

L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après

I. Défauts du récepteur des LDL

Mathilde Varret
Jean-Pierre Rabès
Catherine Boileau

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur d'athérosclérose, problème important de santé publique des pays industrialisés. Elle touche un sujet sur 20 dans nos sociétés, et son traitement est l'une des priorités de la lutte contre les maladies cardiovasculaires. En 1973, Michael Brown et Joseph Goldstein associaient des anomalies du récepteur LDL à une hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante: la FH (*familial hypercholesterolemia*). Quatorze ans plus tard, l'équipe de Thomas Innerarity montrait l'hétérogénéité génétique de cette affection en identifiant une mutation dans l'apolipoprotéine B, ligand spécifique du récepteur LDL. Cette nouvelle maladie, la FDB (*familial defective apolipoprotein B-100*), est cliniquement indiscernable de la FH. Depuis les travaux initiaux de Brown et Goldstein, le gène codant pour le récepteur LDL a été cloné et, actuellement, plus de 300 mutations ont été identifiées. Les premières expériences de thérapie génique ont été réalisées chez des sujets homozygotes pour la FH.

ADRESSES

M. Varret: étudiante en doctorat, Inserm U. 383, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université René-Descartes, Paris V, 149-161, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. J.P. Rabès: assistant hospitalier universitaire, étudiant en doctorat. C. Boileau: maître de conférences, praticien hospitalier. Inserm U. 383, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université René-Descartes, Paris V, 149-161, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. Laboratoire central de biochimie et de génétique moléculaire, CHU Ambroise-Paré, 9, avenue Charles-de Gaulle, 92104 Boulogne Cedex, France.

L'apparition simultanée, chez un patient, de xanthomes tendineux et de plaques d'athérome avait déjà été décrite avant le XX^e siècle. Dans les années 1930, les Norvégiens Thannhauser et Muller reconnaissaient le caractère héréditaire de l'hypercholestérolémie associée à des xanthomes et à des accidents cardiovasculaires prématurés. L'origine génétique de l'hypercholestérolémie familiale était confirmée par la suite par Wilkinson, Adlersberg, et d'autres, dans les années 1940 et 1950. Mais ce n'est qu'au début des années 1960, par l'étude de grandes familles libanaises que Khachadurian montra de façon définitive la transmission autosomique dominante et différençia, sur le plan clinique, les malades hétérozygotes des homozygotes. A la même période, Fredrickson, Lees, et Levy montrèrent que l'hypercholestérolémie familiale de type IIa (HCF) était un désordre

impliquant le métabolisme des apolipoprotéines et du cholestérol contenus dans les lipoparticules LDL. En 1973, Michael Brown et Joseph Goldstein montrèrent, par leurs études sur des cultures de fibroblastes de patients homozygotes, que la protéine déficiente était un récepteur cellulaire qui fixait les LDL plasmatiques et réglait la dégradation et la synthèse du cholestérol: le récepteur LDL. Ils associèrent ce déficit à la FH (*familial hypercholesterolemia*) et estimèrent la fréquence des défauts du récepteur LDL à 1/500 dans la population américaine: la FH était donc l'une des maladies héréditaires humaines les plus fréquentes. Leurs travaux, en désignant une cible biologique importante, ont également contribué à favoriser la mise au point d'une nouvelle classe d'hypocholestérolémiants (les statines) dont l'indication a largement dépassé aujourd'hui le cadre des FH [1].

Aspects cliniques de la FH

La FH est caractérisée par une accumulation des LDL plasmatiques à la suite d'un défaut de leur captage et de leur épuration par la voie des récepteurs spécifiques [1]. Il en découle une élévation des concentrations plasmatiques en cholestérol total, en cholestérol-LDL et en apolipoprotéine B (apo B), alors que les concentrations sanguines en cholestérol-HDL et en triglycérides restent normales. L'excès de cholestérol se dépose au niveau des tendons ou de la peau entraînant la formation de xanthomes, au niveau de la cornée où ils forment des arcs cornéens, et au niveau des artères coronaires et de l'aorte où apparaissent des plaques d'athérome induisant des complications cardiovasculaires graves. La FH existe sous deux formes cliniques, les formes homozygote et hétérozygote, qui se différencient par l'âge d'apparition et par la gravité de l'atteinte [1]. Les sujets hétérozygotes ont une cholestérolémie comprise entre 2,5 et 6 g/l; des xanthomes tendineux et/ou un arc cornéen sont présents dans 50 % des cas dès l'âge de 20 ans, et dans 80 % des cas au moment du décès. En l'absence de traitement efficace et prolongé, les complications cardio-

vasculaires débutent dans 50 % des cas avant 50 ans chez l'homme et avant 60 ans chez la femme et sont présentes chez 85 % des sujets masculins avant 60 ans ou féminins avant 70 ans [1]. Les sujets homozygotes ont une cholestérolémie supérieure à 6 g/l et des signes cliniques dès l'enfance: les xanthomes sont très fréquents et les dépôts athéromateux très importants. Ces patients souffrent d'infarctus du myocarde très tôt, au cours de la deuxième décennie.

Les sujets homozygotes sont dépourvus de récepteurs LDL fonctionnels et leur fréquence est de 1/1 million dans le monde, alors que les sujets hétérozygotes, qui ont 50 % de récepteurs LDL fonctionnels, sont présents à raison de 0,2 % dans les pays développés [1]. Ces fréquences peuvent être beaucoup plus élevées dans les communautés où certaines mutations sont dues à un effet fondateur: les Afrikaners, les Canadiens français, les chrétiens libanais, les Juifs ashkénazes, les Finlandais [2] et les Israéliens druzes [3]. La plus forte fréquence est observée chez les Afrikaners d'Afrique du Sud où elle est cinq fois plus élevée que dans la

population européenne dont ils sont issus.

Du gène LDLR à sa protéine

Le gène *LDLR* code pour une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire de 839 acides aminés. Localisé en 19p13.1-13.3, il a une taille de 45 kb et comporte 18 exons. La correspondance entre les exons du gène et les domaines protéiques est maintenant bien définie (*figure 1*) (description détaillée dans [4]). Dans les fibroblastes normaux, un précurseur du récepteur LDL de 120 kDa est produit dans le réticulum endoplasmique. Trente minutes après, la protéine de 160 kDa est transportée dans l'appareil de Golgi et, de là, le récepteur est transporté à la surface cellulaire où il fixe une lipoparticule LDL; puis le complexe LDL/récepteur est internalisé par endocytose [1] (*figure 2*). Dans l'endosome, les LDL sont dissociées des récepteurs qui sont ensuite recyclés à la surface cellulaire [5] après un passage dans l'appareil de Golgi; ce recyclage des récepteurs LDL est fortement dépendant de la clathrine [6].

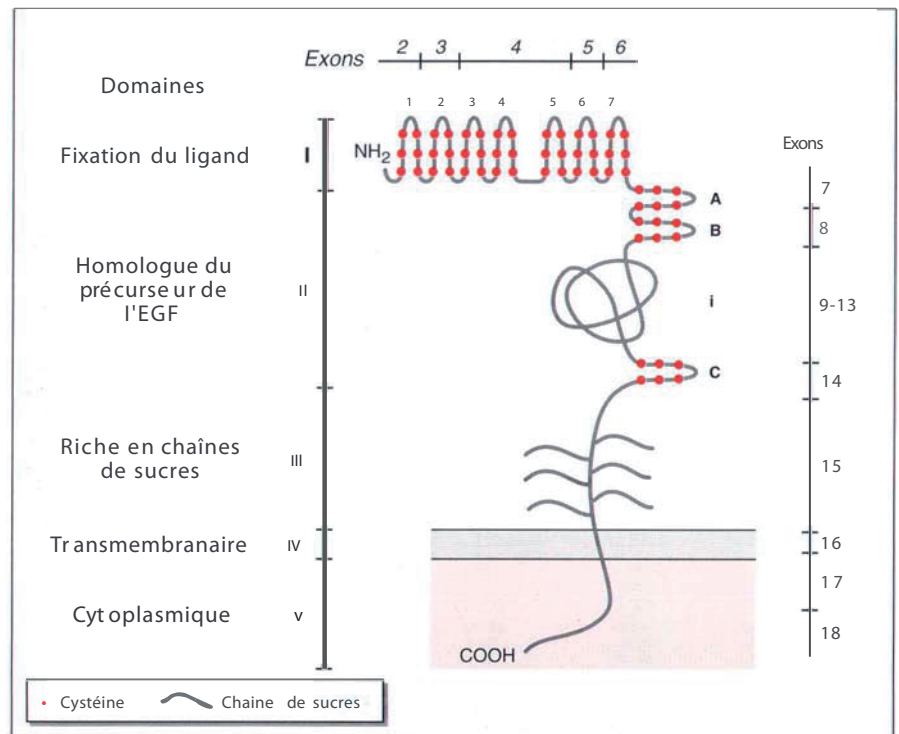


Figure 1. Correspondance entre les domaines protéiques et les exons du gène *LDLR*. (D'après Hobbs et al. 1990 [5].)

Actuellement, la structure tridimensionnelle complète de la protéine n'est pas connue; seule la structure de la première séquence répétée du domaine de liaison (domaine II, *figure 1*), codée par l'exon 2 du gène *LDLR*, a été étudiée par RMN [7]. Cette séquence montre un motif structural formé de trois feuillets β de trois acides aminés chacun à l'extrémité amino-terminale et d'une série de 5 coudes β . Cette topologie forme un petit noyau hydrophobe et une face présentant des résidus acides, dont la triade conservée Ser-Asp-Glu qui intervient dans la fixation des deux ligands du récepteur: l'apo E et l'apo B-100 [7].

De nombreux polymorphismes peu informatifs et en fort déséquilibre de liaison

Le gène du récepteur LDL est très polymorphe: trente-neuf polymorphismes différents ont été identifiés à ce locus (*Tableau I*) [3, 8-11]. La majorité d'entre eux sont de type bi-allélique, hormis le microsatellite tri-allélique de type (TA)_n de l'exon 18 et le polymorphisme *Alu*. L'étude de la combinaison d'une dizaine de ces marqueurs dans des familles américaines et suisses normolipidémiques n'a retrouvé qu'un petit nombre d'haplotypes sur tous ceux théoriquement possibles [3]. Grâce à ces nombreux polymorphismes du gène *LDLR* le diagnostic indirect de la FH a été effectué dans différentes populations: en Afrique du Sud, en Allemagne, en Angleterre, en France, en Finlande, en Israël, en Italie, en Suisse et en Espagne [3]. Par ailleurs, l'existence d'un effet fondateur dans certaines populations, ou de mutations récurrentes, a pu être confirmée par la caractérisation des haplotypes associés à certaines mutations du gène *LDLR*. Néanmoins, le fort déséquilibre de liaison existant entre les marqueurs ne permet pas globalement d'obtenir une bonne informativité; en outre, il existe un taux de recombinaison faible mais non négligeable, variable d'une population à l'autre et plus élevé dans la partie du gène *LDLR* riche en séquences *Alu* [3]. Ces deux problèmes limitent les analyses familiales au locus *LDLR*.

Des mutations très hétérogènes

Les mutations du gène *LDLR* rapportées dans différentes populations sont nombreuses et très hétérogènes [12]. Actuellement, 316 mutations ont été identifiées dans le gène *LDLR* par différentes équipes, dont la nôtre, réparties de la façon suivante: 68 (22%) réarrangements majeurs (*Tableau II*), 20 (6%) mutations au niveau des sites d'épissage (*Tableau III*), 6 (2%) mutations dans la séquence promotrice [2, 3, 13, 14], 2 (0,5%) mutations complexes, 133 (42%) mutations faux-sens, 38 (12%) mutations non-sens et 49 (15,5%) petites insertions/délétions (< 99pb) [12]. Par rapport à ce qui avait été initialement rapporté, les réarrangements majeurs identifiés dans ce gène ne représentent qu'environ un quart des défauts moléculaires [4]. Cela reflète un biais technologique. En effet, avant la disponibilité des méthodes rapides et simples de séquençage, seuls les réarrangements majeurs observés par la technique de *Southern* avaient été

identifiés. L'étude de l'ensemble des mutations montre que, à l'exception des mutations dues à un effet fondateur, la plupart des mutations n'ont été trouvées que dans une seule famille; nous n'avons trouvé dans la littérature que 27 mutations récurrentes.

Les mutations du gène *LDLR* ont été classées en cinq groupes selon les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la protéine mutée produite (*figure 2*) [5]. Par rapport à l'article de synthèse précédent [4] il existe donc une classe supplémentaire. Il s'agit de la classe 5 qui correspond à un défaut de recyclage des récepteurs LDL à la surface cellulaire [2]. En outre, les classes 2 et 4 ont été subdivisées en deux sous-classes: les mutations de classe 2 (les plus fréquentes) correspondent à des altérations complètes (classe 2A) ou partielles (classe 2B) du transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, dues à un mauvais repliement de la protéine. Les mutations de classe 4 codent pour des protéines qui atteignent la surface cellulaire et fixent les lipoparti-

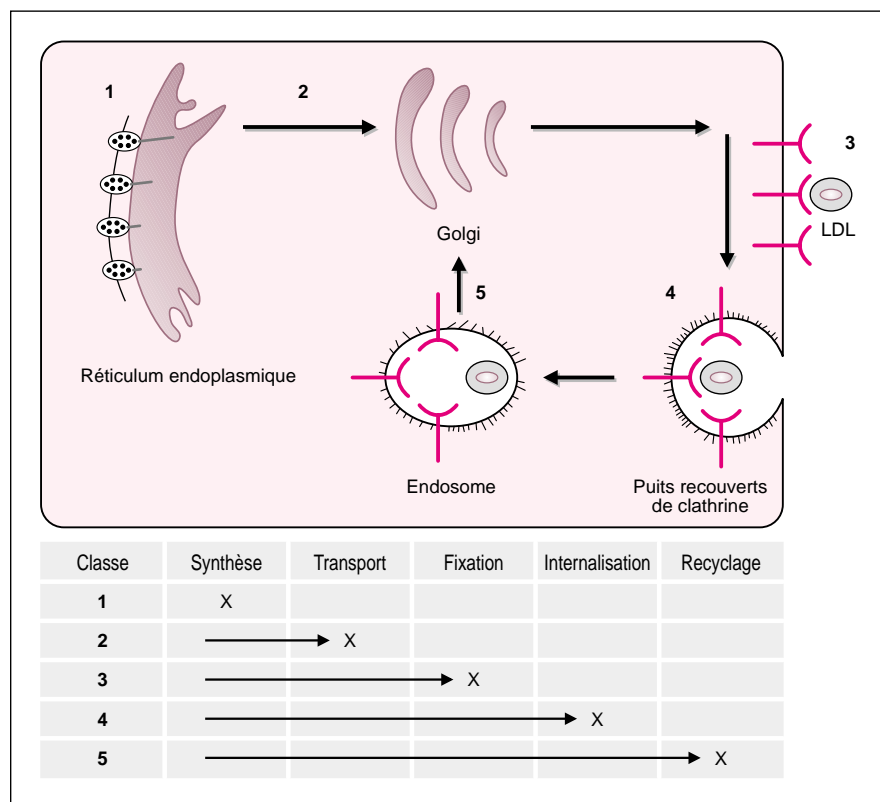


Figure 2. **Classes fonctionnelles des mutations du gène LDLR.** (D'après Hobbs et al. 1990 [5].)

Tableau I
POLYMORPHISMES DE SÉQUENCE DU GENE *LDLR*

Polymorphisme	Type	Localisation	Fréquence	Hétérozygotie	GDB*-ID ou [Référence]
Pvu II	RFLP	5'	0,76/0,24	0,45	155 691
Rsa I	RFLP	5'	0,75/0,25	0,38	155 707
Bcl I	RFLP	5'	0,78/0,22	0,34	155 710
Sacl/KpnI	RFLP	5'	0,50/0,50	0,50	155 711
Apa I	RFLP	5'	0,94/0,06	0,08	155 709
Bsm I	RFLP	5'	0,83/0,17	0,28	155 713
Bgl II	RFLP	5'	0,08/0,82	ND	[3]
Sfa NI	RFLP	exon 2	0,84/0,16	0,26	155 717
Apa LI	RFLP	intron 3	0,95/0,05	0,095	155 697
G → T, Mae II	RFLP	exon 4	0,994/0,006	0,012	[8]
Taq I	RFLP	intron 4	0,67/0,33	0,44	155 703
Stu I	RFLP	exon 6	0,86/0,14	0,24	155 712
Sph I	RFLP	intron 6	0,58/0,42	0,48	155 714
C → T, Cfo I	RFLP	exon 7	0,995/0,005	0,02	[9]
Sma I	RFLP	intron 7	0,56/0,44	0,49	[3]
Stu I	RFLP	exon 8	0,94/0,06	0,18	155 704
C → T, Hha I	RFLP	intron 9	0,56/0,44	0,42	[10]
G → A (Msp I)	SSCP	exon 10	0,67/0,33	0,50	155 694
Stu I	RFLP	exon 11	0,04/0,96	0,10	155 695
C → T	SSCP	exon 11	0,72/0,28	0,20	[3]
Mnl I	RFLP	exon 12	0,99/0,01	ND	[3]
T → C, Hinc II	RFLP	exon 12	0,45/0,55	0,50	[3]
C → t, Hinc II	RFLP	exon 12	0,87/0,13	0,02	[11]
Bst EI	RFLP	intron 12	0,75/0,25	0,38	155 702
Ava II	RFLP	exon 13	0,57/0,43	0,49	155 708
Hinf I	RFLP	exon 14	0,80/0,20	0,32	155 693
Msp I	RFLP	exon 15	0,82/0,18	0,35	155 700
Apa LI-5'	RFLP	intron 15	0,52/0,48	0,50	155 698
Pvu II	RFLP	intron 15	0,75/0,25	0,36	155 705
Spe I	RFLP	intron 15	0,92/0,08	0,15	155 715
Dde I	RFLP	exon 18	0,64/0,36	ND	[3]
Msp I	RFLP	exon 18	0,73/0,27	0,43	155 701
NCo I	RFLP	exon 18	0,72/0,28	0,50	155 706
Hae III	RFLP	exon 18	0,77/0,23	0,46	[3]
Afl III	RFLP	exon 18	0,70/0,30	0,50	598 994
Microsatellite	(TA) _n	exon 18	0,70/0,20/0,10	0,46	155 716
Pst I	RFLP	3'	0,55/0,45	0,49	155 696
Apa LI-3'	RFLP	3'	0,73/0,27	0,49	155 699
séquence Alu	SSCP	?	ND	0,76	155 692

ND : non déterminé.

* GDB : The Genome Database accessible sur le réseau à l'adresse suivante : <http://gdb.infobiogen.fr/>.

cules LDL mais sont incapables ni de s'ancrer dans les puits recouverts ni de s'internaliser. Les mutations de classe 4A n'affectent que le domaine intracytoplasmique, tandis que les mutations de classe 4B altèrent aussi le domaine transmembranaire. La nature et la localisation de la mutation peuvent influencer l'expression phénotypique [5]. En

effet, la plupart des sujets hétérozygotes qui possèdent une mutation produisant un récepteur qui conserve quelques domaines fonctionnels, ont des concentrations en cholestérol plus basses et une athérosclérose moins grave, par rapport aux sujets qui ont une mutation produisant un récepteur complètement défectueux [1]. En revanche, les

sujets atteints de FH dont la mutation du récepteur bloque la fixation des LDL et des IDL, respectivement par l'apo B et l'apo E, ont une production de LDL très largement augmentée, les IDL n'étant plus réabsorbées par le foie et les LDL étant moins rapidement éliminées de la circulation. Il en résulte une surproduction de LDL qui, associée à une

(1) nd: non déterminé; (2) pr: promoteur; (3) nd: non déterminé; (4) nd: non déterminé; numérotation selon la figure 2; (5) pr: promoteur; ps: peptide signal; numérotation selon la figure 1; (6) nd: non déterminé; Oui indique qu'un mécanisme de recombinaison inégale entre des séquences Alu à l'origine du remaniement a été décrit; (7) nd: non déterminé; F: effet fondateur; P: mutation privée.

Tableau II

RÉARRANGEMENTS MAJEURS RAPPORTÉS DANS LE GÈNE *LDLR*

Fiche	Nom (1)	Événement	Exon (2)	kb (3)	Classe (4)	Domaine (5)	Alu-Alu (6)	Récurrence (7)	Origine	Référence
3	FH-French-Canadian 1	Délétion	pr-1	10	1	pr + ps	nd	F	Canadien français	[2]
30	FH-Denver 1	Délétion	pr-1	6	1	pr + ps	nd	nd	Américain (USA)	[2]
69	FH-Siracusa	Délétion	pr-2	20	1	pr + ps + I 1	nd	P	Italien	[16]
41	FH-Bologna 1	Délétion	pr-6	> 25	1	pr + ps + I	nd	P	Italien/Anglais	[2]
56	nd	Délétion	pr-6	> 10	nd	pr + ps + I	nd	F	Anglais	[3]
31	nd	Délétion	1-18	nd	1	tous	nd	nd	Américain/Italien	[4]
34	nd	Duplication	2	2	nd	I 1	nd	nd	Américain	[4]
4	FH-French-Canadian 5	Délétion	2-3	5	3	I 1,2	nd	F	Canadien français	[2]
32	FH-Tonami 2	Délétion	2-3	10	3	I 1,2	Oui	nd	Japonais	[2]
33	FH-Tsukuba 1	Délétion	2-3	7	3	I 1,2	nd	nd	Japonais	[2]
35	FH-Kanazawa	Délétion	2-4	12	nd	I 1,5	nd	nd	Japonais	[2]
2	FH-Paris 2	Duplication	3-5	7	3	I 1,6	nd	nd	Français	[2]
12	FH-Vancouver 4	Délétion	2-6	9,5	nd	I 1,7	nd	nd	Canadien anglais	[2]
13	FH-Vancouver 5	Délétion	2-6	10	nd	I 1,7	nd	nd	Canadien anglais	[2]
1	FH-St Louis	Duplication	2-8	14	3	I + II A, B	Oui	nd	Américain (USA)	[2]
29	FH-Pavia	Délétion	2-12	25	1	I + II A, B, i	nd	F	Italien	[2]
42	FH-Aarhus 2	Délétion	3-6	9	nd	I 2,7	Oui	P	Danois	[2]
14	FH-Vancouver 3	Délétion	3-8	11	nd	I 2,7 + II A, B	nd	nd	Canadien anglais	[2]
66	FH-Massa	Délétion	3-12	12	nd	I 2,7 + II A, B, i	nd	P	Italien	[15]
21	FH-Vancouver 6	Délétion	4-6	5	nd	I 3,7	nd	nd	Canadien anglais	[2]
60	FH-St Petersburg	Délétion	4-6	5	nd	I 3,7	nd	P	Russe	[17]
5	FH-Paris 1	Délétion	5	0,8	3	I 6	nd	nd	Français	[2]
6	FH-London 2	Délétion	5	1	3	I 6	nd	nd	Anglais	[2]
43	FH-Aarhus 3	Délétion	5	1	3	I 6	Oui	P	Danois	[2]
46	FH-London 3	Délétion	7	1	nd	II A	nd	nd	Anglais	[2]
7	FH-Cape Town 2	Délétion	7-8	2,5	3 et 4	II A, B	Oui	nd	Sud-Africain	[2]
8	FH-Leuven 1	Délétion	7-8	4	3 et 4	II A, B	nd	F	Néerlandais	[2]
45	FH-London 8	Duplication	7-8	4	nd	II A, B	nd	nd	Anglais	[2]
57	nd	Duplication	7-8	nd	nd	II A, B	nd	P	Polonais	[3]
59	FH-Oula 1	Délétion	7-10	7,5	nd	II A, B, I	nd	P	Finlandais	[2]
19	FH-Osaka 2	Délétion	7-14	12	3 et 5	II	Oui	nd	Japonais	[2]
36	nd	Délétion	7-14	13	nd	II	nd	nd	Japonais	[2]
44	FH-London 7	Délétion	7-14	11	nd	II	nd	nd	Indien d'Asie	[2]
71	nd	Délétion	7-14	10	nd	II	nd	nd	Anglais	[3]
64	nd	Insertion	9	0,11	nd	II i	nd	F	Tchèque	[18]
22	FH-Reykjavik	Délétion	9-10	2	nd	II i	nd	P	Islandais	[2]
47	FH-Leuven 3	Duplication	9-12	4,4	nd	II i	nd	F	Néerlandais	[2]
61	FH-Salemo	Duplication	9-14	10	nd	II i, C	nd	P	Italien	[3]
37	nd	Duplication	10-14	9,5	nd	II i, C	nd	nd	Italien	[4]
53	nd	Insertion	11	7	nd	II i	nd	P	Néerlandais	[4]
67	FH-Genova	Délétion	11-12	4	nd	II i	nd	P	Italien	[15]
62	nd	Délétion	11-14	8	nd	II i, C	nd	nd	Chinois	[3]
48	FH-Oulu 2	Délétion	11-16	13	nd	II i, C + III + IV	nd	P	Finlandais	[2]
15	FH-London 1	Délétion	13-14	4	1	II i, C	Oui	nd	Anglais	[2]
16	FH-Italy 1	Délétion	13-14	4	1	II i, C	Oui	P	Italien	[2]
17	FH-Vancouver 1	Délétion	13-14	4,5	1	II i, C	nd	nd	Canadien anglais	[2]
65	FH-Roma	Délétion	13-14	4,7	nd	II i, C	Oui	P	Italien	[15]
27	FH-Potenza	Délétion	13-15	5	1	II i, C + III	Oui	nd	Italien	[2]
28	FH-Bologna 2	Duplication	13-15	7	nd	II i, C + III	Oui	nd	Italien	[2]
63	nd	Délétion	14 ou 15	2	nd	II C ou III	Oui	nd	Anglais	[4]
23	FH-Tonami 1	Délétion	15	6	nd	III	Oui	F	Japonnais	[2]
49	FH-Espoo	Délétion	15	6	nd	III	nd	P	Finlandais	[2]
38	nd	Délétion	15-16	6	nd	III + IV	nd	nd	Japonais	[4]
50	FH-London 9	Délétion	15-18	10,5	nd	III + IV + V	nd	nd	Anglais	[2]
54	nd	Délétion	16 (5')	0,4	nd	IV	nd	P	Néerlandais	[4]
26	FH-Leuven 2	Délétion	16	0,4	nd	IV	nd	nd	Néerlandais	[2]
68	FH-Padova 2	Délétion	16	2	nd	IV	Oui	P	Italien	[15]
24	FH-Tsukuba 2	Délétion	16-17	4	4	IV + V	Oui	nd	Japonais	[2]
39	nd	Délétion	16-17	2	nd	IV + V	nd	nd	Français	[4]
51	FH-Viterbo	Duplication	16-17	5,5	4	IV + V	nd	P	Italien	[2]
9	FH-Rochester	Délétion	16-18	5,5	4	IV + V	Oui	nd	Américain (USA)	[2]
10	FH-Osaka 1	Délétion	16-18	7,8	4	IV + V	Oui	nd	Japonais	[2]
11	FH-Helsinki	Délétion	16-18	9,5	4 et 5	IV + V	Non	F	Finlandais	[2]
20	FH-Vancouver 2	Délétion	17	0,4	4	V	nd	nd	Canadien anglais	[2]
52	FH-Aarhus 1	Délétion	17	2	nd	V	Oui	P	Danois	[2]
25	FH-Baltimore 2	Délétion	17-18	> 10	2B	V	nd	nd	Américain (USA)	[2]
55	nd	Délétion	18 (3')	0,5	nd	V	nd	nd	Japonais	[4]
40	FH-Portugal	Insertion	nd	< 5	1	nd	nd	nd	Portugais	[5]

Tableau III

MUTATIONS RAPPORTÉES AU NIVEAU DES SITES D'ÉPISSAGE DU GÈNE *LDLR*

Fiche	Nom (1)	Intron	Site (2)	Localisation	Événement	nb ARNm (3)	Classe (4)	Origine	Références
7	FH-Lille/313delCG	3	D	313	del CG	nd	3 ou 5	Français	[2]
3	FH-Elverum/313+1 (G → A)	3	D	313 + 1	G → A	nd	nd	Anglais	[20]
9	313 + 1 (G → C)	3	D	313 + 1	G → C	nd	nd	Néerlandais	[21]
10	313 + 1 (G → A)	3	D	313 + 1	G → A	nd	nd	Néerlandais	[21]
15	313 + 1 (G → A)	3	D	313 + 1	G → T	nd	nd	Danois	[22]
17	313 + 1 (G → A)	3	D	313 + 1	G → A	nd	nd	Norvégien	[23]
18	313 + 1 (G → A)	3	D	313 + 1	G → A	nd	nd	Danois	[22]
12	313 + 2 (T → C)	3	D	313 + 2	T → C	nd	nd	Néerlandais	[21]
19	1061 - 8 (T → C)	7	A	1061 - 8	T → C	nd	nd	Danois	[19]
1	1358 + 1 (G → A)	9	D	1358 + 1	G → A	3	1	Néerlandais	[3]
11	1359 - 1 (G → >A)	9	A	1359 - 1	G → A	nd	nd	Néerlandais	[21]
16	nd	9	(A)	1359 - (25)	del9-ins5	nd	nd	Anglais	[24]
13	1586 + 5 (G → A)	10	D	1586 + 5	G → A	nd	nd	Suédois	[25]
14	1705 + 1 (G → T)	11	D	1705 + 1	G → T	nd	nd	Norvégien	[26]
6	FH/Tunis/1845 + 1 (G → A)	12	D	1845 + 1	G → A	nd	1	Tunisien	[2]
2	1845 + 2 (T → C)	12	D	1845 + 2	T → C	nd	1	Japonais	[3]
5	FH-Niigata/1845 + 2 (T → C)	12	D	1845 + 2	T → C	2	1	Français	[2]
20	1846 - 1 (G → A)	12	A	1846 - 1	G → A	nd	nd	Danois	[19]
4	FH-Benevento/2311 + 1 (G→A)	15	D	2311 + 1	G → A	3	nd	Italien	[27]
8	2390 - 2 (A → G)	16	A	2390 - 2	A → G	1	5	Néerlandais	[3]

(1) nd: non déterminé; (2) D: site donneur d'épissage; A: site accepteur d'épissage; (3) nd: non déterminé; nb ARNm: nombre de transcrits; (4) nd: non déterminé; numérotation selon la figure 2.

faible dégradation, conduit à une hypercholestérolémie sévère [1]. A l'inverse, si la mutation empêche la fixation des LDL seules, par l'apo B, la dégradation des LDL est ralentie mais leur production n'est pas augmentée et il en résulte donc une hypercholestérolémie modérée [5].

L'analyse mutationnelle du gène *LDLR*

Les réarrangements majeurs et les séquences *Alu*

Dans les régions non codantes du génome humain, il existe 300 000 à 900 000 copies des séquences répétées de type *Alu*. Le gène *LDLR* est particulièrement riche en séquences *Alu*. En effet, environ 15 séquences *Alu* y ont été identifiées, dans les introns 1, 4, 5, 6, 8, 12, 14, 15 et l'exon 18 [3]. Les points de cassure des remaniements du gène *LDLR* coïncident le plus souvent avec la position de séquences *Alu*. Des mécanismes de recombinaison inégale se produisent entre ces séquences, conduisant à l'apparition de délétions ou de duplications. Ces mécanismes ont été montrés seulement pour 18 remaniements (Tableau II) [2, 4, 15], pour les 52 autres réarrangements

majeurs [2-5, 15-18], la contribution des séquences *Alu* est inconnue. Néanmoins, il doit exister d'autres mécanismes puisque, dans le cas de la délétion FH-Helsinki, il a été montré que la mutation ne résulte pas d'une recombinaison entre deux séquences *Alu* [3].

Les anomalies de l'épissage

Sur les 20 mutations dans des sites d'épissage décrites dans le gène *LDLR* (Tableau III) [2, 3, 19-27], 11 touchent la guanine d'un site donneur, 3 touchent la thymine d'un site donneur, et 5 touchent l'une des bases du site accepteur en 3' de chaque intron. La présence de transcrits de taille anormale n'a été montrée que pour trois de ces mutations. A ce jour, toutes les

anomalies d'épissage décrites n'ont été trouvées que dans une seule famille, sauf la transition G → A en position 313 + 1, qui a été retrouvée chez quatre patients: un Anglais, un Néerlandais, un Danois et un norvégien. L'haplotype associé n'ayant été décrit que pour le sujet norvégien, il n'y a pas d'élément pour juger de la récurrence de cette mutation.

Les mutations du promoteur

Le promoteur du gène *LDLR* contient tous les éléments nécessaires à sa régulation, elle-même dépendante des besoins en stérol de la cellule (figure 3) (*m/s n° 3, vol. 13, p 374*) [28]. En l'absence de cholestérol, la transcription du gène est activée. En revanche, en présence de stérols, la répression

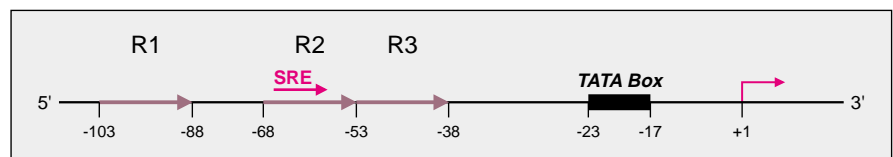


Figure 3. Schéma du promoteur du gène *LDLR*. R1, R2 et R3 indiquent les séquences répétées de 16 paires de bases. R1 et R3 fixent le facteur Sp1. SRE (sterol responsive element) indique la séquence qui lie les protéines SREBP (sterol responsive element binding protein). La numérotation indique les positions de ces séquences par rapport au site + 1 du début de la transcription. (D'après Smith et al. [28].)

de la transcription est rapide. Un excès de cholestérol plasmatique induit un rétrocontrôle visant à diminuer tous les apports de cholestérol, exogène et endogène. Les principales séquences régulant l'expression du gène *LDLR* sont regroupées dans les 250 bases en amont du site de début de la transcription. La régulation de l'expression du gène par les stérols se fait par l'intermédiaire des facteurs de transcription Sp1 et les protéines SREBP (*sterol responsive element binding protein*). L'activateur Sp1 se fixe à deux des trois répétitions imparfaites de 16 paires de bases (nommées R1, R2, et R3) : R1 et R3. Les activateurs SREBP se fixent à un site SRE (*sterol responsive element*) de 10 paires de bases, imbriqué dans la répétition R2 [28]. Ces sites sont retrouvés dans d'autres gènes réglés par les stérols, comme les gènes de l'HMGCoA (hydroxy-méthylglutaryl-coenzyme-A) réductase (*HMGCR*) et de l'HMGCoA synthase (*HMGCS*) [3]. En l'absence de stérols dans la cellule, la protéine SREBP-1 va activer la transcription des gènes *LDLR*, *HMGCR*, et *HMGCS* en stimulant la fixation du facteur Sp1 sur son site R3 adjacent et en activant conjointement la transcription [29]. En revanche, en présence de stérols, la SREBP-1 est très rapidement inactivée [3].

A ce jour, seulement six mutations dans les séquences régulatrices du gène *LDLR* ont été décrites [2, 3, 13, 14]. Cinq de ces mutations touchent le site R3 et une seule le site R1, où elles bloquent la fixation de l'activateur Sp1 et donc son interaction avec la SREBP-1. Toutes ces mutations n'ont été trouvées que dans une seule famille, sauf la transition C → T en position -43 décrite chez un patient finlandais [3] et un patient danois [14]. Là encore, l'haplotype n'ayant été décrit que pour ce dernier, il n'y a pas d'élément pour juger de la récurrence de cette mutation.

Les mutations ponctuelles

Les différentes études sur les mutations de petite taille du gène *LDLR* ont porté sur leur structure moléculaire, et il n'existe pas actuellement de véritable corrélation génotype/phénotype. Cela s'explique par le fait que, d'une part, elles n'ont jamais été rigoureusement recherchées et que,

d'autre part, beaucoup de ces mutations ont été identifiées chez des sujets homozygotes mais qui étaient en réalité sur le plan moléculaire des hétérozygotes composites. Dans cette perspective, pour standardiser les informations apportées par chaque mutation, et pour faciliter l'analyse mutationnelle du gène *LDLR*, nous avons créé une base de données reliée à des outils d'analyse informatisés [12]. La base de données contient actuellement 220 mutations ponctuelles et petites insertions/délétions (< 99 pb), soit près de 70 % des mutations décrites dans le gène *LDLR*.

L'analyse informatisée des 220 mutations ponctuelles révèle les éléments suivants : (1) la majorité de ces mutations sont de type faux sens (41 %). Plus particulièrement, l'étude des événements mutationnels révèle que seulement 17 % des mutations touchent le dinucléotide CpG. Ce résultat est en contradiction avec les travaux de Cooper et Krawczak [30] qui ont montré que 32 % des mutations ponctuelles impliquées dans des maladies humaines survenaient au niveau de ce doublet. Le mécanisme en cause est une désamination oxydative des CpG méthylés responsable de transitions CG → TG ou CG → CA. L'origine du déficit observé dans le gène *LDLR* est inconnue. (2) L'analyse de la répartition des mutations confirme qu'il n'existe pas de point chaud de mutation. Elle est, en effet, à peu près homogène dans tous les exons sauf au niveau de quatre d'entre eux. On observe un excès de mutations dans l'exon 4 ($p < 0,001$) qui code pour les trois répétitions centrales du domaine de liaison (domaines I3, I4, et I5 sur la *figure 1*). Inversement, il y a un déficit des mutations retrouvées dans les exons 13 ($p < 0,01$), 15 ($p < 0,01$), et 16 ($p < 0,05$). Ces anomalies de répartition ne correspondent pas à un biais technologique puisque la plupart des équipes ont balayé de façon systématique les 18 exons du gène pour identifier les mutations. (3) L'analyse de la distribution des mutations dans les répétitions des deux premiers domaines de la protéine montre des résultats différents selon les domaines. Quarante-vingt-dix-neuf mutations (soit 45 % des mutations de petite taille) sont localisées dans les sept répétitions du domaine de

liaison. L'étude de la distribution de ces mutations, après alignement des sept motifs, montre que 77 % de ces mutations touchent un acide aminé conservé et sont préférentiellement localisées dans la région carboxy-terminale des motifs. Le même type d'étude dans les trois motifs répétés du domaine homologue du précurseur de l'EGF apporte des résultats différents. En effet, les 39 mutations identifiées dans ces répétitions touchent essentiellement des acides aminés non conservés et sembleraient être préférentiellement localisées dans la région amino-terminale de ces motifs.

Modèles animaux de FH

Aucune espèce animale ne reproduit exactement le profil lipoprotéique de l'homme. En revanche, chaque espèce animale présente des points particuliers de ressemblance avec l'homme qui permettent l'étude d'une composante spécifique du métabolisme des lipoprotéines et de l'hypercholestérolémie. Actuellement, deux modèles animaux spontanés de FH ont été identifiés et étudiés. Le lapin WHHL (*watanabe heritable hyperlipidemia*) est le principal modèle naturel de FH. Il développe une hypercholestérolémie essentielle ainsi que des signes d'athérosclérose précoce. Ce lapin présente une délétion en phase de 12 nucléotides qui élimine quatre acides aminés du domaine de liaison [3]. De façon intéressante, une mutation similaire a été rapportée chez un malade dont le récepteur ne pouvait pas atteindre la surface cellulaire. Les primates n'ont pas tous le même profil lipoprotéique ; certaines espèces semblent être naturellement protégées contre l'athérosclérose, alors que d'autres ont un profil lipoprotéique favorisant le développement de l'athérosclérose et ressemblant à celui de l'homme. L'équipe de Scanu a identifié une famille de singes rhésus ayant une hypercholestérolémie spontanée et un récepteur des LDL déficient. Le séquençage du gène *LDLR* a permis l'identification d'une mutation non-sens dans l'exon 6 et des biopsies hépatiques chez les animaux hétérozygotes ont montré une réduction de l'ordre de 50 % de la concentration de messager [3].

Enfin, il est à noter que le hamster syrien a une concentration de LDL plasmatiques et un métabolisme des lipoprotéines très proches de ceux de l'homme. C'est donc, malgré sa petite taille, un bon modèle pour étudier les mécanismes de régulation du cholestérol LDL en réponse à divers stimulus [31] mais, à notre connaissance, aucune mutation dans le gène *LDLR* n'a été identifiée dans ce modèle.

Les animaux génétiquement modifiés

Les souris ne sont pas un très bon modèle de FH car leur métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol est assez différent de celui de l'homme. En revanche, elles constituent un outil de choix pour les expériences de transgénèse. La première génération de souris transgéniques a permis de constater qu'une surexpression du gène *LDLR* humain réduisait de 90 % les concentrations plasmatiques d'apo B et d'apo E. La seconde génération de souris transgéniques surexprimait le gène du récepteur d'origine exogène dans le foie et leur concentration de cholestérol plasmatique était alors diminuée de 50 % par rapport à celle des souris normales [32]. En comparant les profils lipoprotéiques après fractionnement par HPLC, les souris transgéniques présentaient une diminution de toutes les classes de lipoparticules. Ces souris transgéniques ne présentaient, après un régime riche en cholestérol et en graisses saturées, qu'une hausse modérée du cholestérol plasmatique contrairement aux témoins non transgéniques, sans élévation de la fraction IDL/LDL. La surproduction de récepteurs des LDL par ces souris les protège donc d'une hypercholestérolémie induite par l'alimentation [32]. Les souris au gène *LDLR* invalidé (*knock-out*) *LDLR*^{-/-} ont un retard à l'élimination des VLDL, IDL, et LDL plasmatiques qui provoque une forte augmentation des IDL et des LDL. Malgré ces altérations biologiques, les souris adultes *LDLR*^{-/-} ne présentent pas de xanthomatose et les lésions athérosclérotiques de l'aorte sont minimales. Ce n'est qu'après un régime très riche en cholestérol qu'elles développent de nom-

breux xanthomes cutanés et une athérosclérose aortique sévère. Ces souris *LDLR*^{-/-} ont permis l'étude des caractéristiques cliniques de la FH homozygote, de définir la contribution réelle du récepteur dans le métabolisme lipidique murin et de montrer les différences entre la souris et l'homme [33].

Des statines à la thérapie génique

Le traitement de la FH consiste à diminuer la concentration plasmatique des LDL afin de maintenir cette concentration dans la limite des valeurs normales. Chez les hétérozygotes, la thérapeutique la plus efficace est l'administration de médicaments qui stimulent l'allèle normal du gène *LDLR*. Pour cela, l'action combinée de résines et d'inhibiteurs de l'HMGCoA réductase (ou statines) permet de diminuer la concentration plasmatique des LDL de 50 % chez les sujets hétérozygotes (*m/s n° 2, vol. 12, p. 244*) [1]. Les homozygotes sont en général peu sensibles à ce traitement puisqu'ils n'ont aucun allèle normal, cependant ils répondent souvent un peu aux statines, peut être du fait de l'action de ces médicaments sur les LDL directement synthétisés par le foie. Dans l'alternative, des traitements très spécialisés peuvent alors être employés comme la plasmaphérese épurant sélectivement le sang des particules riches en cholestérol, les LDL et les VLDL. Ce traitement permet de diminuer considérablement la concentration de LDL, de réduire fortement les xanthomes, et d'obtenir une stabilisation, voire une régression des lésions artérielles. Si l'activité des récepteurs LDL n'est pas nulle, l'association à un traitement médicamenteux stimulant ces récepteurs est utile pour ralentir la remontée des LDL entre les séances d'épuration [34]. Dans des cas extrêmes, des méthodes chirurgicales de traitement peuvent être utilisées comme la greffe de foie issu d'un donneur sain [1]. Des essais de greffe de cellules xénogéniques se sont montrées concluantes sur le lapin WHHL. Elles devraient permettre d'éviter l'attente, souvent trop longue, d'un donneur sain volontaire [35].

Les essais de thérapie génique s'étant montrés concluants sur des modèles

animaux tels que le lapin, le chien, et les primates, Grossman *et al.* [36, 37] ont testé la thérapie génique *ex vivo* sur cinq patients homozygotes pour différentes mutations du gène *LDLR*, d'âge, de sexe et d'origine différents. A partir d'une hépatectomie partielle, les hépatocytes ont été infectés par un rétrovirus recombinant pour l'ADNc du gène *LDLR* humain. Trois jours après leur prélèvement sur les patients, les hépatocytes infectés ont été réintroduits dans la circulation portale de leur hôte d'origine où ils sont retournés au foie par un processus de *homing*. Les cinq patients, âgés de 7 à 41 ans, ont tous bien supporté l'intervention chirurgicale et présentaient quatre mois après l'opération une expression du transgène évaluée par hybridation *in situ*. Chez trois de ces patients, la comparaison des taux de lipides avant et quatre mois après l'intervention montrait une diminution des taux de cholestérol total (20 %, 6 %, 19 %), de cholestérol LDL (23 %, 6 %, 19 %), et d'apo B (21 %, 10 %, 17 %). Chez l'un de ces patients, une jeune fille de 11 ans porteuse de deux allèles nuls du gène *LDLR*, le catabolisme des LDL était augmenté de 53 %. Malgré ces premiers résultats, l'effet correcteur obtenu par la thérapie génique *ex vivo* ne semble pas durable (*m/s n° 1, vol. 12, p. 59*). Une alternative pourrait être la thérapie génique *in vivo* pour laquelle des essais ont déjà été réalisés chez l'animal par introduction dans la circulation sanguine d'un adénovirus recombinant. Chez le lapin WHHL, le vecteur était un adénovirus recombinant pour l'ADNc du gène *LDLR* [38] et chez la souris *LDLR*^{-/-}, le vecteur était un adénovirus recombinant pour, soit l'ADNc du gène *LDLR* [39], soit l'ADNc du gène du récepteur des VLDL (*VLDLR*) [39]. Chez cette souris, l'utilisation de l'adénovirus-*LDLR* a corrigé l'hypercholestérolémie mais seulement de façon transitoire car une réaction immunitaire s'est déclenchée contre le récepteur des LDL, contribuant ainsi probablement à l'extinction du transgène. Le remplacement de l'ADNc du gène *LDLR* par celui du gène *VLDLR* éviterait apparemment cette réponse immunitaire, et permettrait d'obtenir une correction métabolique plus durable [40].

Conclusion

Le chemin parcouru ces 25 dernières années dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la FH est très important et a été associé au développement d'un arsenal thérapeutique qui pourrait être complété dans les années à venir par la thérapie génique. Grâce aux progrès des techniques de biologie moléculaire, un nombre considérable de mutations naturelles associées à la FH ont été décrites dans le gène du récepteur des LDL. Leur identification a permis de mettre à jour des relations structure/fonction de ce gène. Actuellement, l'effort doit porter sur la recherche de corrélations génotype/phénotype qui permettront, notamment, d'optimiser les stratégies thérapeutiques ■

Remerciements

Ce travail a bénéficié de divers soutiens financiers, pour cela nous remercions : la Fondation de France, la Faculté de Médecine de Paris-Ouest-Université Paris V, le GREG (Groupe de recherche et d'études du génome) et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (ACCSV2).

RÉFÉRENCES

1. Goldstein J, Brown M. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989: 1215-50.
2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1: 445-66.
3. Benlian P. Récepteur LDL, locus de l'hypercholestérolémie familiale, et modèles animaux. *Génétique et dyslipidémies*. Paris: Éditions Inserm, 1996: 37-55 et 172-4.
4. Benlian P, Loux N. Hétérogénéité des mutations du récepteur LDL dans l'hypercholestérolémie familiale. *Med Sci* 1991; 7: 1052-60.
5. Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990; 24: 133-70.
6. Bos CR, Shank SL, Snider MD. Role of clathrin-coated vesicles in glycoprotein transport from the cell surface to the Golgi complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 665-71.
7. Daly NL, Scanlon MJ, Djordjevic JT, Kroon PA, Smith R. Three-dimensional structure of a cystein-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6334-8.
8. Peeters AV, Van Gaal LF, Kotze MJ. A rare silent G to T mutation in exon 4 of the human low density lipoprotein receptor gene. *Clin Genet* 1995; 47: 101-2.
9. Jensen HK, Jensen LG, Hansen PS, Kjeldsen M, Gerdes LU, Bolund L, Faergeman O, Gregersen N. A rare silent C to T mutation in exon 7 of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene. *Clin Genet* 1994; 45: 54-5.
10. Nissen H, Bo Hansen AB, Jensen HK. A frequent Hhal polymorphism in intron 9 of the low density lipoprotein receptor gene detected by the denaturing gradient gel electrophoresis. *Clin Genet* 1995; 48: 221-2.
11. Yamakawa-Kobayashi K, Kobayashi T, Obara T, Hamaguchi H. Four new nucleotides sequence polymorphisms in the LDL receptor gene detected by SSCP analysis. *Hum Genet* 1993; 92: 76-8.
12. Varret M, Rabès JP, Collod-Bérout G, Junien C, Boileau C, Bérout C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 172-80.
13. Sun XM, Neuwirth C, Wade DP, Knight BL, Soutar AK. A mutation (T-45C) in the promoter region of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene is associated with a mild clinical phenotype in a patient with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH). *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2125-9.
14. Jensen LG, Jensen HK, Nissen H, Kristiansen K, Fraergeman O, Bolund L, Gregersen N. An LDL receptor promoter mutation in a heterozygous FH patient with dramatically skewed ratio between the two allelic mRNA variants. *Hum Mutat* 1996; 7: 82-4.
15. Bertolini S, Garuti R, Lelli W, Rollerli M, Tiozzo R, Ghisellini M, Simone ML, Masturzo P, Elicio N, Stefanutti C, Coviello D, Carabbio C, Orecchini G, Calandra S. Four novel partial deletions of LDLR-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 81-8.
16. Garuti R, Lelli N, Barozzini M, Tiozzo R, Ghisellini M, Simone ML, Volti SL, Garozzo R, Mollica F, Vergoni W, Bertolini S, Calandra S. Two novel partial deletions of the LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia (FH-Siracusa and FH-Reggio Emilia). *Atherosclerosis* 1996; 121: 105-17.
17. Mandelshtam MJ, Lipovetskyi BM, Schwartzman AL, Gaitskhoki VS. A novel deletion in the low-density lipoprotein receptor gene in a patient with familial hypercholesterolemia from St Petersburg. *Hum Mutat* 1993; 2: 256-60.
18. Horinek A, Slezka V, Sobra J, Ceska R. DNA analysis in heterozygotes in familial hypercholesterolemia. *Cas Lek Cesk* 1995; 134: 234-9.
19. Jensen HK, Jensen LG, Hansen PS, Faergeman O, Gregersen N. High sensitivity of single-strand conformation polymorphism method for detecting sequence variations in the low-density lipoprotein receptor gene validated by DNA sequencing. *Clin Chem* 1996; 42: 1140-6.
20. Sun X, Patel D, Bhatnagar D, Knight B, Soutar A. Characterisation of a splice-site mutation in the gene for the LDL receptor associated with an unpredictably severe clinical phenotype in English patients with heterozygous FH. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 219-27.
21. Lombardi P, Sijbrands EJG, van de Giesen K, Smelt AHM, Kastelein JJP, Frants RR, Havekes LM. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. *J Lipid Res* 1995; 36: 860-7.
22. Jensen HK, Jensen LG, Hansen PS, Faergeman O, Gregersen N. Two point mutations (313 + G-/A and 313 + G-/T) in the splice donor site of intron 3 of the low-density lipoprotein receptor gene are associated with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1996; 7: 269-71.
23. Leren TP, Solsberg K, Rodningen OK, Tonstad S, Ose L. Two founder mutations in the LDL receptor gene in Norwegian familial hypercholesterolemia subjects. *Atherosclerosis* 1994; 111: 175-82.
24. Webb JC, Sun XM, McCarthy SN, Neuwirth C, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK. Characterization of mutations in the low density lipoprotein (LDL) receptor gene in patients with homozygous familial hypercholesterolemia, and frequency of these mutation in FH patients in the United Kingdom. *J Lipid Res* 1996; 37: 368-81.
25. Ekstrom U, Abrahamson M, Sveger T, Lombardi P, Nilsson-Ehle P. An efficient screening procedure detecting six novel mutations in the LDL receptor gene in Swedish children with hypercholesterolemia. *Hum Genet* 1995; 96: 147-50.
26. Leren TP, Solberg K, Rodningen OK, Tonstad S, Ose L. Two novel mutations in the EGF precursor homology domain of the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 1995; 96: 241-2.
27. Lelli N, Garuti R, Ghisellini M, Tiozzo R, Rollerli M, Aimale V, Ginocchio E, Naselli A, Bertolini S, Calandra S. Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNAs of the LDL-receptor gene upon a donor splice site mutation that causes familial hypercholesterolemia (FH Benevento). *J Lipid Res* 1995; 36: 1315-24.
28. Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 2306-10.
29. Yieh L, Sanchez HB, Osborne TF. Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6102-6.
30. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic diseases: patterns and predictions. *Hum Genet* 1990; 85: 55-74.

RÉFÉRENCES

31. Spady DK, Dietschy JM. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J Clin Invest* 1988; 81: 300-9.
32. Yokode M, Hammer RE, Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL. Diet-induced hypercholesterolemia in mice: prevention by overproduction of LDL receptor. *Science* 1990; 250: 1273-5.
33. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns D. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor negative mice. *J Clin Invest* 1994; 93: 1885-93.
34. Kroon AA. LDL-apheresis atherosclerosis regression study (LAARS) – Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 93: 1826-35.
35. Gunsalus JR, Brady DA, Coutler SM, Gray BM, Edge ASB. Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogenic hepatocellular transplantation. *Nature Med* 1997; 3: 48-53.
36. Grossman M, Rader DJ, Muller DWM, Kolansky DM, Kozarsky K, Clarck III BJ, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB, Raper SE, Wilson JM. A pilot study of *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med* 1995; 1: 1148-54.
37. Valère T. Thérapie génique : le point sur les essais cliniques. *Med Sci* 1996; 12: 73-83.
38. Li J, Fang B, Eisenmith RC, Chen Li XH, Nasonkin I, Lin-Lee YC, Mims MP, Hughes A, Montgomery CD, Roberts JD, Parker TS. *In vivo* gene therapy for hyperlipidemia: phenotypic correction in Watanabe rabbits by hepatic delivery of the rabbit LDL receptor gene. *J Clin Invest* 1995; 95: 768-73.
39. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Joachim H. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knock-out mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-93.
40. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss III JF, Wilson JM. Effective treatment of familial hypercholesterolemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nature Genet* 1996; 13: 54-62.

Summary

Familial hypercholesterolemia 25 years after. I. LDL receptor defects

In 1973 M. Brown and J. Goldstein demonstrated that autosomal dominant type IIa familial hypercholesterolemia results from mutations in the cell surface receptor that removes LDL from plasma. They coined the disorder familial hypercholesterolemia (FH). Fourteen years later T. Innerarity and co-workers showed that the disease was genetically heterogeneous since it was also associated with defects in the gene coding for apo B. This new molecular entity was called familial defective apolipoprotein B-100 (FDB). Since the initial work of Brown and Goldstein, the LDL receptor gene (*LDLR*) has been cloned and 316 mutations have been identified in FH probands. Only 25 % of these are major rearrangements often involving unequal crossovers between the many repetitive Alu elements of the gene. The computerized analysis of the 220 point mutations contained in our *LDLR*-database shows that these are mostly private and missense. Unexpectedly, only 17 % of the mutations occurred in CpG dinucleotides. Although the mutations are widely distributed throughout the gene, there is a significant excess of mutations identified within exon 4 that encodes three of the seven repeats of the ligand-binding domain. Mutations mostly affect the conserved amino acids located in the COOH-terminal regions of the repeats. The cloning of the *LDLR* gene and its systematic sequencing has also revealed 39 sequence polymorphisms. Only two of these are multiallelic and most display strong linkage disequilibrium. Concurrently, animal models of FH have been identified in which the Watanabe-heritable-hyperlipidemic (WHHL) rabbit is currently the most important. A non-human primate model of FH has been established recently after the identification of a non-sense mutation in the *LDLR* gene in a family of rhesus monkeys. By employing transgenic technology, a mouse strain in which the human *LDLR* gene was introduced has indicated that in mice the unregulated overexpression of LDL receptors can protect against diet-induced hypercholesterolemia. A mouse strain homozygous for a targeted disruption of the *LDLR* gene has developed xanthomas and aortic atherosclerosis only after a very rich lipid diet. Recently, a study of *ex vivo* gene therapy for homozygous FH has demonstrated its feasibility in humans. All the five patients enrolled for this experiment of liver-directed gene therapy have tolerated the procedure well without significant complications, and have shown a persistent transgene expression lasting at least four months after gene therapy. Three of these patients had significant decreases in total cholesterol, LDL and apo B levels, and one of them showed a 53 % increase of the *in vivo* LDL catabolism.

TIRÉS À PART

C. Boileau.