDL contrôle a été réalisé comme décrit précédemment (149), et les VLDL de patients ont été isolées de manière identique.

Annexe 5. « Variabilité de l'expression phénotypique des mutations du gène *APOE* », poster présenté au 10^{ème} congrès de la NSFA, Juin 2014, Biarritz

Variabilité de l'expression phénotypique des mutations du gène *APOE*

O. Marmontel^{1,3}, M. Di Filippo^{1,3}, M. Galland¹, M. Dumoux¹, M. Lapoirie², A. Villard², S. Charrière^{2,3}, P. Moulin^{2,3}, A. Sassolas^{1,2}



1. UF Dyslipidémie et Cardiobiologie, Laboratoire de Biochimie, GHE, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France,
2. Service d'Endocrinologie Adulte, GHE, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France 3
3. Inserm U1060 CarMeN, Univ Lyon1, LYON, France



CONTEXTE

* Les mutations du gène *APOE* ont été décrites comme responsables de dysbetalipoprotéinémies familiales, avec une transmission autosomique dominante. Cependant peu d'études décrivent précisément leur impact phénotypique.

➔ **Objectif** : Evaluation et comparaison du phénotype lipidique de patients porteurs de mutation du gène *APOE*, suspects de dysbetalipoprotéinémie ou apparentés

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PATIENTS

- * N=19
- * Age >18 ans
- * Absence de traitement hypolipémiant
- * Suspect de dysbetalipoprotéinémie ou apparentés
- * Porteurs d'une mutation du gène *APOE*

DONNÉES ETUDIÉES

- * **Bilans lipidiques** :
 - * Cholestérol total (CT), triglycérides (TG), HDL-cholestérol, Apolipoprotéine B (Architect, ABBOTT®)
 - * LDL cholestérol et fraction VLDL (Ultracentrifugation)
- * **Polymorphismes et mutations gène *APOE***
 - * Extraction ADN (EDTA) : kit Nucléon® Amersham
 - * Séquençage direct de l'exon 4 (Applied®)
- * **Comorbidités associées**
 - * Indice masse corporelle (IMC)
 - * Diabète
 - * Fonction thyroïdienne
 - * Iatrogénie

CRITÈRES DYSLIPIDÉMIE

- * CT > 7 mmol/L
- * TG > 3,37 mmol/L

99^{ème} percentile

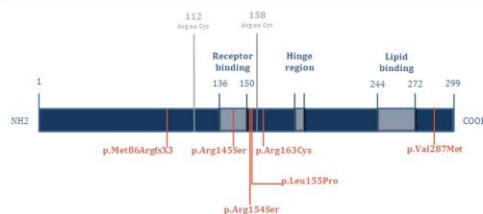
CRITÈRES DYSBETALIPOPROTEINEMIE

- * LDL calculé > LDL ultracentrifugation,
- * CT/ApoB > 3
- * C-VLDL/TG > 0,25 et C-VLDL/TG-VLDL > 0,40

ANALYSE STATISTIQUES

- * R statistical software, v.3.0.1.
- * Fisher's Exact and Wilcoxon Test

RÉSULTATS



MUTATIONS MISES EN ÉVIDENCE

- * p.Met 86ArgfsX3
 - * N=1
 - * Non décrite
- * p.Arg154Ser
 - * N=7 (3 familles)
 - * Mutation Christchurch
- * p.Arg163Cys
 - * N=5 (3 familles)
 - * Mutation Rail
- * p.Gly145Asp
 - * N=2 (2 familles)
 - * Mutation Weisbrager
- * p.Leu155Pro
 - * N=3 (3 familles)
 - * Non décrite
- * p.Val287Met
 - * N=1
 - * Non décrite

BILAN LIPIDIQUE

	NL n=7	DL n=12	p
CT	mmol/L 3,96±0,77	11,18±3,68	<0,01
TG	mmol/L 1,05±0,52	6,83±4,42	<0,01
LDL-C	mmol/L 2,06±0,72	3,84±2,09	0,04
HDL-C	mmol/L		
ApoB	g/L 0,59±0,17	1,21±0,68	0,01
CT/ApoB	2,66±0,49	4,33±2,68	0,03

→ 63% sont dyslipidémiques
→ Une patiente avec **phénotype atypique**
- LDL cholestérol / 7 (8,61 mmol/L)
- HTG mineure (TG=3,89 mmol/L)
- ApoB à 2,7 g/L soit CT/ApoB = 1,81

CRITÈRES BIOCHIMIQUES TYPE III

	NL n=7	DL n=12	p
> 2 Critères	2 (29%)	12 (100%)	<0,01
LDL<LDLc	5 (70%)	12 (100%)	0,12
CT/ApoB>3	2 (29%)	9 (75%)	0,34
Rapport fraction VLDL pathologique	3 (43%)	9 (75%)	0,02

→ **Prévalence +++** des ces critères
→ Influence de la **mutation** ?
- Rapports de la fraction VLDL : pathologiques dans 80% des cas pour p.Arg163Cys vs 14,2% pour p.Arg154Ser
- CT/ApoB : pathologiques dans 40% des cas pour p.Arg163Cys vs 28% pour p.Arg154Ser

GÈNE *APOE*

	NL n=7	DL n=12	p
Mutation <i>APOE</i> homozygote	1 (14%)	0	0,37
Présence d'un allèle ε2 ou plus de l'allèle muté	3 (43%)	7 (58%)	0,65

→ Confirmation du **caractère dominant**
→ Role non prédominant de l'allèle

COMORBIDITÉS

	NL n=7	DL n=12	p
Au moins une comorbidité	0	12 (100%)	<0,01
IMC > 25 kg/m ²	0	8 (67%)	0,01
Diabète type 2	0	4 (33%)	<0,01
Hypothyroïdie	0	1 (8%)	1
Traitement antirétroviral	0	1 (8%)	1

→ Tous les patients dyslipidémiques **présentent au moins une comorbidité associée**

CONCLUSIONS

- * **Grande variabilité phénotypique**
 - * Certains patients avec un **LDLc élevé** pour des porteurs de mutation du gène *APOE*
 - A rapprocher de la description récente de mutation du gène *APOE* dans trois familles d'hypercholestérolémie familiale.
- * Opportunité du séquençage du gène *APOE* dans les **hyperlipidémies mixtes atypique à caractère familial**.
- * Association d'un comorbidité dans l'expression de la maladie
 - **Dépistage familial** pour maîtriser ces facteurs chez les porteurs de la mutation.

Variability of phenotypic expression in patients carriers of *APOE* gene mutations



³Dept of Biochemistry, CHLS, Hospices Civils de Lyon, France; ⁴Inserm U1060 CarMeN, Univ Lyon1, LYON, France



Dysbetalipoproteinemia (or type III hyperlipidemia, OMIM 107741), a highly atherogenic disorder of lipoprotein metabolism that results in mixed hyperlipidemia. This dyslipidemia may occur both in $\epsilon 2/\epsilon 2$ carriers and patients with heterozygous *APOE* mutation, whom phenotype is much less established.

Lipid profiles (serum) were obtained with commercial available kits (Abbott®). VLDL were isolated by density gradient ultracentrifugation ($d = 1.006$; Ultracentrifuge Sorvall®, 140 000 tr/min). LDL-cholesterol was determined both with Friedewald formula and ultracentrifugation.

- DNA extraction (EDTA) : kit Nucléon® Amersham
- Screening of mutations on the exon 4 of *APOE* gene (direct sequencing, Applied®)

- Bioinformatic analysis was performed with Almut v2.0

- Dyslipidemia : CT > 7 mmol/L¹ and/or TG > 3,37 mmol/L¹
- Dysbetalipoproteinemia : LDL-Cholesterol (LDLC) Friedwald>LDLCultracentrifugation and/or TC/ApoB>3 and/or VLDL-C/TG>0.25 and/or VLDL-C/VLDL-TG>0.40

Differences between groups were assessed by Wilcoxon test and Fisher Exact test. Calculations were performed using R statistical software, v.3.0.1.

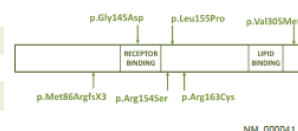
To compare the phenotypes in $\epsilon 2/\epsilon 2$ vs heterozygous *APOE* mutation carriers

```

graph TD
    Cohorte["Cohorte  
N = 486 patients"] --> e2e2["ε2/ε2  
N=54"]
    Cohorte --> Heterozygous["Heterozygous mutation on APOE  
N=26 probands ; N=18 relatives"]
    e2e2 --> e2e2_age["Age > 18  
Absence of lipid-lowering therapy  
N=18"]
    Heterozygous --> Heterozygous_age["Age > 18  
Absence of lipid-lowering therapy  
N=14 probands ; N=5 relatives"]

```

Mutation	N Proband	Référence	SIFT	Polyphen
p.Met86ArgfsX3	1	Unpublished	Truncated protein	
p.Gly145Asp	2	Weisgraber, 1984	0.09	1
p.Arg154Ser	3	Wardell, 1982	0	0.998
p.Leu155Pro	3	Unpublished	0.02	1
p.Arg163Cys	4	Rall, 1982	0	1
p.Val305Met	1	Corbo 2006 ²	0.14	0.85



Lipid values

Biochemical criteria of dysbetalipoproteinemia

- 12/19 patients were dyslipidemic, with CT and TG concentration similar to $\epsilon 2/\epsilon 2$ patients
- 2 patients exhibited an atypical increase of LDLc ultracentrifugation with TC/ApoB<3
 - p.Arg163Cys carrier : LDLc ultracentrifugation = 8.61 mmol/L and ApoB = 2.4 g/L (Ct/ApoB=2.9)
 - p.Val305Met carrier : LDLc ultracentrifugation = 10.51 mmol/L and ApoB = 2.7 g/L (Ct/ApoB=1.8)

→ 2 APOE mutations have already been described as « Familial hypercholesterolemia like » : p.Leu167del and p.[Glu263Lys>Glu264Lys]

Demographic data				Comorbidities				Allelic frequency				Associated allele			
	Non dyslipidemic	Dyslipidemic			Non dyslipidemic	Dyslipidemic			Non dyslipidemic	Dyslipidemic			Non dyslipidemic	Dyslipidemic	
Age	34 ± 5	47 ± 4	< 0.05	Diabete	0/4	5/11	<0.05	ε3	71.4%	54.2%	75-95%	ε3	4/7	4/10	
Sex	1/7	5/12	NS	Obesity (BMI>25kg/m ²)	0/4	9/11	<0.01	ε2	28.6%	37.5%	5-15%	ε2	3/7	6/10	
				Hypothroidv	0/4	1/10	NS	ε4	0%	8.3%	7-15%				

All dyslipidemic patients exhibit at least one comorbidity. Therefore, these comorbidities seem to play a major role in the expression of dyslipidemia even if the severity of dyslipidemia is not correlated to the number of comorbidities

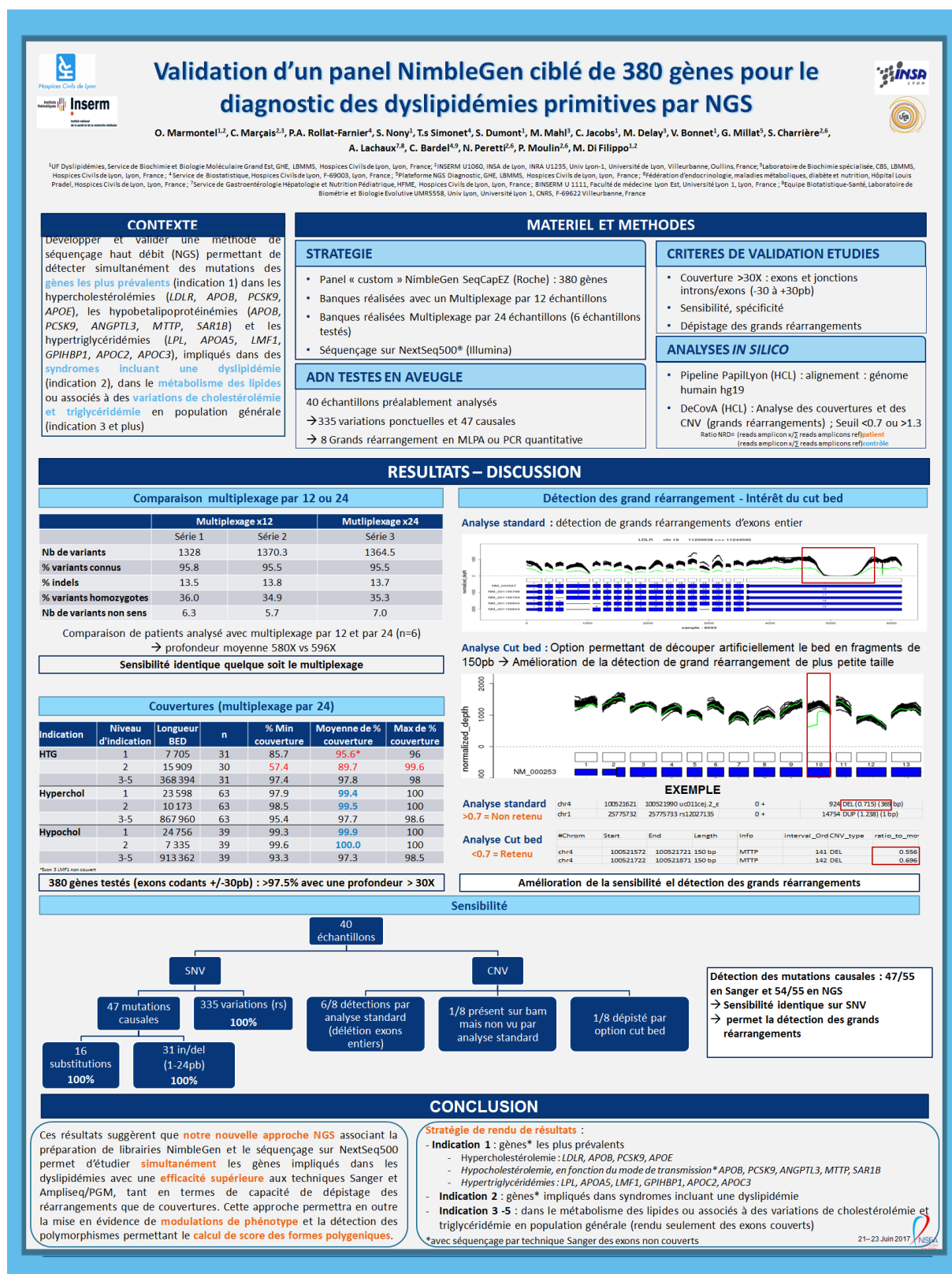
ε2 allele was not more frequently associated with the mutated allele
→ Argument for a dominant inheritance?

A large phenotypic variability is found in carriers of *APOE* mutations. In agreement with the *APOE* mutations recently described in three families with familial hypercholesterolemia, we report 2 additional patients with high LDL-cholesterol. These findings raise the question of sequencing *APOE* in unexplained primary hypercholesterolemia with mild hypertriglyceridemia and increased ApoB.

NS : non significative ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$



Annexe 7. « Validation d'un panel NimbleGen ciblé de 380 gènes pour le diagnostic des dyslipidémies primitives par NGS », poster présenté au 13^{ème} congrès de la NSFA, Juin 2017, Biarritz



Annexe 8. « Apport du panel Nimblegen de 380 gènes pour le diagnostic des hypocholestérolémies primitives : à propos de 3 cas », poster présenté au 13^{ème} congrès de la NSFA, Juin 2017, Biarritz

Apport du panel NimbleGen de 380 gènes pour le diagnostic des hypocholestérolémies primitives : à propos de 3 cas

Mathilde Di Filippo^{1,2}, Pierre Antoine Rollat Farnier³, Thomas Simonet⁴, Oriane Marmontel^{1,2}, Cécile Acquaviva⁵, Pascale Benlian⁶, Laetitia Boidin-Ceschini⁷, Séverine Nony⁸, Sabrina Dumont⁹, Véronique Bonnet¹⁰, Chantal Jacobs¹¹, Gilles Millat¹², Christophe Marçais¹³, Claire Bardel¹⁴, Sybil Charrière¹⁵, Alain Lachaux^{16,17}, Philippe Moulin¹⁸, Noël Peretti^{12,19}

¹UF Dyslipidémies, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, GHE, LBMM, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ²INSERM U1060, INSA de Lyon, INRA U1235, Univ Lyon-1, Université de Lyon, Villeurbanne, Oullins, France; ³Service de Biostatistiques, Hospices Civils de Lyon, F-69003, Lyon, France; ⁴UF Maladies Héritières du métabolisme Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, GHE, LBMM, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁵Unité de Médecine Moléculaire des Maladies Métaboliques (U4M), Service Génopathies, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHRU Lille, Lille, France; ⁶Plateforme NGS Diagnostic, GHE, LBMM, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁷Laboratoire de Biochimie spécialisée, CBS, LBMM, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁸Equipe Biostatistiques-Santé, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, F-69622 Villeurbanne, France; ⁹Fédération d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques, Diabète et Nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ¹⁰Service de Gastroentérologie Hépatologie et Nutrition Pédiatrique, HFME, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ¹¹INSERM U 1113, Faculté de médecine Lyon Est, Université Lyon 1, Lyon, France

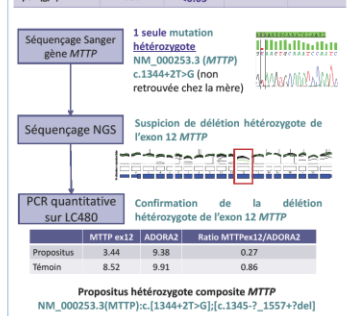
CONTEXTE	MATERIEL ET METHODES
Le diagnostic moléculaire des hypocholestérolémies repose classiquement sur le séquençage Sanger. Cependant, les mutations causales ne sont pas identifiées dans 100% des cas : absence de détection des réarrangements (Copy Number Variation, CNV) hétérozygotes, techniques longues limitant le nombre de gènes explorés.	SCREENING : NGS NIMBLEGEN/NEXTSEQ500 - Panel « custom » NimbleGen SeqCapEZ (Roche) : 380 gènes - les plus prévalents (indication 1) dans les hypobetalipoprotéinémies : - APOB, PCSK9, ANGPTL3 pour les formes co-dominantes - MTTP, SAR1B pour les formes récessives - impliqués plus rarement dans des hypocholestérolémies (indication 2) - impliqués dans des syndromes incluant une dyslipidémie, dans le métabolisme des lipides ou associés à des variations de cholestérolémie en population générale (indications 3 à 5) - Séquençage sur NextSeq500® (Illumina)
OBJECTIF	ANALYSES BIOINFORMATIQUES
Identifier les mutations causales chez 3 propositus présentant une hypobetalipoprotéinémie, après échec des explorations génétiques classiques, en utilisant une stratégie de séquençage haut débit.	- Pipeline Papillon, logiciel DeCovA (développés par les bioinformaticiens des Hospices Civils de Lyon) - Couverture >30x : exons et jonctions introns/exons (-30 à +30pb)
	CONFIRMATION
	- Séquençage Sanger - PCR quantitative sur LC480 (Roche)

RESULTATS – DISCUSSION

Cas 1 : Abetalipoprotéinémie et CNV

Petite fille 8 mois originaire du Congo, admise pour gastroentérite aiguë (10-20 selles/j) avec cassure de sa courbe de croissance.
Une abetalipoprotéinémie (ABL), causée par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composées sur le gène MTTP, a été suspectée devant la symptomatologie et l'hypocholestérolémie sévère dont la transmission semble récessive.

	Mère	Propositus	Propositus	% Sœur
Age	22	9 mois	10 mois	
CT mmol/L (g/L)	5.01 (1.93)	0.75 (0.29)	0.84 (0.32)	3.18 (1.23)
TG mmol/L (g/L)	1.22 (1.07)	0.06 (0.05)	<0.04	0.90 (0.79)
CHDL mmol/L (g/L)	1.14 (0.44)	0.50 (0.19)	0.89 (0.34)	0.63 (0.24)
CLDL mmol/L (g/L)	3.32 (1.28)	0.22 (0.08)	ND	2.14 (0.83)
ApoA1 (g/L)		0.46	0.56	0.91
ApoB (g/L)	0.92	<0.03		



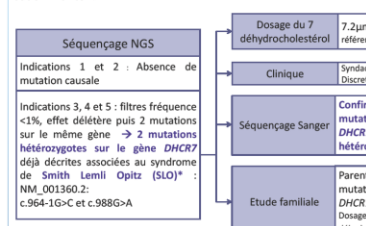
→ La technique NGS permet la mise en évidence de réarrangements et d'établir le diagnostic d'ABL

CONCLUSION

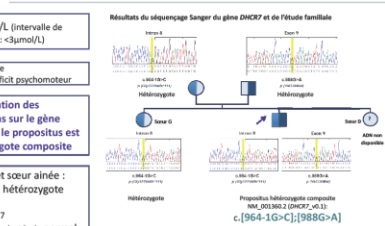
Cette nouvelle approche NGS permet de mettre en évidence des grands réarrangements hétérozygotes, non détectables par technique Sanger, y compris sur des gènes pour lesquels les techniques de MLPA ne sont pas disponibles.
La découverte de mutations chez les cas 2 et 3 montre l'intérêt de séquençage des gènes inexplorés jusqu'à présents, impliqués dans des syndromes incluant une dyslipidémie et/ou associés à des modulations de taux de cholestérol LDL.
Cette stratégie permet donc d'améliorer le diagnostic étiologique des hypobetalipoprotéinémies génétiques. Elle pourrait en outre révéler à terme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cas 2 : forme récessive atypique: Smith Lemli Opitz

Patient de 20 ans présentant une cassure de la courbe de croissance traité par GH, une insuffisance thyroïdienne substituée par Lévothyrox (TSH effondrée à 0.01mU/L, T3L et T4L normales à 4.1µmol/L et 16.6 pmol/L) et une surdité congénitale unilatérale. Les parents ne présentent pas d'hypocholestérolémie : mutation de novo, transmission récessive ou codominante ?



	Mère	Père	Sœur 2	Propositus	Sœur D
Age	54	51	22	20	18
CT mmol/L (g/L)	4.97 (1.92)	4.01 (1.55)	3.74 (1.44)	2.40 (0.93)	5.95 (2.30)
TG mmol/L (g/L)	1.00 (0.89)	0.99 (0.88)	0.69 (0.61)	0.84 (0.74)	0.95 (0.84)
CHDL mmol/L (g/L)	2.13 (0.82)	1.28 (0.49)	1.6 (0.62)	1.17 (0.45)	1.88 (0.73)
CLDL mmol/L (g/L)	2.39 (0.92)	2.28 (0.88)	1.8 (0.71)	0.85 (0.33)	3.64 (1.41)
ApoB (g/L)				0.33	



*Syndrome de Smith Lemli Opitz : OMIM#270400 syndrome polytransmittal rare (incidence 1/15 000 à 1/100 000 de transmission récessive. Les patients peuvent présenter des anomalies faciales, cardiaques, rénales, dentaires, gastro-intestinales, génitales, pulmonaires et une syndactylie, un retard mental et un retard de croissance. Ce syndrome est causé par des mutations sur le gène DHCR7 codant la 7-déhydrocholestérol réductase qui catalyse la réduction de la double liaison C7-C8 du cholestérol 5,7-dien-3β-ol en cholestérol. Ces patients présentent donc une hypocholestérolémie et une augmentation du 7-déhydrocholestérol.

→ Diagnostic moléculaire d'une forme fruste tardive de syndrome de Smith Lemli Opitz responsable de l'hypocholestérolémie

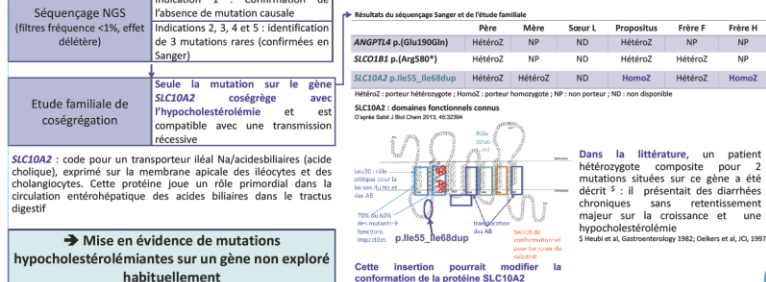
Cas 3 : Mutation sur gène associé aux variations de taux de cholestérol : SLC10A2

Garçon de 9 ans d'origine algérienne, adressé en 2007 pour diarrhées chroniques depuis l'âge de 5-6mois : 4 à 10 selles par jour, grasses, souvent glaireuses, parfois sanglantes, rythmées par les repas : une selle au moins après chaque repas. Peu de retentissement sur la croissance : croissance normale (poids : sur la moyenne, taille +1.5DS).

Hypocholestérolémie de transmission récessive et diarrhée → Abetalipoprotéinémie ? Hypobetalipoprotéinémie ?

	Père	Mère	Sœur 1	Propositus	Frère F	Frère H
Age	40	34	11	9	4	9mois
CT mmol/L (g/L)	4.8 (1.85)	4.74 (1.92)	3.54 (1.37)	2.48 (0.96)	3.35 (1.29)	2.99 (1.15)
TG mmol/L (g/L)	1.19 (1.05)	1.33 (1.18)	0.68 (0.60)	0.63 (0.56)	1.53* (1.35)	1.47 (1.30)
CHDL mmol/L (g/L)	1.09 (0.42)	0.96 (0.38)	1.26 (0.49)	1.59 (0.61)	1.09 (0.42)	1.36 (0.53)
CLDL mmol/L (g/L)	3.17 (1.22)	3.36 (1.22)	1.97 (0.76)	0.60 (0.23)	1.57* (0.61)	0.96 (0.37)
ApoB (g/L)	0.80	0.85	0.63	0.18	0.43	0.32

*Bilan lipidique réalisé à 17h, patient non à jeun de 12h.



BIBLIOGRAPHIE

1. Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol*. 2011 Aug;22(4):247–53.
2. Kockx M, Kritharides L. Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Cardiol Clin*. 2018 May;36(2):265–75.
3. Brahm A, Hegele RA. Hypertriglyceridemia. *Nutrients*. 2013 Mar 22;5(3):981–1001.
4. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*. 1996 Apr;37(4):693–707.
5. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Aug;2(8):655–66.
6. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011 Jul;217(1):3–46.
7. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Jun;11(6):352–62.
8. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res*. 2011 Feb;52(2):189–206.
9. Nogueira J-P, Maraninchi M, Béliard S, Padilla N, Duvillard L, Mancini J, et al. Absence of acute inhibitory effect of insulin on chylomicron production in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):1039–44.
10. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, Alexander VJ, Singleton W, Hughes SG, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2200–6.
11. Gaudet D, Alexander VJ, Baker BF, Brisson D, Tremblay K, Singleton W, et al. Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2015 Jul 30;373(5):438–47.
12. Julve J, Martín-Campos JM, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta*. 2016 Apr 1;455:134–48.
13. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation: *Curr Opin Lipidol*. 2014 Jun;25(3):200–6.
14. Mansbach CM, Siddiqi SA. The Biogenesis of Chylomicrons. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17;72(1):315–33.
15. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun;296(6):E1183-1194.

16. Anant S, Davidson NO. Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Apr;12(2):159–65.
17. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Lewis GF. New Insights into the Regulation of Chylomicron Production. *Annu Rev Nutr*. 2015 Jul 17;35(1):265–94.
18. Hamilton RL, Wong JS, Cham CM, Nielsen LB, Young SG. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res*. 1998 Aug;39(8):1543–57.
19. Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schürmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep*. 2013 Feb 22;33(1):1–9.
20. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Sep;22(9):353–63.
21. Mu H, Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res*. 2005 Nov;44(6):430–48.
22. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017 [cited 2018 May 22]. p. 1–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c170012>
23. Sundaram M, Yao Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab*. 2010 Apr 27;7:35.
24. Rustaeus S, Lindberg K, Stillemark P, Claesson C, Asp L, Larsson T, et al. Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. *J Nutr*. 1999;129(2S Suppl):463S–466S.
25. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*. 2001 Apr;12(2):151–7.
26. Olofsson SO, Asp L, Borén J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1999 Aug;10(4):341–6.
27. Yang LY, Kuksis A, Myher JJ, Steiner G. Contribution of de novo fatty acid synthesis to very low density lipoprotein triacylglycerols: evidence from mass isotopomer distribution analysis of fatty acids synthesized from [2H6]ethanol. *J Lipid Res*. 1996 Feb;37(2):262–74.
28. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 May;32(5):1079–86.
29. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem*. 1987 Dec 5;262(34):16394–402.
30. Gusarova V, Seo J, Sullivan ML, Watkins SC, Brodsky JL, Fisher EA. Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19453–62.

31. Swift LL. Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31491–5.
32. Hossain T, Riad A, Siddiqi S, Parthasarathy S, Siddiqi SA. Mature VLDL triggers the biogenesis of a distinct vesicle from the trans-Golgi network for its export to the plasma membrane. *Biochem J.* 2014 Apr 1;459(1):47–58.
33. Asp L, Magnusson B, Rutberg M, Li L, Borén J, Olofsson S-O. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Mar;25(3):566–70.
34. Olofsson S-O, Borén J. Apolipoprotein B secretory regulation by degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Jun;32(6):1334–8.
35. Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res.* 1992 Feb;33(2):167–78.
36. Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86(24):9647–51.
37. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med Berl Ger.* 2002 Dec;80(12):753–69.
38. Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J.* 1992 Oct 15;287 (Pt 2):337–47.
39. Wassef L, Quadro L. Uptake of dietary retinoids at the maternal-fetal barrier: in vivo evidence for the role of lipoprotein lipase and alternative pathways. *J Biol Chem.* 2011 Sep 16;286(37):32198–207.
40. Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gåfvels M, Kozarsky KF, et al. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26550–7.
41. Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Oct;13(5):471–81.
42. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* 1997 Sep;38(9):1722–9.
43. Mamputu JC, Levesque L, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Oct;20(10):2212–9.
44. Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Mar;15(3):392–9.

45. Takahashi M, Yagyu H, Tazoe F, Nagashima S, Ohshiro T, Okada K, et al. Macrophage lipoprotein lipase modulates the development of atherosclerosis but not adiposity. *J Lipid Res.* 2013 Apr;54(4):1124–34.
46. Ross CJD, Twisk J, Meulenberg JM, Liu G, van den Oever K, Moraal E, et al. Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation. *Hum Gene Ther.* 2004 Sep;15(9):906–19.
47. van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem.* 1994 Feb 11;269(6):4626–33.
48. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Aug;297(2):E271-288.
49. Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem.* 2002 Sep;269(18):4701–10.
50. Wong H, Yang D, Hill JS, Davis RC, Nikazy J, Schotz MC. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5594–8.
51. Peterson J, Fujimoto WY, Brunzell JD. Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res.* 1992 Aug;33(8):1165–70.
52. Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jan 3;1123(1):1–17.
53. Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, et al. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem.* 1994 Apr 8;269(14):10319–23.
54. Lookene A, Groot NB, Kastelein JJ, Olivecrona G, Bruin T. Mutation of tryptophan residues in lipoprotein lipase. Effects on stability, immunoreactivity, and catalytic properties. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):766–72.
55. Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. *J Lipid Res.* 2001 Aug;42(8):1180–6.
56. Hussain MM, Obunike JC, Shaheen A, Hussain MJ, Shelness GS, Goldberg IJ. High affinity binding between lipoprotein lipase and lipoproteins involves multiple ionic and hydrophobic interactions, does not require enzyme activity, and is modulated by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29324–30.
57. Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtiss LK, Gretch DG, Sturley SL, et al. Lipoprotein lipase association with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7;270(14):8081–6.

58. Boren J, Lookene A, Makoveichuk E, Xiang S, Gustafsson M, Liu H, et al. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):26916–22.
59. Ma Y, Henderson HE, Liu MS, Zhang H, Forsythe IJ, Clarke-Lewis I, et al. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J Lipid Res*. 1994 Nov;35(11):2049–59.
60. Olivecrona T, Liu G, Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G. Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem Soc Trans*. 1993 May;21(2):509–13.
61. McIlhargey TL, Yang Y, Wong H, Hill JS. Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):23027–35.
62. Voss CV, Davies BSJ, Tat S, Gin P, Fong LG, Pelletier C, et al. Mutations in lipoprotein lipase that block binding to the endothelial cell transporter GPIHBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7980–4.
63. Adeyo O, Goulbourne CN, Bensadoun A, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 and the intravascular processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med*. 2012 Dec;272(6):528–40.
64. Young SG, Davies BSJ, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res*. 2011 Nov;52(11):1869–84.
65. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jul;1841(7):919–33.
66. He P-P, Jiang T, OuYang X-P, Liang Y-Q, Zou J-Q, Wang Y, et al. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2018 May;480:126–37.
67. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. 2002 Dec;43(12):1997–2006.
68. Ahn J, Lee H, Chung CH, Ha T. High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):664–9.
69. Chen T, Li Z, Tu J, Zhu W, Ge J, Zheng X, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett*. 2011 Feb 18;585(4):657–63.

70. He P-P, Ouyang X-P, Tang Y-Y, Liao L, Wang Z-B, Lv Y-C, et al. MicroRNA-590 attenuates lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting lipoprotein lipase gene in human THP-1 macrophages. *Biochimie*. 2014 Nov;106:81–90.
71. Bouvy-Liivrand M, Heinäniemi M, John E, Schneider JG, Sauter T, Sinkkonen L. Combinatorial regulation of lipoprotein lipase by microRNAs during mouse adipogenesis. *RNA Biol*. 2014;11(1):76–91.
72. Ghanbari M, Franco OH, de Looper HWJ, Hofman A, Erkeland SJ, Dehghan A. Genetic Variations in MicroRNA-Binding Sites Affect MicroRNA-Mediated Regulation of Several Genes Associated With Cardio-metabolic Phenotypes. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015 Jun;8(3):473–86.
73. Caussy C, Charrière S, Meirhaeghe A, Dallongeville J, Lefai E, Rome S, et al. Multiple microRNA regulation of lipoprotein lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a triglyceride-lowering haplotype harboring p.Ser474Ter. *Atherosclerosis*. 2016 Mar;246:280–6.
74. Rabacchi C, D'Addato S, Palmisano S, Lucchi T, Bertolini S, Calandra S, et al. Clinical and genetic features of 3 patients with familial chylomicronemia due to mutations in GPIHBP1 gene. *J Clin Lipidol*. 2016 Aug;10(4):915–921.e4.
75. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(1):1–12.
76. Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol*. 2014 Jun;8(3):287–95.
77. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev*. 2013 Mar 1;27(5):459–84.
78. Sagoo GS, Tatt I, Salanti G, Butterworth AS, Sarwar N, van Maarle M, et al. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008 Dec 1;168(11):1233–46.
79. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2901–7.
80. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1997 Dec;135(2):145–59.
81. Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res*. 2006 Sep;47(9):1908–14.
82. Zhang H, Henderson H, Gagne SE, Clee SM, Miao L, Liu G, et al. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jul 26;1302(2):159–66.

83. Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJP, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):1236–45.
84. Ranganathan G, Vu D, Kern PA. Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with the 3' untranslated region. *J Biol Chem.* 1997 Jan 24;272(4):2515–9.
85. Middelberg RPS, Ferreira MAR, Henders AK, Heath AC, Madden PAF, Montgomery GW, et al. Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40/APOE-C1-C2-C4 genes are associated with multiple cardiovascular-related traits. *BMC Med Genet.* 2011 Sep 24;12:123.
86. Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL, Warnes GR, et al. Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):149–51.
87. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):161–9.
88. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):47–55.
89. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):56–65.
90. Caussy C. Régulation épigénétique de la lipolyse intravasculaire des triglycérides [Internet]. Université Claude Bernard - Lyon I; 2015. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01281354/document>
91. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Jun;21(3):198–203.
92. Péterfy M. Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):790–4.
93. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.* 2007 Dec;39(12):1483–7.
94. Sha H, Sun S, Francisco AB, Ehrhardt N, Xue Z, Liu L, et al. The ER-associated degradation adaptor protein Sel1L regulates LPL secretion and lipid metabolism. *Cell Metab.* 2014 Sep 2;20(3):458–70.
95. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11):4584–90.

96. Cefalù AB, Spina R, Noto D, Ingrassia V, Valenti V, Giammanco A, et al. Identification of a novel LMF1 nonsense mutation responsible for severe hypertriglyceridemia by targeted next-generation sequencing. *J Clin Lipidol*. 2017 Feb;11(1):272–281.e8.
97. Liu Y, Xu J, Tao W, Yu R, Zhang X. A Compound Heterozygous Mutation of Lipase Maturation Factor 1 is Responsible for Hypertriglyceridemia of a Patient. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Jun 15;
98. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Feb 1;5(1):66–72.
99. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012 Aug;272(2):185–96.
100. Dancer MS, Di Filippo M, Marmontel O, Valéro R, Del Carmen Piombo-Rivarola M, Peretti N, et al. New rare genetic variants of LMF1 gene identified in severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2018 Jul [cited 2018 Jul 10]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933287418302939>
101. Ioka RX, Kang M-J, Kamiyama S, Kim D-H, Magoori K, Kamataki A, et al. Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28;278(9):7344–9.
102. Fong LG, Young SG, Beigneux AP, Bensadoun A, Oberer M, Jiang H, et al. GPIHBP1 and Plasma Triglyceride Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(7):455–69.
103. Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*. 2007 Apr;5(4):279–91.
104. Gin P, Yin L, Davies BSJ, Weinstein MM, Ryan RO, Bensadoun A, et al. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29554–62.
105. Beigneux AP, Davies BSJ, Tat S, Chen J, Gin P, Voss CV, et al. Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2011 Jun 3;286(22):19735–43.
106. Reimund M, Larsson M, Kovrov O, Kasvandik S, Olivecrona G, Lookene A. Evidence for Two Distinct Binding Sites for Lipoprotein Lipase on Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1). *J Biol Chem*. 2015 May 29;290(22):13919–34.

107. Sonnenburg WK, Yu D, Lee E-C, Xiong W, Gololobov G, Key B, et al. GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *J Lipid Res.* 2009 Dec;50(12):2421–9.
108. Mysling S, Kristensen KK, Larsson M, Beigneux AP, Gårdsvoll H, Fong LG, et al. The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain. *eLife.* 2016 Jan 3;5:e12095.
109. Davies BSJ, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* 2010 Jul 7;12(1):42–52.
110. Davies BSJ, Goulbourne CN, Barnes RH, Turlo KA, Gin P, Vaughan S, et al. Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. *J Lipid Res.* 2012 Dec;53(12):2690–7.
111. Goulbourne CN, Gin P, Tatar A, Nobumori C, Hoenger A, Jiang H, et al. The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell Metab.* 2014 May 6;19(5):849–60.
112. Gin P, Beigneux AP, Voss C, Davies BSJ, Beckstead JA, Ryan RO, et al. Binding preferences for GPIHBP1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein of capillary endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):176–82.
113. Weinstein MM, Yin L, Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Estrada K, et al. Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J Biol Chem.* 2008 Dec 12;283(50):34511–8.
114. Franssen R, Young SG, Peelman F, Hertecant J, Sierts JA, Schimmel AWM, et al. Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIHBP1 defects. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010 Apr;3(2):169–78.
115. Plengpanich W, Young SG, Khovidhunkit W, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, et al. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem.* 2014 Jul 11;289(28):19491–9.
116. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, et al. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1675-1679.
117. Rios JJ, Shastry S, Jasso J, Hauser N, Garg A, Bensadoun A, et al. Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. *J Inher Metab Dis.* 2012 May;35(3):531–40.
118. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, et al. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29(6):956–62.

119. Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, Makoveichuk E, Lindberg A, Hayden MR, et al. Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1535–45.
120. Coca-Prieto I, Kroupa O, Gonzalez-Santos P, Magne J, Olivecrona G, Ehrenborg E, et al. Childhood-onset chylomicronaemia with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel GPIHBP1 mutation. *J Intern Med*. 2011 Sep;270(3):224–8.
121. Berge KE, Retterstøl K, Romeo S, Pirazzi C, Leren TP. Type 1 hyperlipoproteinemia due to a novel deletion of exons 3 and 4 in the GPIHBP1 gene. *Atherosclerosis*. 2014 May;234(1):30–3.
122. Yamamoto H, Onishi M, Miyamoto N, Oki R, Ueda H, Ishigami M, et al. Novel combined GPIHBP1 mutations in a patient with hypertriglyceridemia associated with CAD. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(10):777–84.
123. Paquette M, Hegele RA, Paré G, Baass A. A novel mutation in GPIHBP1 causes familial chylomicronemia syndrome. *J Clin Lipidol*. 2018 Apr;12(2):506–10.
124. Guay SP, Gaudet D, Brisson D. The g.-469G>A polymorphism in the GPIHBP1 gene promoter is associated with hypertriglyceridemia and has an additive effect on the risk conferred by LPL defective alleles. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2013 Apr;23(4):358–65.
125. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001 Oct 5;294(5540):169–73.
126. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem*. 2005 Feb;51(2):351–9.
127. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44512–20.
128. Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, Burgess BL, Beckstead JA, Young SG, et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav^{-/-} mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2504–9.
129. Lookene A, Beckstead JA, Nilsson S, Olivecrona G, Ryan RO. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. 2005 Jul 8;280(27):25383–7.
130. Sun G, Bi N, Li G, Zhu X, Zeng W, Wu G, et al. Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids*. 2006 Sep;143(1–2):22–8.

131. Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivecrona G. Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry (Mosc)*. 2007 Mar 27;46(12):3896–904.
132. Forte TM, Ryan RO. Apolipoprotein A5: Extracellular and Intracellular Roles in Triglyceride Metabolism. *Curr Drug Targets*. 2015;16(12):1274–80.
133. Gonzales JC, Gordts PLSM, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J Clin Invest*. 2013 Jun;123(6):2742–51.
134. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):15–21.
135. Schaap FG, Rensen PCN, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RAFM, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27941–7.
136. Gao X, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Oct 19;427(2):361–5.
137. Grosskopf I, Baroukh N, Lee S-J, Kamari Y, Harats D, Rubin EM, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec;25(12):2573–9.
138. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):21553–60.
139. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 fifteen years anniversary: Lessons from genetic epidemiology. *Gene*. 2016 Oct 30;592(1):193–9.
140. Guardiola M, Ribalta J. Update on APOA5 Genetics: Toward a Better Understanding of Its Physiological Impact. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Jul;19(7):30.
141. Melegh BI, Duga B, Sümegi K, Kisfali P, Maász A, Komlósi K, et al. Mutations of the apolipoprotein A5 gene with inherited hypertriglyceridaemia: review of the current literature. *Curr Med Chem*. 2012;19(36):6163–70.
142. Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, et al. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2862–9.
143. Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. *J Intern Med*. 2008 Apr;263(4):450–8.

144. Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Oct;28(10):1866–71.
145. Charrière S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, Charcosset M, et al. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):150–6.
146. Priore Oliva C, Pisciotto L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Feb;25(2):411–7.
147. Henneman P, Schaap FG, Rensen PCN, van Dijk KW, Smelt AHM. Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. *J Intern Med*. 2008 Jan;263(1):107–8.
148. Talmud PJ. Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007 Oct;194(2):287–92.
149. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, et al. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PloS One*. 2014;9(5):e96482.
150. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*. 2002 Nov 15;11(24):3031–8.
151. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem*. 2005 Aug 5;280(31):28215–20.
152. Bertocchini L, Sentinelli F, Incani M, Bailetti D, Cimini FA, Barchetta I, et al. The Arg282Ser missense mutation in APOA5 gene determines a reduction of triglyceride and LDL-cholesterol in children, together with low serum levels of apolipoprotein A-V. *Lipids Health Dis*. 2017 Sep 19;16(1):179.
153. Sidore C, Busonero F, Maschio A, Porcu E, Naitza S, Zoledziwska M, et al. Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers. *Nat Genet*. 2015 Nov;47(11):1272–81.
154. Do R, Stitzel NO, Won H-H, Jørgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, et al. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature*. 2015 Feb 5;518(7537):102–6.
155. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar;19(3):472–84.

156. Ekman R, Nilsson-Ehle P. Effects of apolipoproteins on lipoprotein lipase activity of human adipose tissue. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1975 Aug 18;63(1):29–35.
157. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem*. 1991 Sep 25;266(27):18259–67.
158. Cyr Y, Wassef H, Bissonnette S, Lamantia V, Davignon J, Faraj M. WAT apoC-I secretion: role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in WAT in obese subjects. *J Lipid Res*. 2016;57(6):1074–85.
159. Larsson M, Vorrjö E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem*. 2013 Nov 22;288(47):33997–4008.
160. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PCN. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J Lipid Res*. 2005 Feb;46(2):297–306.
161. Westerterp M, de Haan W, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J Lipid Res*. 2006 Jun;47(6):1203–11.
162. Hubáček JA, Pitha J, Adámková V, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms. *Physiol Res*. 2003;52(2):195–200.
163. Cohn JS, Tremblay M, Boulet L, Jacques H, Davignon J, Roy M, et al. Plasma concentration and lipoprotein distribution of ApoC-I is dependent on ApoE genotype rather than the Hpa I ApoC-I promoter polymorphism. *Atherosclerosis*. 2003 Jul;169(1):63–70.
164. Dumon MF, Clerc M. Preliminary report on a case of apolipoproteins CI and CII deficiency. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1986 Jun 30;157(3):239–48.
165. Wang CS. Structure and functional properties of apolipoprotein C-II. *Prog Lipid Res*. 1991;30(2–3):253–8.
166. Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):4334–42.
167. Shachter NS, Hayek T, Leff T, Smith JD, Rosenberg DW, Walsh A, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1994 Apr;93(4):1683–90.

168. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis*. 2017 Dec;267:49–60.
169. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism*. 2012 Jul;61(7):906–21.
170. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010 Aug 5;466(7307):707–13.
171. Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest*. 1992 Nov;90(5):1889–900.
172. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science*. 1990 Aug 17;249(4970):790–3.
173. Ramms B, Gordts PLSM. Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2018 Jun;29(3):171–9.
174. Brown WV, Baginsky ML. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 Jan 31;46(2):375–82.
175. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol*. 2015 Feb;26(1):56–63.
176. Larsson M, Allan CM, Jung RS, Heizer PJ, Beigneux AP, Young SG, et al. Apolipoprotein C-III inhibits triglyceride hydrolysis by GPIHBP1-bound LPL. *J Lipid Res*. 2017 Sep;58(9):1893–902.
177. Gordts PLSM, Nock R, Son N-H, Ramms B, Lew I, Gonzales JC, et al. ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors. *J Clin Invest*. 2016 Aug 1;126(8):2855–66.
178. Breyer ED, Le NA, Li X, Martinson D, Brown WV. Apolipoprotein C-III displacement of apolipoprotein E from VLDL: effect of particle size. *J Lipid Res*. 1999 Oct;40(10):1875–82.
179. Sundaram M, Zhong S, Khalil MB, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res*. 2010 Jan;51(1):150–61.
180. Sundaram M, Curtis KR, Amir Alipour M, LeBlond ND, Margison KD, Yaworski RA, et al. The apolipoprotein C-III (Gln38Lys) variant associated with human hypertriglyceridemia is a gain-of-function mutation. *J Lipid Res*. 2017 Nov;58(11):2188–96.
181. Qin W, Sundaram M, Wang Y, Zhou H, Zhong S, Chang C-C, et al. Missense mutation in APOC3 within the C-terminal lipid binding domain of human ApoC-III results in impaired

assembly and secretion of triacylglycerol-rich very low density lipoproteins: evidence that ApoC-III plays a major role in the formation of lipid precursors within the microsomal lumen. *J Biol Chem*. 2011 Aug 5;286(31):27769–80.

182. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):32–41.

183. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitzel NO, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):22–31.

184. Pullinger CR, Malloy MJ, Shahidi AK, Ghassemzadeh M, Duchateau P, Villagomez J, et al. A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III(Gln38-->Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin. *J Lipid Res*. 1997 Sep;38(9):1833–40.

185. Song Y, Zhu L, Richa M, Li P, Yang Y, Li S. Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 Sep 5];14(1). Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-015-0027-0>

186. Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B. Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):2753–8.

187. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*. 2014 Sep;66(9):616–23.

188. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*. 1997 Nov;38(11):2173–92.

189. Sundaram M, Yao Z. Intrahepatic role of exchangeable apolipoproteins in lipoprotein assembly and secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 May;32(5):1073–8.

190. Rensen PC, van Berkel TJ. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):14791–9.

191. McConathy WJ, Wang CS. Inhibition of lipoprotein lipase by the receptor-binding domain of apolipoprotein E. *FEBS Lett*. 1989 Jul 17;251(1–2):250–2.

192. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem*. 1982 Mar 10;257(5):2518–21.

193. Steinmetz A, Jakobs C, Motzny S, Kaffarnik H. Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins. *Arterioscler Dallas Tex*. 1989 Jun;9(3):405–11.

194. Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res.* 1990 Aug;31(8):1503–11.
195. Nguyen D, Dhanasekaran P, Nickel M, Nakatani R, Saito H, Phillips MC, et al. Molecular basis for the differences in lipid and lipoprotein binding properties of human apolipoproteins E3 and E4. *Biochemistry (Mosc).* 2010 Dec 28;49(51):10881–9.
196. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990 Dec 25;265(36):22453–9.
197. Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S178-182.
198. Marais AD, Solomon G a. E, Blom DJ. Dysbetalipoproteinaemia: a mixed hyperlipidaemia of remnant lipoproteins due to mutations in apolipoprotein E. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014 Feb;51(1):46–62.
199. de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat.* 1994;4(3):178–94.
200. van den Maagdenberg AM, Weng W, de Bruijn IH, de Knijff P, Funke H, Smelt AH, et al. Characterization of five new mutants in the carboxyl-terminal domain of human apolipoprotein E: no cosegregation with severe hyperlipidemia. *Am J Hum Genet.* 1993 May;52(5):937–46.
201. Yamanouchi Y, Takano T, Hamaguchi H, Tokunaga K. A novel apolipoprotein E5 variant with a 24-bp insertion causing hyperlipidemia. *J Hum Genet.* 2001;46(11):633–9.
202. Awan Z, Choi HY, Stitzel N, Ruel I, Bamimore MA, Husa R, et al. APOE p.Leu167del mutation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2013 Dec;231(2):218–22.
203. Matsunaga A, Saito T. Apolipoprotein E mutations: a comparison between lipoprotein glomerulopathy and type III hyperlipoproteinemia. *Clin Exp Nephrol.* 2014 Apr;18(2):220–4.
204. Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):782–9.
205. Lichtenstein L, Kersten S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1801(4):415–20.
206. Chi X, Britt EC, Shows HW, Hjelm A, Shetty SK, Cushing EM, et al. ANGPTL8 promotes the ability of ANGPTL3 to bind and inhibit lipoprotein lipase. *Mol Metab.* 2017 Oct;6(10):1137–49.

207. Haller JF, Mintah IJ, Shihanian LM, Stevis P, Buckler D, Alexa-Braun CA, et al. ANGPTL8 requires ANGPTL3 to inhibit lipoprotein lipase and plasma triglyceride clearance. *J Lipid Res.* 2017 Jun;58(6):1166–73.
208. Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol.* 2016 Apr;6(4):150272.
209. Kersten S. Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Dec;13(12):731–9.
210. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17450–5.
211. Yau M-H, Wang Y, Lam KSL, Zhang J, Wu D, Xu A. A highly conserved motif within the NH2-terminal coiled-coil domain of angiopoietin-like protein 4 confers its inhibitory effects on lipoprotein lipase by disrupting the enzyme dimerization. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):11942–52.
212. Shan L, Yu X-C, Liu Z, Hu Y, Sturgis LT, Miranda ML, et al. The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 2009 Jan 16;284(3):1419–24.
213. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, et al. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Feb;27(2):366–72.
214. Wang Y, Gusarova V, Banfi S, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion. *J Lipid Res.* 2015 Jul;56(7):1296–307.
215. Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, Tai L-J, Fu W, Peralta R, et al. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med.* 2017 May 24;
216. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(3):249–56.
217. Dijk W, Heine M, Vergnes L, Boon MR, Schaart G, Hesselink MKC, et al. ANGPTL4 mediates shuttling of lipid fuel to brown adipose tissue during sustained cold exposure. *eLife.* 2015 Oct 17;4.
218. Catoire M, Alex S, Paraskevopoulos N, Mattijssen F, Evers-van Gogh I, Schaart G, et al. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11):E1043-1052.
219. Mattijssen F, Alex S, Swarts HJ, Groen AK, van Schothorst EM, Kersten S. Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion. *Mol Metab.* 2014 Apr;3(2):135–44.

220. Köster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*. 2005 Nov;146(11):4943–50.
221. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med*. 2010 Dec 2;363(23):2220–7.
222. Tarugi P, Bertolini S, Calandra S. Angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) deficiency and familial combined hypolipidemia. *J Biomed Res*. 2018 12;
223. Arca M, Minicocci I, Maranghi M. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013 Aug;24(4):313–20.
224. Robciuc MR, Maranghi M, Lahikainen A, Rader D, Bensadoun A, Öörni K, et al. Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul;33(7):1706–13.
225. Minicocci I, Tikka A, Poggiogalle E, Metso J, Montali A, Ceci F, et al. Effects of angiopoietin-like protein 3 deficiency on postprandial lipid and lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 2016;57(6):1097–107.
226. Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, Simonelli S, Adorni MP, Sallo R, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Feb 1;5(1):42–50.
227. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):70–9.
228. Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, O'Dushlaine C, Schurmann C, Gottesman O, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017 May 24;
229. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):513–6.
230. Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V, Drenos F, et al. ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Dec;28(12):2319–25.
231. Dewey FE, Gromada J, Shuldiner AR. Variants in ANGPTL4 and the Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2016 08;375(23):2305–6.
232. Variants in *ANGPTL4* and the Risk of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2303–6.

233. Gusarova V, O'Dushlaine C, Teslovich TM, Benotti PN, Mirshahi T, Gottesman O, et al. Genetic inactivation of ANGPTL4 improves glucose homeostasis and is associated with reduced risk of diabetes. *Nat Commun*. 2018 Jun 13;9(1):2252.
234. Luo M, Peng D. ANGPTL8: An Important Regulator in Metabolic Disorders. *Front Endocrinol*. 2018;9:169.
235. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 27;109(48):19751–6.
236. Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, et al. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16109–14.
237. Gusarova V, Alexa CA, Na E, Stevis PE, Xin Y, Bonner-Weir S, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):691–6.
238. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 10;424(4):786–92.
239. Hanson RL, Leti F, Tsinajinnie D, Kobes S, Puppala S, Curran JE, et al. The Arg59Trp variant in ANGPTL8 (betatrophin) is associated with total and HDL-cholesterol in American Indians and Mexican Americans and differentially affects cleavage of ANGPTL3. *Mol Genet Metab*. 2016;118(2):128–37.
240. Peloso GM, Auer PL, Bis JC, Voorman A, Morrison AC, Stitzel NO, et al. Association of Low-Frequency and Rare Coding-Sequence Variants with Blood Lipids and Coronary Heart Disease in 56,000 Whites and Blacks. *Am J Hum Genet*. 2014 Feb;94(2):223–32.
241. Lee A-H. The role of CREB-H transcription factor in triglyceride metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Apr;23(2):141–6.
242. Nakagawa Y, Shimano H. CREBH Regulates Systemic Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2018 May 8;19(5).
243. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med*. 2011 Jun 12;17(7):812–5.
244. Bergman EN, Havel RJ, Wolfe BM, Bohmer T. Quantitative studies of the metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. *J Clin Invest*. 1971 Sep;50(9):1831–9.
245. Doolittle MH, Péterfy M. Mechanisms of lipase maturation. *Clin Lipidol*. 2010 Feb 1;5(1):71–85.
246. Cupp M, Bensadoun A, Melford K. Heparin decreases the degradation rate of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem*. 1987 May 5;262(13):6383–8.

247. Cisar LA, Hoogewerf AJ, Cupp M, Rapport CA, Bensadoun A. Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *J Biol Chem.* 1989 Jan 25;264(3):1767–74.
248. Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis.* 2010 Jul;211(1):1–8.
249. Williams KJ. Some things just have to be done in vivo: GPIHBP1, caloric delivery, and the generation of remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29(6):792–5.
250. Olivecrona G. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(3):233–41.
251. Hultin M, Savonen R, Chevreuril O, Olivecrona T. Chylomicron metabolism in rats: kinetic modeling indicates that the particles remain at endothelial sites for minutes. *J Lipid Res.* 2013 Oct;54(10):2595–605.
252. Enerbäck S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Aug 11;1169(2):107–25.
253. Connelly PW, Maguire GF, Vezina C, Hegele RA, Kuksis A. Kinetics of lipolysis of very low density lipoproteins by lipoprotein lipase. Importance of particle number and noncompetitive inhibition by particles with low triglyceride content. *J Biol Chem.* 1994 Aug 12;269(32):20554–60.
254. Levy E, Deckelbaum RJ, Thibault RL, Seidman E, Olivecrona T, Roy CC. In vitro remodelling of plasma lipoproteins in whole plasma by lipoprotein lipase in primary and secondary hypertriglyceridaemia. *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):422–31.
255. Murdoch SJ, Breckenridge WC. Influence of lipoprotein lipase and hepatic lipase on the transformation of VLDL and HDL during lipolysis of VLDL. *Atherosclerosis.* 1995 Dec;118(2):193–212.
256. Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res.* 1985 Jul;26(7):842–51.
257. Zheng C, Khoo C, Ikewaki K, Sacks FM. Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of LDL subfractions. *J Lipid Res.* 2007 May;48(5):1190–203.
258. Fielding PE, Ishikawa Y, Fielding CJ. Apolipoprotein E mediates binding of normal very low density lipoprotein to heparin but is not required for high affinity receptor binding. *J Biol Chem.* 1989 Jul 25;264(21):12462–6.

259. Huff MW, Breckenridge WC, Strong WL, Wolfe BM. Metabolism of apolipoproteins C-II, C-III, and B in hypertriglyceridemic men. Changes after heparin-induced lipolysis. *Arterioscler Dallas Tex.* 1988 Oct;8(5):471–9.
260. Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Butbul E, Sharon I, Olivecrona T. Reversible modification of human plasma low density lipoproteins toward triglyceride-rich precursors. A mechanism for losing excess cholesterol esters. *J Biol Chem.* 1982 Jun 10;257(11):6509–17.
261. Marzetta CA, Foster DM, Brunzell JD. Conversion of plasma VLDL and IDL precursors into various LDL subpopulations using density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1990 Jun;31(6):975–84.
262. Zanon P, Velagapudi S, Yalcinkaya M, Rohrer L, von Eckardstein A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2018 Jun 23;275:273–95.
263. Williams KJ, Chen K. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Jun;21(3):218–28.
264. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999 Jan;40(1):1–16.
265. Gordts PLSM, Esko JD. The heparan sulfate proteoglycan grip on hyperlipidemia and atherosclerosis. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2018 May 24;
266. Heeren J, Weber W, Beisiegel U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci.* 1999 Feb;112 (Pt 3):349–59.
267. Swift LL, Farkas MH, Major AS, Valyi-Nagy K, Linton MF, Fazio S. A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22965–70.
268. Zambon A, Deeb SS, Bensadoun A, Foster KE, Brunzell JD. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J Lipid Res.* 2000 Dec;41(12):2094–9.
269. Kobayashi J, Miyashita K, Nakajima K, Mabuchi H. Hepatic Lipase: a Comprehensive View of its Role on Plasma Lipid and Lipoprotein Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2015;22(10):1001–11.
270. Forte TM, Shu X, Ryan RO. The ins (cell) and outs (plasma) of apolipoprotein A-V. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S150-155.
271. Bradley WA, Hwang SL, Karlin JB, Lin AH, Prasad SC, Gotto AM, et al. Low-density lipoprotein receptor binding determinants switch from apolipoprotein E to apolipoprotein B during conversion of hypertriglyceridemic very-low-density lipoprotein to low-density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1984 Dec 10;259(23):14728–35.

272. Stanford KI, Bishop JR, Foley EM, Gonzales JC, Niesman IR, Witztum JL, et al. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest*. 2009 Nov;119(11):3236–45.
273. Fuki IV, Kuhn KM, Lomazov IR, Rothman VL, Tuszynski GP, Iozzo RV, et al. The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J Clin Invest*. 1997 Sep 15;100(6):1611–22.
274. Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J*. 2000 Nov 1;351 Pt 3:607–12.
275. MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, Wang L, Bensadoun A, Witztum JL, et al. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):153–64.
276. Stanford KI, Wang L, Castagnola J, Song D, Bishop JR, Brown JR, et al. Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase is required for triglyceride-rich lipoprotein clearance. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):286–94.
277. Mooij HL, Bernelot Moens SJ, Gordts PLSM, Stanford KI, Foley EM, van den Boogert MAW, et al. Ext1 heterozygosity causes a modest effect on postprandial lipid clearance in humans. *J Lipid Res*. 2015 Mar;56(3):665–73.
278. Hassing HC, Mooij H, Guo S, Monia BP, Chen K, Kulik W, et al. Inhibition of hepatic sulfatase-2 in vivo: a novel strategy to correct diabetic dyslipidemia. *Hepatol Baltim Md*. 2012 Jun;55(6):1746–53.
279. Deng Y, Foley EM, Gonzales JC, Gordts PL, Li Y, Esko JD. Shedding of syndecan-1 from human hepatocytes alters very low density lipoprotein clearance. *Hepatol Baltim Md*. 2012 Jan;55(1):277–86.
280. Chen K, Williams KJ. Molecular mediators for raft-dependent endocytosis of syndecan-1, a highly conserved, multifunctional receptor. *J Biol Chem*. 2013 May 17;288(20):13988–99.
281. Gordts PLSM, Nock R, Son N-H, Ramms B, Lew I, Gonzales JC, et al. ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors. *J Clin Invest*. 2016 01;126(8):2855–66.
282. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J i, Shimada M, Ohashi K, et al. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem*. 1996 Sep 13;271(37):22422–7.
283. Mortimer BC, Beveridge DJ, Martins IJ, Redgrave TG. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient

mice and apoE-deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1995 Dec 1;270(48):28767–76.

284. Herz J, Qiu SQ, Oesterle A, DeSilva HV, Shafi S, Havel RJ. Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4611–5.

285. Windler E, Greeve J, Robenek H, Rinninger F, Greten H, Jäckle S. Differences in the mechanisms of uptake and endocytosis of small and large chylomicron remnants by rat liver. *Hepatology*. 1996 Aug;24(2):344–51.

286. Linton MF, Tao H, Linton EF, Yancey PG. SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(6):461–72.

287. Out R, Kruijt JK, Rensen PCN, Hildebrand RB, de Vos P, Van Eck M, et al. Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):18401–6.

288. Van Eck M, Hoekstra M, Out R, Bos IST, Kruijt JK, Hildebrand RB, et al. Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo. *J Lipid Res*. 2008 Jan;49(1):136–46.

289. Webb NR, de Beer MC, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. ApoB-containing lipoproteins in apoE-deficient mice are not metabolized by the class B scavenger receptor BI. *J Lipid Res*. 2004 Feb;45(2):272–80.

290. Au DT, Strickland DK, Muratoglu SC. The LDL Receptor-Related Protein 1: At the Crossroads of Lipoprotein Metabolism and Insulin Signaling. *J Diabetes Res*. 2017;2017:8356537.

291. Actis Dato V, Chiabrando GA. The Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 15;19(6).

292. Hussain MM, Maxfield FR, Más-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, et al. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem*. 1991 Jul 25;266(21):13936–40.

293. Laatsch A, Merkel M, Talmud PJ, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*. 2009 May;204(1):105–11.

294. Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):689–95.

295. Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Oct;24(10):1750–4.

296. Karakas SE, Khilnani S, Divens C, Almario R, Jen KL. Changes in plasma lipoproteins during lipolysis in vivo in the hypertriglyceridemic state. *Am J Clin Nutr.* 1994 Feb;59(2):378–83.
297. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2014 Dec;52(12):1695–727.
298. Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D, Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 1999 Sep;40(9):1655–63.
299. Moulin P, Dufour R, Averna M, Arca M, Cefalù AB, Noto D, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): Expert panel recommendations and proposal of an “FCS score.” *Atherosclerosis.* 2018 Jun 18;275:265–72.
300. Strokes E, Moulin P, Parhofer KG, Rebours V, Löhr J-M, Averna M. Diagnostic algorithm for familial chylomicronemia syndrome. *Atheroscler Suppl.* 2017 Jan;23:1–7.
301. Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, Wang J, Digenio A, Alexander VJ, et al. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol.* 2018 Apr 4;
302. Désaméricq G, Van Ganse E, Schwalm M-S, Bourke A, Moulin P. Severe hypertriglyceridaemia in patients treated with lipid-modifying agents. *Diabetes Metab.* 2012 Jun;38(3):277–9.
303. Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York, USA: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle. McGraw-Hill. New York; 2000. p. 1913–1932.
304. Rabacchi C, Pisciotta L, Cefalù AB, Noto D, Fresa R, Tarugi P, et al. Spectrum of mutations of the LPL gene identified in Italy in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2015 Jul;241(1):79–86.
305. Brown WV, Gaudet D, Goldberg I, Hegele R. Roundtable on etiology of familial chylomicronemia syndrome. *J Clin Lipidol.* 2018 Feb;12(1):5–11.
306. Chait A, Subramanian S, Brunzell JD. Genetic Disorders of Triglyceride Metabolism. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2017 Apr 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326743/>
307. Brunzell JD, Schrott HG. The interaction of familial and secondary causes of hypertriglyceridemia: role in pancreatitis. *J Clin Lipidol.* 2012 Oct;6(5):409–12.
308. Johansen CT, Hegele RA. Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):833–42.

309. De Castro-Orós I, Cenarro A, Tejedor MT, Baila-Rueda L, Mateo-Gallego R, Lamiquiz-Moneo I, et al. Common genetic variants contribute to primary hypertriglyceridemia without differences between familial combined hyperlipidemia and isolated hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Dec;7(6):814–21.
310. Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, et al. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Sep;97(9):2969–89.
311. Brunzell JD, Miller NE, Alaupovic P, St Hilaire RJ, Wang CS, Sarson DL, et al. Familial chylomicronemia due to a circulating inhibitor of lipoprotein lipase activity. *J Lipid Res*. 1983 Jan;24(1):12–9.
312. Ashraf AP, Beukelman T, Pruneta-Deloché V, Kelly DR, Garg A. Type 1 hyperlipoproteinemia and recurrent acute pancreatitis due to lipoprotein lipase antibody in a young girl with Sjogren's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):3302–7.
313. Rodrigues CEM, Bonfá E, Carvalho JF. Review on anti-lipoprotein lipase antibodies. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11;411(21–22):1603–5.
314. Moret M, Pruneta-Deloché V, Sassolas A, Marcais C, Moulin P. Prevalence and function of anti-lipoprotein lipase auto-antibodies in type V hyperchylomicronemia. *Atherosclerosis*. 2010 Feb;208(2):324–7.
315. Béliard S, Di Filippo M, Kaplanski G, Valéro R. Highly efficacious, long-term, triglyceride lowering with rituximab therapy in a patient with autoimmune hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol*. 2018 Aug;12(4):883–7.
316. Yamamoto H, Tanaka M, Yoshiga S, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S. Autoimmune severe hypertriglyceridemia induced by anti-apolipoprotein C-II antibody. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):1525–30.
317. Beigneux AP, Miyashita K, Ploug M, Blom DJ, Ai M, Linton MF, et al. Autoantibodies against GPIHBP1 as a Cause of Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2017 27;376(17):1647–58.
318. Hu X, Dallinga-Thie GM, Hovingh GK, Chang SY, Sandoval NP, Dang TLP, et al. GPIHBP1 autoantibodies in a patient with unexplained chylomicronemia. *J Clin Lipidol*. 2017 Aug;11(4):964–71.
319. Martín-Campos JM, Julve J, Roig R, Martínez S, Errico TL, Martínez-Couselo S, et al. Molecular analysis of chylomicronemia in a clinical laboratory setting: diagnosis of 13 cases of lipoprotein lipase deficiency. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2014 Feb 15;429:61–8.
320. Ariza MJ, Rioja J, Ibarretxe D, Camacho A, Díaz-Díaz JL, Mangas A, et al. Molecular Basis of the Familial Chylomicronemia Syndrome in Patients from the National Dyslipidemia Registry of the Spanish Atherosclerosis Society. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2018 Aug [cited 2018 Aug 15]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933287418303532>

321. Dron JS, Wang J, Menard JR, Cao H, McIntyre AD, Hegele RA. Genetics of Hypertriglyceridemia: an Assortment of Polygenic Effects. *Atheroscler Suppl*. 2018 Jun;32:27.
322. Lewis GF, Xiao C, Hegele RA. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rev*. 2015 Feb;36(1):131–47.
323. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Nov;27(11):2450–5.
324. Lamiquiz-Moneo I, Blanco-Torrecilla C, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, et al. Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain. *Lipids Health Dis*. 2016;15:82.
325. Basu D, Manjur J, Jin W. Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay. *J Lipid Res*. 2011 Apr;52(4):826–32.
326. Enerbäck S, Ohlsson BG, Samuelsson L, Bjursell G. Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 1992 Oct;12(10):4622–33.
327. Boberg J, Carlson LA. DETERMINATION OF HEPARIN-INDUCED LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY IN HUMAN PLASMA. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1964 Nov;10:420–7.
328. Eckel RH, Goldberg IJ, Steiner L, Yost TJ, Paterniti JR. Plasma lipolytic activity. Relationship to postheparin lipolytic activity and evidence for metabolic regulation. *Diabetes*. 1988 May;37(5):610–5.
329. Brunzell JD, Chait A, Nikkilä EA, Ehnholm C, Huttunen JK, Steiner G. Heterogeneity of primary lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism*. 1980 Jul;29(7):624–9.
330. Glaser DS, Yost TJ, Eckel RH. Preheparin lipoprotein lipolytic activities: relationship to plasma lipoproteins and postheparin lipolytic activities. *J Lipid Res*. 1992 Feb;33(2):209–14.
331. Pruneta V, Autran D, Ponsin G, Marcais C, Duvillard L, Verges B, et al. Ex vivo measurement of lipoprotein lipase-dependent very low density lipoprotein (VLDL)-triglyceride hydrolysis in human VLDL: an alternative to the postheparin assay of lipoprotein lipase activity? *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Feb;86(2):797–803.
332. Biale Y, Shafrir E. Lipolytic activity toward tri- and monoglycerides in postheparin plasma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1969 Mar;23(3):413–9.
333. Nilsson-Ehle P, Tornqvist H, Belfrage P. Rapid determination of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *Clin Chim Acta*. 1972 Dec;42(2):383–90.
334. Henderson AD, Richmond W, Elkeles RS. Hepatic and lipoprotein lipases selectively assayed in postheparin plasma. *Clin Chem*. 1993 Feb;39(2):218–23.

335. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann Clin Biochem.* 2001 Jul;38(Pt 4):365–70.
336. Wicher I, Sattler W, Ibovnik A, Kostner GM, Zechner R, Malle E. Quantification of lipoprotein lipase (LPL) by dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. Comparison of immunoreactivity of LPL mass and enzyme activity of LPL. *J Immunol Methods.* 1996 Jun 10;192(1-2):1–11.
337. Hendrickson HS. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. *Anal Biochem.* 1994 May 15;219(1):1–8.
338. Goldberg IJ, Kandel JJ, Blum CB, Ginsberg HN. Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1523–8.
339. Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brunzell JD. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1996 Nov;37(11):2394–404.
340. Carrero P, Gómez-Coronado D, Olivecrona G, Lasunción MA. Binding of lipoprotein lipase to apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jan 19;1299(2):198–206.
341. Pruneta-Deloche V, Sassolas A, Dallinga-Thie GM, Berthezène F, Ponsin G, Moulin P. Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes. *J Lipid Res.* 2004 May;45(5):859–65.
342. Goers JW, Pedersen ME, Kern PA, Ong J, Schotz MC. An enzyme-linked immunoassay for lipoprotein lipase. *Anal Biochem.* 1987 Oct;166(1):27–35.
343. Goldberg IJ, Paterniti JR, France DS, Martinelli G, Cornicelli JA. Production and use of an inhibitory monoclonal antibody to human lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Sep 12;878(2):168–76.
344. Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arterioscler Dallas Tex.* 1989 Jun;9(3):326–34.
345. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, et al. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res.* 1990 Oct;31(10):1911–24.
346. Kawamura M, Gotoda T, Mori N, Shimano H, Kozaki K, Harada K, et al. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for lipoprotein lipase with newly developed antibodies. *J Lipid Res.* 1994 Sep;35(9):1688–97.

347. Kimura H, Ohkaru Y, Katoh K, Ishii H, Sunahara N, Takagi A, et al. Development and evaluation of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of lipoprotein lipase mass in human plasma. *Clin Biochem.* 1999 Feb;32(1):15–23.
348. Auwerx JH, Babirak SP, Fujimoto WY, Iverius PH, Brunzell JD. Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency. *Eur J Clin Invest.* 1989 Oct;19(5):433–7.
349. Kern PA, Martin RA, Carty J, Goldberg IJ, Ong JM. Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1990 Jan;31(1):17–26.
350. Pruneta-Deloche V, Marçais C, Perrot L, Sassolas A, Delay M, Estour B, et al. Combination of circulating antilipoprotein lipase (Anti-LPL) antibody and heterozygous S172 fsX179 mutation of LPL gene leading to chronic hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jul;90(7):3995–8.
351. Tilly P, Sass C, Vincent-Viry M, Aguilhon D, Siest G, Visvikis S. Biological and genetic determinants of serum apoC-III concentration: reference limits from the Stanislas Cohort. *J Lipid Res.* 2003 Feb;44(2):430–6.
352. Nicolay A, Lombard E, Arlotto E, Saunier V, Lorec-Penet A-M, Lairon D, et al. Evaluation of new apolipoprotein C-II and apolipoprotein C-III automatized immunoturbidimetric kits. *Clin Biochem.* 2006 Sep;39(9):935–41.
353. Carlson LA, Ballantyne D. Changing relative proportions of apolipoproteins CII and CIII of very low density lipoproteins in hypertriglyceridaemia. *Atherosclerosis.* 1976 May;23(3):563–8.
354. Le NA, Gibson JC, Ginsberg HN. Independent regulation of plasma apolipoprotein C-II and C-III concentrations in very low density and high density lipoproteins: implications for the regulation of the catabolism of these lipoproteins. *J Lipid Res.* 1988 May;29(5):669–77.
355. Yin F, Doolittle MH, Péterfy M. A quantitative assay measuring the function of lipase maturation factor 1. *J Lipid Res.* 2009 Nov;50(11):2265–9.
356. Miyashita K, Fukamachi I, Nagao M, Ishida T, Kobayashi J, Machida T, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring GPIHBP1 levels in human plasma or serum. *J Clin Lipidol.* 2018 Feb;12(1):203–210.e1.
357. Mehta N, Qamar A, Qu L, Qasim AN, Mehta NN, Reilly MP, et al. Differential association of plasma angiopoietin-like proteins 3 and 4 with lipid and metabolic traits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 May;34(5):1057–63.
358. Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J Lipid Res.* 2005 Sep;46(9):2015–22.
359. Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol.* 2018 Jul 4;

360. Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, Hegele RA, Santos RD, Wierzbicki AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Dec 7;3:17093.
361. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, Sijbrands EJ, Scheerder RL, Kastelein JJ. Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Lancet Lond Engl*. 2001 Jan 20;357(9251):165–8.
362. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ*. 1991 Oct 12;303(6807):893–6.
363. Farnier M, Bruckert E, Boileau C, Krempf M, Nouvelle société française d'athérosclérose. [Diagnostic and treatment of familial hypercholesterolemia (FH) in adult: guidelines from the New French Society of Atherosclerosis (NSFA)]. *Presse Med*. 2013 Jun;42(6 Pt 1):930–50.
364. Nordestgaard BG, Benn M. Genetic testing for familial hypercholesterolaemia is essential in individuals with high LDL cholesterol: who does it in the world? *Eur Heart J*. 2017 May 21;38(20):1580–3.
365. Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Nov;97(11):3956–64.
366. Watts GF, Shaw JE, Pang J, Magliano DJ, Jennings GLR, Carrington MJ. Prevalence and treatment of familial hypercholesterolaemia in Australian communities. *Int J Cardiol*. 2015 Apr 15;185:69–71.
367. Shi Z, Yuan B, Zhao D, Taylor AW, Lin J, Watts GF. Familial hypercholesterolemia in China: prevalence and evidence of underdetection and undertreatment in a community population. *Int J Cardiol*. 2014 Jul 1;174(3):834–6.
368. Leigh S, Futema M, Whittall R, Taylor-Beadling A, Williams M, den Dunnen JT, et al. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet*. 2017 Apr;54(4):217–23.
369. Wang J, Dron JS, Ban MR, Robinson JF, McIntyre AD, Alazzam M, et al. Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Dec;36(12):2439–45.
370. Marduel M, Carrié A, Sassolas A, Devillers M, Carreau V, Di Filippo M, et al. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Hum Mutat*. 2010 Nov;31(11):E1811-1824.
371. Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003 Jun;34(2):154–6.
372. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, Bonnefont-Rousselot D, Marques-Pinheiro A, Erik Berge K, et al. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum Mutat*. 2013 Jan;34(1):83–7.

373. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JCM, Zelcer N, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2014 Aug 29;115(6):552–5.
374. Fellin R, Arca M, Zuliani G, Calandra S, Bertolini S. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene*. 2015 Jan 15;555(1):23–32.
375. Rios J, Stein E, Shendure J, Hobbs HH, Cohen JC. Identification by whole-genome resequencing of gene defect responsible for severe hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet*. 2010 Nov 15;19(22):4313–8.
376. Stitzel NO, Fouchier SW, Sjouke B, Peloso GM, Moscoso AM, Auer PL, et al. Exome sequencing and directed clinical phenotyping diagnose cholesterol ester storage disease presenting as autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Dec;33(12):2909–14.
377. Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, Cefalù AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):e19–27.
378. Whitfield AJ, Barrett PHR, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem*. 2004 Oct;50(10):1725–32.
379. Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42(5–6):515–45.
380. Tarugi P, Aversa M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem*. 2011;54:81–107.
381. Elias N, Patterson BW, Schonfeld G. Decreased production rates of VLDL triglycerides and ApoB-100 in subjects heterozygous for familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Nov;19(11):2714–21.
382. Hooper AJ, Burnett JR. Update on Primary Hypobetalipoproteinemia. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2014 Jul [cited 2018 Oct 17];16(7). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11883-014-0423-3>
383. Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel M-C, et al. Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jan;21(1):104–8.
384. Schonfeld G, Patterson BW, Yablonskiy DA, Tanoli TSK, Aversa M, Elias N, et al. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res*. 2003 Mar;44(3):470–8.
385. Di Filippo M, Moulin P, Roy P, Samson-Bouma ME, Collardeau-Frachon S, Chebel-Dumont S, et al. Homozygous MTTP and APOB mutations may lead to hepatic steatosis and fibrosis

- despite metabolic differences in congenital hypocholesterolemia. *J Hepatol.* 2014 Oct;61(4):891–902.
386. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, Stitzel N, Kathiresan S, Arroyo JA, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res.* 2013 Dec;54(12):3481–90.
387. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005 Feb;37(2):161–5.
388. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006 Mar 23;354(12):1264–72.
389. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):514–23.
390. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463–7.
391. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun 12;321(6071):674–9.
392. Okubo M, Horinishi A, Saito M, Ebara T, Endo Y, Kaku K, et al. A novel complex deletion-insertion mutation mediated by Alu repetitive elements leads to lipoprotein lipase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2007 Nov;92(3):229–33.
393. Holcomb CL, Höglund B, Anderson MW, Blake LA, Böhme I, Egholm M, et al. A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens.* 2011 Mar;77(3):206–17.
394. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
395. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Oct;1842(10):1932–41.
396. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet TIG.* 2014 Sep;30(9):418–26.
397. Nakano M, Komatsu J, Matsuura S, Takashima K, Katsura S, Mizuno A. Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion. *J Biotechnol.* 2003 Apr 24;102(2):117–24.
398. Merriman B, Ion Torrent R&D Team, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis.* 2012 Dec;33(23):3397–417.
399. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):53–9.

400. Guo J, Xu N, Li Z, Zhang S, Wu J, Kim DH, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 8;105(27):9145–50.
401. Vetro A, Godin D, Lesende I, Limongelli I, Ranzani GN, Novara F, et al. Diagnostic application of a capture based NGS test for the concurrent detection of variants in sequence and copy number as well as LOH. *Clin Genet*. 2017 May 30;
402. Ellingford JM, Campbell C, Barton S, Bhaskar S, Gupta S, Taylor RL, et al. Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2017 Jun;25(6):719–24.
403. Iacocca MA, Wang J, Dron JS, Robinson JF, McIntyre AD, Cao H, et al. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 2017 Sep 5;
404. Dron JS, Wang J, Cao H, Hegele RA. Copy-number variation (CNVs) in Hypertriglyceridemia Patients. *Atheroscler Suppl*. 2018 Jun;32:50.
405. Albers K, Schlein C, Wenner K, Lohse P, Bartelt A, Heeren J, et al. Homozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide results in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia in a breast-fed infant. *Atherosclerosis*. 2014 Mar;233(1):97–103.
406. Okubo M, Ishihara M, Iwasaki T, Ebara T, Aoyama Y, Murase T, et al. A novel APOA5 splicing mutation IVS2+1g>a in a Japanese chylomicronemia patient. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):24–5.
407. Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res*. 1996 Dec;37(12):2627–37.
408. Watanabe H, Miyashita Y, Murano T, Hiroh Y, Itoh Y, Shirai K. Preheparin serum lipoprotein lipase mass level: the effects of age, gender, and types of hyperlipidemias. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):45–50.
409. Coca-Prieto I, Valdivielso P, Olivecrona G, Ariza MJ, Rioja J, Font-Ugalde P, et al. Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2009;9:46.
410. Kobayashi J, Maruyama T, Watanabe H, Kudoh A, Tateishi S, Sasaki T, et al. Gender differences in the effect of type 2 diabetes on serum lipids, pre-heparin plasma lipoprotein lipase mass and other metabolic parameters in Japanese population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003 Oct;62(1):39–45.

411. Kobayashi J, Nohara A, Kawashiri M, Inazu A, Koizumi J, Nakajima K, et al. Serum lipoprotein lipase mass: clinical significance of its measurement. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2007 Mar;378(1-2):7-12.
412. Miyashita Y, Shirai K, Itoh Y, Sasaki H, Totsuka M, Murano T, et al. Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002 Jun;56(3):181-7.
413. Saiki A, Oyama T, Endo K, Ebisuno M, Ohira M, Koide N, et al. Preheparin serum lipoprotein lipase mass might be a biomarker of metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Apr;76(1):93-101.
414. Hirano T, Nishioka F, Murakami T. Measurement of the serum lipoprotein lipase concentration is useful for studying triglyceride metabolism: Comparison with postheparin plasma. *Metabolism*. 2004 Apr;53(4):526-31.
415. Kobayashi J, Hashimoto H, Fukamachi I, Tashiro J, Shirai K, Saito Y, et al. Lipoprotein lipase mass and activity in severe hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta*. 1993 Jul 16;216(1-2):113-23.
416. Brunzell JD, Porte D, Bierman EL. Reversible abnormalities in postheparin lipolytic activity during the late phase of release in diabetes mellitus (postheparin lipolytic activity in diabetes). *Metabolism*. 1975 Oct;24(10):1123-37.
417. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Mar;25(3):146-55.
418. Näsström B, Olivecrona G, Olivecrona T, Stegmayr BG. Lipoprotein lipase during continuous heparin infusion: tissue stores become partially depleted. *J Lab Clin Med*. 2001 Sep;138(3):206-13.
419. Huttunen JK, Ehnholm C, Kinnunen PK, Nikkilä EA. An immunochemical method for the selective measurement of two triglyceride lipases in human postheparin plasma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1975 Sep 16;63(3):335-47.
420. Nilsson-Ehle P, Eckman R. Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery*. 1977;3:194-209.
421. Greten H, DeGrella R, Klose G, Rascher W, de Gennes JL, Gjone E. Measurement of two plasma triglyceride lipases by an immunochemical method: studies in patients with hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. 1976 May;17(3):203-10.
422. Reardon MF, Sakai H, Steiner G. Roles of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in the catabolism in vivo of triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Dallas Tex*. 1982 Oct;2(5):396-402.
423. St-Amand J, Moorjanit S, Lupien PJ, Prud'homme D, Després JP. The relation of plasma triglyceride, apolipoprotein B, and high-density lipoprotein cholesterol to postheparin

lipoprotein lipase activity is dependent on apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism*. 1996 Feb;45(2):261–7.

424. Fisher RM, Coppack SW, Humphreys SM, Gibbons GF, Frayn KN. Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1995 Apr 30;236(1):7–17.

425. van Barlingen HH, Kock LA, de Man FH, Erkelens DW, de Bruin TW. In vitro lipolysis of human VLDL: effect of different VLDL compositions in normolipidemia, familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 1996 Mar;121(1):75–84.

426. Li H, Dhanasekaran P, Alexander ET, Rader DJ, Phillips MC, Lund-Katz S. Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Apr;33(4):687–93.

427. Farhan SMK, Wang J, Robinson JF, Prasad AN, Rupa CA, Siu VM, et al. Old gene, new phenotype: mutations in heparan sulfate synthesis enzyme, EXT2 leads to seizure and developmental disorder, no exostoses. *J Med Genet*. 2015 Oct;52(10):666–75.

428. Wuyts W, Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Hum Mutat*. 2000;15(3):220–7.

429. Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ. Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2254–8.

430. Chevreuil O, Hultin M, Ostergaard P, Olivecrona T. Depletion of lipoprotein lipase after heparin administration. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. 1993 Oct;13(10):1391–6.

431. Chevreuil O, Hultin M, Østergaard P, Olivecrona T. Heparin-decasaccharides impair the catabolism of chylomicrons. *Biochem J*. 1996 Dec 1;320(2):437–44.

432. Persson E, Nordenström J, Vinnars E. Plasma clearance of fat emulsion during continuous heparin infusion. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1987 Apr;31(3):189–92.

433. Tikka A, Metso J, Jauhiainen M. ANGPTL3 serum concentration and rare genetic variants in Finnish population. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017 Nov 17;77(8):601–9.

434. Evans D, Beil FU, Aberle J. Resequencing the untranslated regions of the lipoprotein lipase (LPL) gene reveals that variants in microRNA target sequences are associated with triglyceride levels. *J Clin Lipidol*. 2013 Dec;7(6):610–4.

435. Goodarzi MO, Wong H, Quiñones MJ, Taylor KD, Guo X, Castellani LW, et al. The 3' untranslated region of the lipoprotein lipase gene: haplotype structure and association with post-heparin plasma lipase activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4816–23.

436. Chajek-Shaul T, Bengtsson-Olivecrona G, Peterson J, Olivecrona T. Metabolic fate of rat heart endothelial lipoprotein lipase. *Am J Physiol*. 1988 Sep;255(3 Pt 1):E247–254.

437. Bagby GJ. Heparin-independent release of lipoprotein lipase activity from perfused rat hearts. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Aug 29;753(1):47–52.
438. Chajek-Shaul T, Friedman G, Ziv E, Bar-On H, Bengtsson-Olivecrona G. Fate of lipoprotein lipase taken up by the rat liver. Evidence for a conformational change with loss of catalytic activity. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Nov 25;963(2):183–91.
439. Vilaró S, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *Am J Physiol*. 1988 May;254(5 Pt 1):G711–722.
440. Neuger L, Vilaró S, Lopez-Iglesias C, Gupta J, Olivecrona T, Olivecrona G. Effects of heparin on the uptake of lipoprotein lipase in rat liver. *BMC Physiol*. 2004 Nov 15;4(1):13.
441. Bertolini S, Pisciotta L, Fasano T, Rabacchi C, Calandra S. The study of familial hypercholesterolemia in Italy: A narrative review. *Atheroscler Suppl*. 2017 Oct;29:1–10.
442. Jannes CE, Santos RD, de Souza Silva PR, Turolla L, Gagliardi ACM, Marsiglia JDC, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*. 2015 Jan;238(1):101–7.
443. Taylor A, Martin B, Wang D, Patel K, Humphries SE, Norbury G. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis to screen for deletions and duplications of the LDLR gene in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Genet*. 2009 Jul;76(1):69–75.
444. Hooper AJ, Nguyen LT, Burnett JR, Bates TR, Bell DA, Redgrave TG, et al. Genetic analysis of familial hypercholesterolaemia in Western Australia. *Atherosclerosis*. 2012 Oct;224(2):430–4.
445. Iacocca MA, Hegele RA. Role of DNA copy number variation in dyslipidemias: *Curr Opin Lipidol*. 2018 Apr;29(2):125–32.
446. Patni N, Brothers J, Xing C, Garg A. Type 1 hyperlipoproteinemia in a child with large homozygous deletion encompassing GPIHBP1. *J Clin Lipidol*. 2016 Jul;10(4):1035–1039.e2.
447. Kerkhof J, Schenkel LC, Reilly J, McRobbie S, Aref-Eshghi E, Stuart A, et al. Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels. *J Mol Diagn*. 2017 Nov;19(6):905–20.
448. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics*. 1988 Nov;3(4):373–9.
449. Smeets HJ, Poddighe J, Stuyt PM, Stalenhoef AF, Ropers HH, Wieringa B. Identification of apolipoprotein E polymorphism by using synthetic oligonucleotides. *J Lipid Res*. 1988 Sep;29(9):1231–7.
450. Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Jun;25(3):161–8.
451. Shapiro MD. Rare Genetic Disorders Altering Lipoproteins. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South

Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2018 Aug 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326744/>

452. Blom DJ. Screening for Dysbetalipoproteinemia by Plasma Cholesterol and Apolipoprotein B Concentrations. *Clin Chem*. 2005 May 1;51(5):904–7.

453. Murase T, Okubo M, Takeuchi I. Non-HDL-cholesterol/apolipoprotein B ratio: a useful distinguishing feature in the screening for type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol*. 2010 Apr;4(2):99–104.

454. Sniderman A, Tremblay A, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Diagnosis of type III hyperlipoproteinemia from plasma total cholesterol, triglyceride, and apolipoprotein B. *J Clin Lipidol*. 2007 Aug;1(4):256–63.

455. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Sep 29;5:24.

456. Chanavat V, Janin A, Millat G. A fast and cost-effective molecular diagnostic tool for genetic diseases involved in sudden cardiac death. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2016 Jan 30;453:80–5.

457. Ramond F, Janin A, Di Filippo S, Chanavat V, Chalabreysse L, Roux-Buisson N, et al. Homozygous PKP2 deletion associated with neonatal left ventricle noncompaction. *Clin Genet*. 2017 Jan;91(1):126–30.

458. Rabès J-P, Béliard S, Carrié A. Familial hypercholesterolemia: experience from France. *Curr Opin Lipidol*. 2018 Apr;29(2):65–71.

459. Fouchier SW, Sankatsing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Alonso R, et al. High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinaemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J Med Genet*. 2005 Apr;42(4):e23.

460. Reddy MVPL, Iatan I, Weissglas-Volkov D, Nikkola E, Haas BE, Juvonen M, et al. Exome sequencing identifies 2 rare variants for low high-density lipoprotein cholesterol in an extended family. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Oct 1;5(5):538–46.

461. Cefalù AB, Pirruccello JP, Noto D, Gabriel S, Valenti V, Gupta N, et al. A novel APOB mutation identified by exome sequencing cosegregates with steatosis, liver cancer, and hypocholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Aug;33(8):2021–5.

462. Elbitar S, Susan-Resiga D, Ghaleb Y, El Khoury P, Peloso G, Stitzel N, et al. New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Sci Rep*. 2018 Jan 31;8(1):1943.

463. Yao R, Zhang C, Yu T, Li N, Hu X, Wang X, et al. Evaluation of three read-depth based CNV detection tools using whole-exome sequencing data. *Mol Cytogenet*. 2017;10:30.

464. Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, MacDonald A, Carter DE, McIntyre AD, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. 2014 Apr;55(4):765–72.
465. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2013 Jul;15(7):565–74.
466. Rauh G, Schuster H, Fischer J, Keller C, Wolfram G, Zöllner N. Identification of a heterozygous compound individual with familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Klin Wochenschr*. 1991 May 3;69(7):320–4.
467. Benlian P, de Gennes JL, Dairou F, Hermelin B, Ginon I, Villain E, et al. Phenotypic expression in double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Hum Mutat*. 1996;7(4):340–5.
468. deCampo A, Schallmoser K, Schmidt H, Toplak H, Kostner GM. A novel splice-site mutation in intron 7 causes more severe hypercholesterolemia than a combined FH-FDB defect. *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):524–5.
469. Rubinsztein DC, Raal FJ, Seftel HC, Pilcher G, Coetzee GA, van der Westhuyzen DR. Characterization of six patients who are double heterozygotes for familial hypercholesterolemia and familial defective apo B-100. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. 1993 Jul;13(7):1076–81.
470. Tai ES, Koay ES, Chan E, Seng TJ, Loh LM, Sethi SK, et al. Compound heterozygous familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100 produce exaggerated hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2001 Mar;47(3):438–43.
471. Taylor A, Wang D, Patel K, Whittall R, Wood G, Farrer M, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet*. 2010 Jun;77(6):572–80.
472. Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006 Jun;186(2):433–40.
473. Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, Cefalù AB, Noto D, Fasano T, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013 Apr;227(2):342–8.
474. Emi M, Hegele RM, Hopkins PN, Wu LL, Plaetke R, Williams RR, et al. Effects of three genetic loci in a pedigree with multiple lipoprotein phenotypes. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. 1991 Oct;11(5):1349–55.
475. Sass C, Giroux LM, Ma Y, Roy M, Lavigne J, Lussier-Cacan S, et al. Evidence for a cholesterol-lowering gene in a French-Canadian kindred with familial hypercholesterolemia. *Hum Genet*. 1995 Jul;96(1):21–6.

476. van der Graaf A, Fouchier SW, Vissers MN, Defesche JC, Wiegman A, Sankatsing RR, et al. Familial defective apolipoprotein B and familial hypobetalipoproteinemia in one family: two neutralizing mutations. *Ann Intern Med.* 2008 May 6;148(9):712–4.
477. Huijgen R, Sjouke B, Vis K, de Randamie JSE, Defesche JC, Kastelein JJP, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-C Levels. *Hum Mutat.* 2012 Feb;33(2):448–55.
478. Hegele RA, Ban MR, Cao H, McIntyre AD, Robinson JF, Wang J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol.* 2015 Apr;26(2):103–13.
479. Ghaleb Y, Elbitar S, El Khoury P, Bruckert E, Carreau V, Carrié A, et al. Usefulness of the genetic risk score to identify phenocopies in families with familial hypercholesterolemia? *Eur J Hum Genet EJHG.* 2018 Apr;26(4):570–8.
480. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):231–8.
481. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet Lond Engl.* 2013 Apr 13;381(9874):1293–301.
482. Sjouke B, Tanck MWT, Fouchier SW, Defesche JC, Hutten BA, Wiegman A, et al. Children with hypercholesterolemia of unknown cause: Value of genetic risk scores. *J Clin Lipidol.* 2016 Aug;10(4):851–9.
483. Tanisawa K, Ito T, Sun X, Cao Z-B, Sakamoto S, Tanaka M, et al. Polygenic risk for hypertriglyceridemia is attenuated in Japanese men with high fitness levels. *Physiol Genomics.* 2014 Mar 15;46(6):207–15.
484. Paquette M, Chong M, Thériault S, Dufour R, Paré G, Baass A. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2017 Jun;11(3):725–732.e5.
485. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2015 May;17(5):405–24.
486. Strande NT, Brnich SE, Roman TS, Berg JS. Navigating the nuances of clinical sequence variant interpretation in Mendelian disease. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2018 Jul 10;

487. Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med*. 2018 Jun;20(6):591–8.
488. Exome Aggregation Consortium, Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug;536(7616):285–91.
489. The 1000 Genomes Project Consortium, Gibbs RA, Boerwinkle E, Doddapaneni H, Han Y, Korchina V, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct;526(7571):68–74.
490. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D862–868.
491. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D801–807.
492. Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK, Investigators of Portuguese FH Study. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis*. 2008 Feb;196(2):633–42.
493. Fouchier SW, Kastelein JJP, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat*. 2005 Dec;26(6):550–6.
494. Benito-Vicente A, Alves AC, Etxebarria A, Medeiros AM, Martin C, Bourbon M. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015 Dec;17(12):980–8.
495. Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, Medeiros AM, Marques L, Soutar AK. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet*. 2009 May;46(5):352–7.
496. Di Filippo M, Créhalet H, Samson-Bouma ME, Bonnet V, Aggerbeck LP, Rabès J-P, et al. Molecular and functional analysis of two new MTTP gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 2012 Mar;53(3):548–55.