

2m 11. 2600.3

Université de Montréal

Les dyslipidémies héréditaires
chez l'enfant au Québec

par

Juan Carlos Feoli-Fonseca

Département de pédiatrie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Août 1997

©Juan Carlos Feoli-Fonseca, 1997



EUROPE WME

W
4
U58
1998
V.043

Université de Montréal

Les départements de
Géographie et de

1998

Université de Montréal

Université de Montréal

Université de Montréal

Université de Montréal
Université de Montréal
Université de Montréal
Université de Montréal

1998

Université de Montréal



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Les dyslipidémies héréditaires
chez l'enfant au Québec

présenté par:

Juan Carlos Feoli-Fonseca

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mémoire accepté le:.....27-01-1998.....

Sommaire

La maladie coronarienne athéroscléreuse est un problème majeur de santé publique en Amérique du Nord. En particulier, les hyperlipidémies sont des désordres associés à un risque augmenté d'athérosclérose précoce. Les études ont démontré que l'athérosclérose commence dès l'enfance et que les facteurs de risque chez l'enfant, tant génétiques, qu'environnementaux, sont les mêmes que ceux retrouvés de l'adulte. La caractérisation précoce des dyslipidémies est donc essentielle pour leur compréhension, leur traitement et pour la prévention de l'athérosclérose dès l'enfance.

Au Québec, la fréquence de maladies héréditaires du métabolisme des lipides est très élevée, notamment celle de l'hypercholestérolémie familiale (HF) et du déficit en lipase lipoprotéique (LPL). De plus, on retrouve des caractéristiques mutationnelles régionales à ces deux maladies qui en facilite l'identification chez les canadiens français.

Ce mémoire est composé d'études cliniques, biochimiques et moléculaires de trois dyslipidémies retrouvées chez l'enfant au Québec, à savoir: le déficit en LPL, l'hypertriglycéridémie et l'HF.

Le déficit en LPL est une maladie autosomique récessive, associée à une élévation marquée des niveaux plasmatiques des particules riches en triglycérides (TG), notamment des chylomicrons. Le traitement est assuré par une diète pauvre en gras. Des complications sévères comme la pancréatite aiguë peuvent se présenter chez le patient mal contrôlé. Le déficit en apo CII ou la présence d'un inhibiteur circulant peuvent causer un tableau clinique similaire.

Nous avons étudié 18 patients avec une hyperchylomicronémie diagnostiquée avant l'âge d'un an. Chez seize d'entre eux, nous avons trouvé un déficit en LPL. Leur caractérisation clinique, biochimique et moléculaire nous a permis de conclure qu'il existe une grande variabilité dans la présentation au moment du diagnostic de la maladie, qu'il n'existe pas de relation évidente entre le phénotype et le génotype du déficit en LPL parmi les patients homozygotes pour les deux mutations retrouvées, et que la restriction diététique en lipides prévient les complications tout en assurant une croissance normale.

À l'égard des hypertriglycémies sans chylomicronémie, nous avons retrouvé une fréquence de 11.5% chez les patients suivis à notre clinique des lipides de 1987 à 1993. Parmi les facteurs génétiques recherchés, seize (30%) de ces patients avaient une hypercholestérolémie familiale prouvée, tandis que seulement deux étaient porteurs hétérozygotes de la mutation N291S du gène de la LPL. Nous avons aussi mis en évidence une fréquence accrue du génotype apo E 3/4 chez les patients par rapport aux témoins. Une histoire d'hyperlipidémie parentale a été présente chez 90.5% et une histoire familiale d'athérosclérose précoce chez 54.7% des enfants. En général, les enfants hypertriglycémiques ont présenté des valeurs plasmatiques de cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-cholesterol) significativement diminuées par rapport aux témoins. Parmi les causes environnementales, l'hypertriglycémie était associée à une autre pathologie (excluant l'obésité) ou à un traitement médicamenteux chez 15% des malades. Une hypertension artérielle a été trouvée chez 3.8% des cas. L'obésité était souvent associée à l'hypertriglycémie; en effet, 41.5% des patients avaient un indice de masse corporelle > 90^{ième} percentile.

L'HF est une maladie autosomique dominante liée à un risque augmenté d'athérosclérose précoce. L'absence de signes cliniques et la grande variabilité biochimique retrouvée parmi nos patients hypercholestérolémiques ont fait de l'analyse

mutationnelle un outil de diagnostic précis. En effet, nous avons trouvé que 75% des 88 patients étudiés étaient des porteurs hétérozygotes d'une des 8 mutations du gène du récepteur des LDL, responsables de l'HF chez les canadiens français et connues à ce jour. L'acquisition de bonnes habitudes de vie et notamment une bonne alimentation, est fondamentale dans le traitement de l'HF chez l'enfant. Cependant, l'intervention diététique n'a pas suffi à diminuer les valeurs de cholestérol des lipoprotéines de faible densité (LDL-chol) à des niveaux désirables. La réponse à la diète résulte fort probablement de l'interaction du défaut moléculaire de base avec d'autres facteurs génétiques et l'environnement. La clarification de ces interactions nous permettra de mieux établir les facteurs de risque associés à la maladie cardio-vasculaire, et par conséquent, de mieux traiter les enfants hyperlipidémiques. Pour assurer une meilleure survie aux malades, la prévention du processus athéroscléreux doit débiter dès l'enfance.

Table des matières

	page
Sommaire	i
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Chapitre I. Introduction	1
Chapitre II. Revue de la littérature	3
1) Le métabolisme des lipides	3
2) Les dyslipidémies chez l'enfant au Québec	5
A) Le déficit en LPL	6
B) Les hypertriglycéridémies	9
C) L'hypercholestérolémie familiale	13
Chapitre III. Étude: Familial lipoprotein lipase deficiency in infancy: clinical, biochemical and molecular study.	16
Chapitre IV. Étude: Caractérisation clinique, biochimique et moléculaire des enfants hypertriglycéridémiques d'origine canadienne française.	45
Chapitre V. Étude: Familial hypercholesterolemia: molecular, biochemical, and clinical characterization of a French-Canadian pediatric population.	65
Chapitre VI. Étude: Identification of two novel LDL receptor gene defects in French-Canadian pediatric population: mutational analysis and biochemical studies.	74

Discussion générale et conclusion

83

Bibliographie

87

Remerciements

x

Liste des tableaux

	page
Tableau III-1: Clinical characteristics of LPL deficient patients at presentation.	41
Tableau III-2: Biochemical characteristics of LPL deficient patients at presentation.	42
Tableau III-3: Plasma triglyceride concentration of LPL deficient children under dietary treatment with respect to their age.	43
Tableau III-4: Hemoglobin and blood chemistry values during follow-up period.	44
Tableau IV-I: Valeurs des lipides plasmatiques des patients hypertriglycémiques et des contrôles.	55
Tableau IV-II: Valeurs des lipides plasmatiques des patients avec une hypertriglycémie primaire vs une hypertriglycémie secondaire.	56
Tableau IV-III: Fréquence des génotypes de l'apo E chez les patients hypertriglycémiques et les contrôles.	57
Tableau IV-IV: Valeurs des lipides plasmatiques des patients apo E 3/3 et apo E 3/4.	58
Tableau IV-V: Valeurs des lipides plasmatiques des patients avec une HF prouvée comparées à celles des patients sans mutation décelée.	59
Tableau V-1: Characteristics of the study participants.	68
Tableau V-2: Baseline plasma lipid and apolipoprotein levels.	69

Tableau V-3: Percent change in lipid and apolipoprotein levels after dietary intervention.	70
Tableau VI-1: Lipid, lipoprotein, and apoprotein values of study participants.	77
Tableau VI-2: Binding and metabolism of ^{125}I -LDL in fibroblasts of study participants.	78

Liste des figures

	page
Figure III-1: Metabolic response to the dietary treatment for the first 10 days of treatment in 13 infants in whom the data were available.	40
Figure V-1: Distribution of baseline levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B among three groups of hypercholesterolemic children and control subjects.	69
Figure VI-1: Identification of the LDL receptor mutation.	79
Figure VI-2: Pedigree, age, LDL cholesterol and apo B values of patient-1 family members.	79
Figure VI-3: DNA sequence analysis corresponding to exon 8 of mutant LDL receptor gene.	80
Figure VI-4: Pedigree, age, LDL cholesterol, apo B values, and mutation analysis of the LDL receptor gene in family members of patient-2.	80

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
apo	apolipoprotéine
chol	cholestérol
HDL	lipoprotéines de haute densité
HF	hypercholestérolémie familiale
HFC	hyperlipidémie familiale combinée
LDL	lipoprotéines de faible densité
LPL	lipase lipoprotéique
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
TG	triglycérides
VLDL	lipoprotéines de très faible densité
LCAT	lécithine-cholestérol acyltransférase

Chapitre I

Introduction

Les hyperlipidémies sont des maladies souvent associées à un risque augmenté d'athérosclérose précoce. La maladie coronarienne en résultant est un problème majeur de santé publique en Amérique du Nord. Le rôle des lipides et des lipoprotéines plasmatiques dans le développement de l'athérosclérose est maintenant bien établi. Le processus athéroscléreux commence dès l'enfance et ses facteurs de risque tant génétiques qu'environnementaux sont similaires chez l'enfant et chez l'adulte. Les interactions gène-gène et gène-environnement peuvent moduler le phénotype dyslipidémique chez un individu. Ces interactions peuvent aussi expliquer les différences dans l'évolution clinique entre les individus. L'identification des facteurs de risque génétiques et environnementaux associés à l'athérosclérose, et la connaissance de leur effet dans la régulation du métabolisme des lipides pourraient nous permettre de mieux traiter les enfants dyslipidémiques et ainsi prévenir l'athérosclérose précoce.

Au Québec, les fréquences de l'hypercholestérolémie familiale (HF), trait autosomique dominant, et du déficit en lipase lipoprotéique (LPL), trait autosomique récessif, sont plus élevées qu'ailleurs dans le monde. On trouve des caractéristiques mutationnelles régionales à ces deux maladies, ce qui facilite l'identification des sujets atteints, et permet de mieux étudier les répercussions cliniques de ces deux pathologies dans la population canadienne française. De plus, le taux élevé de porteurs hétérozygotes pour un déficit en LPL, ainsi que le polymorphisme de l'apolipoprotéine (apo) E, ont été liés à l'expression phénotypique d'autres hyperlipidémies comme les hypertriglycéridémies et l'hyperlipidémie familiale combinée (HFC).

Dans ce mémoire, nous identifions les facteurs génétiques ainsi que les caractéristiques cliniques et biochimiques de trois dyslipidémies fréquentes dans une population pédiatrique d'origine canadienne française, soit le déficit en LPL chez le nourrisson, les hypertriglycéridémies et l'HF chez l'enfant.

Chapitre II

Revue de la littérature

1) Le métabolisme des lipides

Le cholestérol (chol) et les triglycérides (TG) sont des particules hydrophobes. Le chol est important pour la formation des membranes cellulaires, la synthèse des hormones stéroïdiennes et l'élaboration des acides biliaires. Les TG sont formés par l'association d'une molécule de glycérol et de trois acides gras. Leur hydrolyse est une source importante d'énergie pour la cellule.

Le transport du chol et des TG dans la circulation s'effectue sous forme de lipoprotéines, qui sont des complexes macromoléculaires de lipides avec de protéines. Ces lipoprotéines sont composées d'un noyau hydrophobe d'esters de chol et de TG et d'une surface hydrophile formée de phospholipides, de chol libre et d'apolipoprotéines. Les lipoprotéines sont divisées en catégories selon la densité déterminée par ultracentrifugation. De la particule la moins dense à la plus dense, nous retrouvons les chylomicrons, les lipoprotéines à très faible densité (VLDL), les lipoprotéines à densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines à faible densité (LDL), les lipoprotéines à haute densité (HDL) et la lipoprotéine (a). La lipoprotéine (a) est une particule de taille et de composition similaires à celles des LDL (densité 1.04-1.125 g/ml) Chaque catégorie diffère par des propriétés physico-chimiques et la composition lipidique et protéique. Elles sont synthétisées dans l'intestin et/ou dans le foie (Havel et Kane,1995).

Les apolipoprotéines sont les protéines de la surface hydrophile des lipoprotéines. Elles servent d'éléments structuraux des lipoprotéines et elles peuvent inhiber ou servir de

cofacteur à des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique. De par leur solubilité en milieu aqueux, elles peuvent être échangées entre les différentes lipoprotéines. Finalement, certaines apoprotéines peuvent servir de ligands pour les récepteurs spécifiques.

Trois enzymes jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique: la LPL, la lipase hépatique et la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT). La LPL est synthétisée par les cellules parenchymateuses de plusieurs tissus, principalement le tissu adipeux et le muscle. Elle est sécrétée et transportée à la surface endothéliale des capillaires sanguins où elle est liée par des ligands d'héparan sulfate. La LPL est l'enzyme responsable de l'hydrolyse des TG renfermés dans les chylomicrons et les VLDL, l'apo CII étant son cofacteur. La lipase hépatique est synthétisée par les hépatocytes d'où elle est transportée à la surface des cellules endothéliales hépatiques. Elle a comme rôle d'hydrolyser les TG des résidus de VLDL et des IDL permettant la formation des LDL. Elle est également impliquée dans l'hydrolyse des phospholipides et des TG des HDL. La LCAT est synthétisée dans les hépatocytes et sécrétée dans la circulation où elle est responsable de la formation des esters de chol des lipoprotéines plasmatiques, spécifiquement des HDL. L'apo AI est le cofacteur de la LCAT. La protéine de transport des esters de cholestérol (CETP) est la responsable du transfert des esters de chol vers les LDL, mais aussi vers les VLDL et les HDL. L'action conjointe de la LCAT des HDL et le CETP permet le transport à rebours du chol vers les hépatocytes, réalisé par les HDL (Fielding, 1990).

Dans le processus d'absorption, les TG et les esters de chol sont intégrés aux chylomicrons à l'intérieur des cellules intestinales. Ces chylomicrons sont sécrétés et transportés via les voies lymphatiques jusqu'aux vaisseaux sanguins où les TG sont hydrolysés par la LPL. Les résidus de chylomicrons qui résultent de l'hydrolyse sont transférés à la cellule hépatique grâce à des récepteurs de surface spécifiques liant l'apo E.

Les VLDL produites par le foie contiennent, entre autres apolipoprotéines, l'apo B-100 et elles sont riches en TG. Les phospholipides et les TG des VLDL sont hydrolysés par la LPL et la lipase hépatique pour aboutir à la formation des LDL. Les LDL sont les transporteurs par excellence du chol plasmatique et peuvent être catabolisées par différents tissus, principalement le foie. Le récepteur des LDL est le responsable de l'endocytose de ces particules en utilisant l'apo B 100 comme ligand. L'augmentation du chol libre intrahépatocytaire inhibe la synthèse du récepteur des LDL et l'activité de l'enzyme 3-hydroxy 3-méthyl glutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase, enzyme qui catalyse l'étape limitante dans la synthèse endogène du chol. Par contre, le chol libre augmente l'activité de la LCAT qui piège les esters de chol dans le cytosol. Ces effets contrôlent la concentration intracellulaire du chol.

Les HDL sont sécrétées par le foie et par l'intestin ayant pour apolipoprotéines principales l'apo AI et l'apo AII (Tall, 1990). Un des rôles métaboliques importants des HDL est le transport à rebours du chol vers les hépatocytes.

2) Les dyslipidémies chez l'enfant au Québec

Les perturbations du métabolisme des lipides ont des causes diverses. Celles-ci se divisent en deux groupes: les dyslipidémies primaires qui sont d'ordre génétique et les dyslipidémies secondaires. Ces dernières sont liées à des habitudes de vie comme l'ingestion d'alcool, le tabac, l'obésité, la prise de médicaments et de certaines hormones, ou à la présence d'une pathologie associée à une perturbation du métabolisme lipidique.

Parmi les dyslipidémies primaires, deux sont particulièrement fréquentes au Québec: le déficit en LPL, responsable de l'hyperchylomicronémie de type I et

l'hypercholestérolémie familiale. Ces deux pathologies sont souvent retrouvées chez les patients pédiatriques suivis à la clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine. Un troisième groupe de patients présente une hypertriglycéridémie associée ou non à une hypercholestérolémie.

A) Le déficit en LPL

La LPL (EC 3.11.34) est une enzyme glycoprotéinique de forme dimérique qui se trouve liée à l'endothélium des vaisseaux sanguins des tissus extrahépatiques par l'interaction ionique avec l'héparan sulfate (Brunzell, 1995). La LPL, en association avec l'apo CII, son cofacteur (Breckenridge et coll, 1978), hydrolyse les TG transportés par les chylomicrons et les VLDL. Les acides gras libres ainsi produits sont utilisés par les tissus comme source d'énergie ou bien re-estérifiés et entreposés dans le tissu adipeux. Par conséquent, la LPL joue un rôle clé dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG et dans la production de lipoprotéines de plus petite taille, de même que dans la distribution énergétique des acides gras dans les différents tissus. La LPL serait aussi capable de se lier aux résidus de chylomicrons et d'augmenter leur endocytose hépatique, en facilitant la liaison de l'apo E des lipoprotéines au récepteur spécifique des résidus (Beisiegel et coll, 1991).

Le déficit en LPL est une maladie autosomique récessive qui se caractérise par une chylomicronémie très importante. Dès la très jeune enfance, les malades peuvent se présenter avec des crises de douleurs abdominales, des pancréatites aiguës à répétition, une hépatosplénomégalie, une lipémie rétinienne et des xanthomes éruptifs. Occasionnellement, leur découverte se fait de façon fortuite suite à l'observation d'un échantillon de sang lactescent. Le "syndrome hyperchylomicronémique" est défini par la

présence d'au moins un symptôme accompagné d'une hypertriglycéridémie à jeun de plus que 22 mmol/L (Brunzell, 1995). Cependant, des concentrations moindres sont acceptées (Julien, 1992).

Le gène de la LPL est localisé sur le chromosome 8 et il est composé de 10 exons et de 9 introns, s'étendant sur une longueur de 30 kb et codant pour une protéine de 448 acides aminés (Deeb et Peng, 1989). Quelques 60 mutations de ce gène, la plupart des mutations ponctuelles faux sens, sont responsables du déficit en LPL. Le déficit en apo CII ou la présence d'un inhibiteur circulant peuvent causer un tableau clinique similaire (Breckenridge et coll, 1978. Brunzell et coll, 1984).

Le diagnostic d'un déficit homozygote en LPL repose sur la démonstration de l'absence ou la réduction importante d'activité enzymatique dans le tissu adipeux et dans le plasma, après l'injection d'héparine (Krauss et coll, 1974). Avec le développement des techniques moléculaires, le diagnostic peut s'effectuer par la mise en évidence de mutations des deux allèles du gène de la LPL ou de l'apo CII.

Le seul traitement disponible consiste à limiter l'apport alimentaire en gras à 10 - 15 % de l'apport calorique, afin d'obtenir une triglycéridémie aux alentours de 10 mmol/L. Ce traitement diététique permet d'éviter les crises de douleurs abdominales et les pancréatites (Gagné et Gaudet, 1995. Foubert et coll, 1996). L'ajout de triglycérides à chaîne moyenne au régime permet de compenser quelque peu le déficit calorique, sans toutefois affecter la triglycéridémie.

Au Québec, nous trouvons la fréquence mondiale la plus élevée du déficit en LPL homozygote. Chez les canadiens français, la fréquence des porteurs hétérozygotes est de l'ordre de 1/139, et peut être aussi élevée que 1/40 dans certaines régions (Gagné et coll,

1989. Dionne et coll, 1993). Dû à un effet fondateur (Wood et coll, 1993), 3 mutations faux sens sont responsables de 97% des allèles mutés retrouvés chez les patients d'origine canadienne française déficients en LPL (Monsalve et coll, 1990. Ma et coll, 1991. Ma et coll, 1992). La substitution d'une proline par une leucine au résidu 207 (P207L) est responsable de 73% des allèles mutés, tandis que la substitution d'une glycine par un acide glutamique au résidu 188 (G188E) est responsable de 21.6% des allèles mutés. Une troisième substitution, celle de l'acide aspartique par une asparagine au résidu 250 (D250N) est responsable de 2.7% des allèles mutés. Plus récemment, une autre mutation, la substitution d'une asparagine par une sérine au résidu 291 (N291S), a été associée à un déficit modéré du catabolisme enzymatique (Ma et coll, 1993) et retrouvée dans 8 des 19 allèles mutés chez 16 canadiens français avec une hypertriglycémie de type IV (Minnich et coll, 1995).

Auparavant, le déficit en LPL était considéré comme non associé à l'athérosclérose athérogène. Cette conclusion s'appuyait sur des résultats d'autopsie faites chez des jeunes patients décédés et porteurs d'un déficit en LPL (de Gennes et coll, 1972). L'hypothèse invoquait d'une part la difficulté des chylomicrons à pénétrer la barrière endothéliale à cause de leur grande taille, et d'autre part les faibles concentrations de LDL-chol et autres particules athérogènes chez ces patients. Cependant, Benlian et coll (Benlian et coll, 1996) ont récemment démontré la présence d'athérosclérose périphérique et coronarienne chez 4 patients de moins de 55 ans avec un déficit en LPL.

L'état hétérozygote pour le déficit en LPL a été associé au développement d'une hyperlipidémie modulée par l'âge, l'obésité, l'hyperinsulinisme ou l'utilisation de médicaments qui perturbent les lipides (Babirak et coll, 1989. Wilson et coll, 1990. Miesenböck et coll, 1993). De plus, une incidence élevée de maladie coronarienne a été

observée chez les hétérozygotes obligatoires des familles de patients homozygotes (Gagné et coll, 1977).

Nous avons révisé 268 cas de déficit en LPL décrits dans la littérature. Parmi ceux-ci 24.8% des patients ont été identifiés avant l'âge de 1 an. Le diagnostic précoce de cette maladie et l'initiation précoce de l'intervention diététique permettent de contrôler les niveaux de TG chez ces patients. Ainsi, les complications telles que la pancréatite aiguë (pathologie parfois mortelle) peuvent être évitées. Ce mémoire inclut l'étude regroupant 18 nourrissons, âgés de moins d'un an, qui se sont présentés avec une hyperchylomicronémie > 10 mmol/L. Seize d'entre eux avaient des déficits en LPL prouvés. Au mieux de nos connaissances, il s'agit de la plus grande cohorte étudiée dans cette tranche d'âge.

B) Les hypertriglycéridémies

Plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre l'hypertriglycéridémie et le risque augmenté de maladie coronarienne (Brown, 1969. Carlson et coll, 1972. Brunner et coll, 1977. Carlson et coll, 1979). Ces études concernaient autant l'homme que la femme et touchaient particulièrement les patients diabétiques non insulino-dépendants et les survivants à infarctus du myocarde. Bien que les valeurs plasmatiques de chol-total, LDL-chol et HDL-chol soient en relation linéaire (positive ou négative selon le cas) avec le risque de développer une maladie coronarienne, tel n'est pas le cas pour les valeurs plasmatiques de TG. En effet, les études multi-variées tenant compte des valeurs plasmatiques de chol-total et de HDL-chol ont démontré que la corrélation des valeurs de TG avec le risque de maladie cardiovasculaire est moindre (Heyden et coll, 1980. Hulley et coll, 1980). Ces observations nous suggèrent que le risque augmenté de maladie

coronarienne chez les patients hypertriglycéridémiques est dû non seulement à l'accumulation des particules riches en TG mais aussi à son association avec d'autres facteurs de risque tels que les valeurs abaissées de HDL-chol (Davis et coll, 1991). En effet, il existe une relation étroite entre le métabolisme des particules riches en TG, telles que les chylomicrons et les VLDL, et le métabolisme des HDL.

Les pathologies qui s'accompagnent d'une hypertriglycéridémie sont nombreuses et peuvent être de types primaires ou secondaires. D'après Assmann et Brewer (Assmann et Brewer, 1991), les formes primaires ou génétiques sont:

i) l'hyperchylomicronémie ou hyperlipoprotéinémie de type I due à une homozygotie pour un déficit en LPL, en apo CII ou à la présence d'un inhibiteur circulant.

ii) l'hyperlipoprotéinémie de type V qui se caractérise par des valeurs élevées des TG des VLDL et un risque augmenté de maladie coronarienne, sans identification du défaut de base.

iii) le déficit en lipase hépatique ou hyperalphatriglycéridémie, qui se caractérise par une augmentation importante des TG dans les HDL et une accumulation plasmatique des résidus de VLDL. Il est associé à un risque augmenté de maladie cardiovasculaire.

iv) l'hyperlipoprotéinémie de type III ou dysbêtalipoprotéinémie qui survient par un défaut de liaison de l'apo E aux récepteurs des résidus des chylomicrons et des VLDL. Elle est associée avec l'homozygotie pour l'isoforme d'apo E 2, ou à des mutations dans le gène de l'apo E. Bien que la presque totalité des patients avec une hyperlipoprotéinémie de type III sont homozygotes pour l'isoforme d'apo E 2, seulement 2% de ceux-ci développent la maladie. Elle est associée à un risque augmenté de maladie cardiovasculaire.

v) l'hypertriglycéridémie familiale qui se caractérise par une surproduction de VLDL. Elle est de présentation autosomique dominante et non liée à d'autres

dyslipidémies. Il y a, cependant, une résistance à l'insuline associée ainsi que le risque augmenté de maladie cardiovasculaire.

vi) l'hyperlipidémie familiale combinée est caractérisée par une augmentation des TG, du chol ou des deux. Cette variation phénotypique se retrouve tant chez les membres hyperlipémiques d'une même famille que chez le patient lui même, à travers le temps. C'est une maladie autosomique dominante avec un risque augmenté d'athérosclérose précoce. Elle est responsable de 15% des dyslipidémies chez les patients avec une maladie coronarienne. Le défaut moléculaire n'est pas connu et une augmentation de la synthèse hépatique de l'apo B a été suggérée (Sniderman et coll, 1982).

vii) l'hypertriglycéridémie des syndromes déficitaires en HDL, avec une légère augmentation des TG qui contraste avec les valeurs très abaissées de HDL, comme la maladie de Tangier, les déficits en LCAT et les déficits en apo AI.

viii) l'hypertension dyslipidémique familiale, caractérisée par l'association de perturbations des valeurs de TG, de chol et de HDL-chol avec une hypertension familiale qui débute avant l'âge de 60 ans. Dans le "syndrome X" nous retrouvons de plus une résistance à l'insuline associée.

Les formes secondaires d'hypertriglycéridémie regroupent tous les facteurs environnementaux qui perturbent les valeurs de TG. Des facteurs métaboliques, hormonaux, nutritionnels, médicamenteux ainsi que l'effet de certaines maladies sont associés à ces formes d'hypertriglycéridémies (Mancini et coll, 1991):

i) d'origine métabolique:

- le diabète
- la dysthyroïdie
- la ménopause
- l'obésité
- la lipoatrophie

- l'hyperuricémie
- la glycogénose de type I

ii) d'origine nutritionnelle:

- la surcharge alimentaire à l'origine de l'obésité
- l'ingestion de fructose associée à une résistance à l'insuline
- l'ingestion d'alcool

iii) d'origine pathologique:

- le syndrome néphrotique
- le lupus érythémateux
- le myélome

iv) d'origine médicamenteuse:

- les diurétiques thiazidiques et la chlorthalidone
- les bêtabloquants
- les stéroïdes
- les rétinoïdes
- les hormones (hormonothérapie de remplacement, contraceptifs oraux,

anabolisants)

L'énumération seule des causes primaires et secondaires d'hypertriglycéridémie nous montre la complexité dans l'approche de ces dyslipidémies. Dans ce mémoire, nous avons entrepris l'étude des caractéristiques cliniques, biochimiques et moléculaires des enfants d'origine canadienne française chez lesquels on retrouvait une hypertriglycéridémie. Le but de cette étude était de mieux comprendre l'étiologie et les interactions des différents facteurs impliqués, afin d'offrir une approche préventive contre les facteurs associés au risque de la maladie coronarienne et un traitement plus efficace.

C) L'hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie autosomique dominante due à un défaut du récepteur des LDL (Goldstein et Brown, 1974) et associée à un risque élevé de maladie cardiovasculaire précoce (Slack, 1969). Décrite initialement par Fredrickson et Lees (Fredrickson et Lees, 1965), elle est cliniquement caractérisée par une augmentation du LDL-cholesterol plasmatique, et par des dépôts de cholestérol dérivé des LDL dans les tendons et la peau (xanthomes) ainsi que dans les artères (athéromes). Également, elle est caractérisée par un effet de dosage génétique, c'est à dire que les homozygotes sont plus sévèrement atteints que les hétérozygotes (Goldstein et coll, 1995).

La fréquence mondiale d'hétérozygotes est de 1/500 ce qui fait de l'HF la maladie métabolique héréditaire la plus fréquente. Il y a une augmentation du cholestérol plasmatique dès la naissance suivie d'un développement de xanthomes tendineux au cours de la vingtaine. Ensuite, l'athérosclérose coronarienne peut être décelée au cours de la trentaine. Chez l'homozygote, l'hypercholestérolémie est très sévère et les xanthomes, de même que la maladie coronarienne, apparaissent généralement dès l'enfance. La mort peut survenir avant l'âge de 20 ans, causée par un infarctus du myocarde (Goldstein, 1972). Au Québec, dû à un effet fondateur, la fréquence d'HF est de 1/270, soit deux fois plus élevée qu'ailleurs dans le monde.

Le défaut primaire de l'HF est une mutation du gène du récepteur des LDL. Localisé sur le bras court du chromosome 19, ce gène, composé de 18 exons et 17 introns s'étendant sur une longueur de 45 kb, code pour une glycoprotéine de 839 acides aminés (Südhof et coll, 1985). Le récepteur est localisé à la surface des cellules du foie et celles d'autres organes. Il se lie aux LDL par son ligand, l'apo B-100 (Brown et Goldstein, 1983), et facilite l'endocytose des LDL qui sont transportées aux lysosomes afin d'être

dégradées, libérant ainsi du chol pour l'utilisation cellulaire. Le déficit du récepteur génère un excès du chol des LDL plasmatiques qui va se déposer dans les macrophages pour produire des xanthomes et des athéromes.

Il y a plus de 300 mutations du gène du récepteur des LDL décrites (Day et Humphries, 1996). Au Québec, 5 mutations sont responsables de 97% des allèles mutés (58/60) chez 30 patients homozygotes (Moorjani et coll, 1993), ainsi que de 80.8% des cas chez 343 enfants hétérozygotes d'origine canadienne française (Simard et coll, 1994). Ces mutations sont: la grande délétion de > 15 kb (Hobbs et coll, 1987); la délétion de 5 kb (Ma et coll, 1989); et les mutations faux sens W66G, E207K et C646Y (Lietersdorf et coll, 1990). Plus récemment, 3 autres mutations ont été décrites chez des canadiens français: la mutation non sens Y468X (Simard et coll, 1994); et les 2 mutations découvertes par notre équipe, la duplication de 7 pb, 681ins7, et la mutation faux sens Y354C (Assouline et coll, 1997).

Dans la population pédiatrique, les manifestations cliniques d'une HF hétérozygote sont rares, sinon inexistantes (Kwiterovich et coll, 1974), bien que le processus athérosclérotique commence dès l'enfance. La détection précoce de la maladie va donc permettre à l'individu de bénéficier d'une prévention des conséquences de la maladie coronarienne athéroscléreuse. Il en décompte que tout enfant ou adolescent ayant une histoire familiale d'athérosclérose précoce ou d'hyperlipidémie parentale devrait être soumis au dépistage d'une dyslipidémie. Également, il est nécessaire de tenir compte des autres facteurs de risque associés à l'athérosclérose, tels que le tabagisme, l'hypertension, les taux abaissés de HDL-chol, l'obésité, le diabète et l'inactivité physique (National Cholesterol Education Program, 1992).

La première étape dans la prise en charge d'une HF est le contrôle des facteurs de risque sujets à modification (tabagisme, inactivité, obésité) et l'intervention nutritionnelle. Le régime recommandé doit assurer un apport énergétique et nutritionnel adéquat pour maintenir la croissance. La diète est restreinte à 30% de l'apport énergétique sous forme de graisses dont moins de 10% sous forme saturée. L'apport total de chol alimentaire doit être inférieur à 300 mg/jour. Le but de cette intervention est de diminuer les niveaux de LDL-chol en deçà de 3.36 mmol/L (National Cholesterol Education Program, 1992).

Dans le cas d'une HF, un suivi médical s'avère nécessaire durant toute la vie. Dans ce sens, un diagnostic précis de la maladie s'impose. Les critères cliniques et biochimiques sont très utiles, mais c'est la démonstration du défaut génique qui nous donne l'ultime diagnostic. Deux études sur l'HF hétérozygote chez l'enfant d'origine canadienne française effectuées par notre équipe sont incluses dans ce mémoire. La première étude porte sur la caractérisation clinique, biochimique et moléculaire de 88 enfants hypercholestérolémiques, tandis que la deuxième étude s'intéresse à l'identification de deux nouvelles mutations du gène du récepteur des LDL découvertes chez deux de nos patients.

Chapitre III

Familial lipoprotein lipase deficiency in infancy: clinical, biochemical and molecular study.

Étude dont le sujet a fait l'objet d'un article soumis pour publication. L'article, dont je suis l'auteur principal, est incorporé ici sous forme du manuscrit soumis à l'éditeur.

**FAMILIAL LIPOPROTEIN LIPASE DEFICIENCY IN INFANCY: CLINICAL,
BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDY**

Juan Carlos Feoli-Fonseca, M.D., Emile Lévy, Ph.D.* , Muriel Godard, R.D.°,
and Marie Lambert, M.D.

From the Medical Genetics and Gastroenterology* Services, Department of Pediatrics,
and the Clinical Nutrition Service°,
St.-Justine Hospital, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence and reprint requests to:
Marie Lambert, M.D.
Service de génétique médicale
Hôpital Sainte-Justine
3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec) Canada H3T 1C5
Tel: (514) 345-4727
Fax: (514) 345-4766
e-mail: lamberma@ere.umontreal.ca

KEY WORDS: chylomicronemia, triglycerides, children, dietary treatment, mutation

This work was supported in part by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Réseau FRSQ/Hydro-Québec) and the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. It was presented in part at the annual meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, October 1993.

ABSTRACT

Objectives: Familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency is an inherited recessive disorder of lipid metabolism with acute pancreatitis as major complication. Its treatment is severe dietary fat restriction. The objectives of the present study were to describe the clinical and biochemical features of LPL-deficient patients presenting in infancy, to evaluate the safety and efficacy of our dietary intervention, and to define the LPL gene defects responsible for the disease in our study population.

Methods: French-Canadian children less than 1 year of age who presented with chylomicronemia at Hôpital Sainte-Justine between 1972 and 1995 were identified and their clinical courses reviewed retrospectively. LPL gene mutation analysis was undertaken.

Results: A primary LPL enzyme deficiency was demonstrated in 16 infants who presented with irritability (n=7), lower intestinal bleeding (n=2), pallor, anemia or splenomegaly (n=5) and a positive family history or fortuitous discovery (n=2). Eleven of these 16 patients had at least 1 of the following signs at presentation: hepatomegaly (n=7), splenomegaly (n=6), lipemia retinalis (n=5), and eruptive xanthomas (n=3). All plasma samples were lactescent at presentation. Mutation analysis was performed in 13 cases: 8 were homozygous for the P207L mutation, 3 were homozygous for the G188E mutation, and 2 were compound P207L/G188E heterozygotes. No genotype-phenotype relationship was detected. Chylomicronemia responded rapidly to dietary fat restriction, and it was possible to maintain satisfactory metabolic control for a prolonged period of time. During a combined follow-up period of 132 year-patients, only 1 adolescent girl had an episode of acute pancreatitis associated with usage of oral contraceptives. No persistent adverse effects on weight gain or linear growth were seen. However, we obtained abnormal values for serum iron, alkaline phosphatase and total calcium.

Conclusions: The clinical presentation of familial LPL deficiency is heterogeneous during infancy. Lower intestinal bleeding may be a complication of LPL deficiency during infancy. Dietary intervention was efficient in preventing acute pancreatitis. Close dietary monitoring is needed to avoid nutritional deficiencies. Estrogen therapy should be avoided in LPL-deficient patients.

LIST OF ABBREVIATIONS

LPL	lipoprotein lipase
P207L	leucine for proline substitution at LPL residue 207
G188E	glutamic acid for glycine substitution at LPL residue 188
D250N	asparagine for aspartic acid substitution at LPL residue 250

INTRODUCTION

Familial chylomicronemia, a rare autosomal recessive disorder characterized by massive accumulation of chylomicrons in plasma with a corresponding increase of triglyceride concentration, is due to defective plasma lipoprotein lipase (LPL) enzyme activity. LPL (EC 3.1.1.34), which requires apolipoprotein CII as a cofactor, hydrolyses the triglycerides of chylomicrons and very low density lipoproteins, thereby releasing free fatty acids for uptake into different tissues where they can either be used as fuel or re-esterified for storage. Thus, the enzyme plays a key role in the metabolism of large triglyceride-rich lipoproteins to smaller particles and determines the distribution of energy from fatty acids among various tissues (1).

Patients with familial LPL deficiency usually present in infancy or childhood with episodes of abdominal pain, recurrent attacks of acute pancreatitis, hepatosplenomegaly, lipemia retinalis or eruptive xanthomas. Occasionally, they remain asymptomatic. Often, the initial clue leading to diagnosis is the observation of lactescent plasma. The diagnosis is confirmed by low or undetectable LPL activity in post-heparin plasma or in biopsies of adipose tissue. Alternatively, the diagnosis can be confirmed by the demonstration of a structural defect in the LPL gene which extends over 30 kb and contains 10 exons. Rarely familial chylomicronemia is due to apolipoprotein CII deficiency or to familial inhibitor of LPL activity. Treatment of patients with familial LPL deficiency requires severe limitation of fat intake. Medium-chain triglycerides can be used for cooking, since they are absorbed in the portal vein without being incorporated in chylomicron triglycerides. Additional measures are avoidance of agents known to increase plasma triglycerides, such as alcohol, estrogens, steroids, isotretinoin and others. The main complication of familial LPL deficiency is recurrent pancreatitis which may threaten the patient's life.

While the reported frequency of familial LPL deficiency is low at about 1 per million population in most western countries, it has been estimated at 1 per 80,000

in French Canadians from the province of Quebec (2). In 37 apparently unrelated French-Canadian patients with LPL deficiency, 3 missense mutations accounted for 97% (72/74) of mutant LPL alleles (P207L: 73%; G188E: 21%; D250N: 3%) (3-5), allowing for easy molecular diagnosis of this disease in this specific population.

We undertook a retrospective study of 18 French-Canadian children who presented with chylomicronemia during their first year of life; 16 of them were found to have LPL enzyme deficiency. To the best of our knowledge, no large long-term studies of patients in this age-group have been published so far. Therefore, our objectives were to describe the clinical and biochemical features of familial LPL deficiency presenting in infancy, to evaluate the safety and efficacy of our dietary intervention, to assess the frequency of complications associated with this metabolic disorder, to define the LPL gene defect(s) responsible for the disease in our patients, and to investigate the possibility of a genotype-phenotype relationship.

METHODS

Subject

We reviewed the charts of all patients with chylomicronemia who attended the lipid clinic of Hôpital Sainte-Justine between 1972 and 1995. The criteria for inclusion in our study were as follows: presentation before 1 year of age, French-Canadian ancestry, and initial plasma triglyceride concentration above 10 mmol/L. In total, 18 patients were selected. The initial biochemical data were the first available results of the presenting episode; most of these measurements were done in a referring hospital. Thereafter, most biochemical analyses were performed at Hôpital Sainte-Justine. To describe the chronic metabolic control of our children under dietary treatment, we compiled plasma triglyceride data obtained during the follow-up period starting with the first available measurement after the initial hospital discharge; when multiple values were generated during a single month, the

earliest value was used. To retrospectively assess the safety of the dietary treatment, we compiled available weight and height data during the follow-up period as well as hemoglobin levels and blood chemistry values of iron, alkaline phosphatase, total calcium, red blood cell folate and albumin.

Dietary intervention was started in hospital. The infants were first given an electrolyte solution intravenously or orally according to their clinical condition. Usually, after 48 to 72 h, over a period of a few days, we progressively re-introduced fats using a special formula to reach a level of 5 to 7% of energy as long-chain triglycerides. Vivonex T.E.N. (Sandoz Nutrition Corporation, Whitby, ON) or Tolerex (Sandoz Nutrition Corporation) containing 1.3% of energy as long-chain triglycerides was given first. Then, we used Portagen (Mead Johnson, Bristol-Myers Squibb Canada Inc., Ottawa, ON) or Lipisorb (Mead Johnson, Bristol-Myers Squibb Canada Inc.) containing 5.6% of energy as long-chain triglycerides. The infants were discharged as soon as they were clinically stable. Solid foods, including cereals, vegetables and fruits, were added after 4 months of age. At 1 year of age, the special formula was replaced by skim milk; lean protein foods such as poultry or fish, legumes and very-low-fat dairy products were added progressively according to individual tolerance. MCT oil (Mead Johnson, Bristol-Myers Squibb Canada Inc.) was used by some patients. Vitamins, calcium and iron were prescribed as needed. Close monitoring by the same dietitian over the entire follow-up period was done. Completion of a 3-day dietary record was requested at each clinic visit. The goals of our nutrition support were to keep fasting plasma triglyceride concentration below 10 mmol/L, to support a normal growth rate and to maintain normal nutritional status. In all our patients, to achieve adequate metabolic control, we had to prescribe a diet providing at most 10% of energy as long-chain triglycerides.

Biochemical analyses

Blood samples were collected in 1 mg/ml EDTA after a 10-12 h overnight fast except in children younger than 1 year where the fasting period could have been shorter. Total cholesterol and triglycerides were determined enzymatically with a commercial kit (Boehringer Mannheim, Montreal, QC). To assay lipolytic activities, heparin was injected intravenously (10 units/kg body weight), and blood was taken before and 10 min after the injection (6,7). Total lipolytic activity was measured in plasma with an emulsion of tri[1-¹⁴C] oleoylglycerol as substrate (8). Hepatic lipase was quantified in the presence of protamine sulfate, and LPL activity was calculated as the difference between total lipase activity and hepatic lipase activity. Free fatty acids were extracted according to Belfrage and Vaughan (9)

Molecular analyses

Genomic DNA was prepared from white blood cells as described earlier (10). The methods for point mutation detection were as follows: G188E in exon 5 of the LPL gene was detected after PCR amplification of exon 5 and digestion of the amplification product with the enzyme AvaII (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) (3). P207L in the LPL gene was screened by mismatch PCR amplification of exon 5 creating a restriction site for the enzyme DdeI (Gibco BRL, Life Technologies Inc.) in the mutant allele (11) D250N in exon 6 of the LPL gene was identified after PCR amplification of exon 6 and digestion of the amplification product with TaqI (Gibco BRL, Life Technologies Inc.); the presence of the mutation abolishes a restriction site for TaqI (5).

RESULTS

We studied a total of 18 French-Canadian children, 10 girls and 8 boys, presenting with chylomicronemia before 1 year of age (range: 3 days to 6 months). A primary LPL enzyme deficiency was demonstrated by enzyme activity measurement and/or mutation analysis in 16 of them (Tables 1 and 2). One of the remaining 2 patients had portal hypertension and his hyperlipidemia was considered secondary to hepatic dysfunction. The etiology of persistent chylomicronemia is still unknown in the second patient since he had normal LPL activity, a normal amount of apolipoprotein CII immunoreactive protein and none of the 3 common LPL gene mutations.

Table 1 shows the clinical characteristics of the 16 LPL-deficient patients at presentation. In 7 of them (S2, S3, S5, S7, S9, S10, S15), the main symptom that led parents to seek medical attention for their infant was irritability with or without fever, vomiting or diarrhea. Four of these children (S2, S7, S9, S15) had a complete septic work-up including a lumbar puncture which revealed negative results in all 4 cases. Two of these 7 patients (S3, S15) had prominent abdominal tenderness on physical examination. S3 underwent an exploratory laparotomy which demonstrated ascites but no other abnormality; his serum amylase concentration and abdominal ultrasound, done 5 and 7 days after the acute episode respectively, were normal. Serum amylase level during the acute episode in S15 was also normal. All 7 patients improved rapidly upon cessation of oral intake and institution of intravenous hydration.

Two patients (S8, S13) presented with lower intestinal bleeding. Plain abdominal X-ray and barium enema were normal in S8; her stool cultures were negative. No gastrointestinal evaluation was done in S13. These 2 infants demonstrated the highest triglyceride concentrations at diagnosis among our group of patients; their values were 482 and 460 mmol/L, respectively (Table 2). Upon

initiation of treatment, intestinal bleeding stopped within 2 days in S8 and within 5 days in S13.

The initial complaint was pallor in 3 cases (S1, S6, S16) and 1 was referred for anemia (S12). Hemoglobin was below 95 g/L in 10 of the 14 infants for whom this result was available (S2, S3, S5, S6, S7, S8, S10, S12, S13, S16); 4 of them received blood transfusion (S3, S5, S13, S16) (Table 2). S6 had a red blood cell mean corpuscular volume of 77 fl and low serum iron concentration; the remaining 9 patients had normal mean corpuscular volume (84 to 96 fl). S16 had a normal bone marrow examination. As mentioned before, S8 and S13 had lower intestinal bleeding. In 7 infants (S2, S3, S7, S10, S12, S13, S16), hemoglobin values were available a few months after the initial episode and all showed increased levels.

A positive family history in S11 led to her screening for chylomicronemia during the neonatal period. Chylomicronemia was an incidental finding during an investigation for possible seizures in S14. Finally, S4 was referred for evaluation of splenomegaly.

Hepatomegaly, splenomegaly, eruptive xanthomas and lipemia retinalis are signs frequently associated with untreated LPL deficiency. Eleven of our 16 patients showed at least 1 of these signs at presentation (Table 1). Hepatomegaly was found in 7 infants, splenomegaly in 6, lipemia retinalis in 5 and eruptive xanthomas in 3.

All plasma samples were lactescent at presentation. Initial triglyceride concentrations ranged from 15.41 to 482 mmol/L and total cholesterol levels from 4.26 to 32.17 mmol/L (Table 2). In 7 cases (S1, S4, S5, S9, S10, S12, S15), lactescent plasma and/or high triglyceride concentrations were noted before the presenting episode, but investigation was not pursued further owing to delay in treatment ranging from 16 days (S15) to 5 months (S4) (Table 1). Natremia below 130 mmol/L was reported in 3 patients (S3, S9, S15) (Table 2).

Mutational analysis was performed in 13 cases (26 alleles) showing the following allele distribution: P207L, 69% (18/26) and G188E, 31% (8/26). No D250N mutation was found. Eight infants were homozygous for the P207L mutation, 3 were homozygous for the G188E mutation and 2 were compound heterozygotes. DNA was not available for analysis in 3 subjects (Table 2). We could not establish any phenotype-genotype relationship. However, the small number of cases in each group greatly limited our analysis. Median age at presentation was 72 days in the HMZ P207L group and 53 days in the HMZ G188E group. The median plasma triglyceride concentration at presentation was 56.09 mmol/L in the HMZ P207L group and 64.12 mmol/L in the HMZ G188E group whereas the mean of median plasma triglyceride levels of HMZ P207L subjects for the treatment period <1 year of age was 6.75 mmol/L and that of HMZ G188E subjects for the same treatment period was 7.17 mmol/L.

Figure 1 shows the initial response to dietary treatment. Twelve of the 13 infants in whom these data were available demonstrated plasma triglyceride concentrations below 10 mmol/L within 9 days of treatment or less. S13 reached this level after 11 days of treatment. To study the effect of chronic dietary intervention on lipid levels, we compiled plasma triglyceride data for each patient during the follow-up period. Table 3 presents median and range of these plasma triglyceride levels with respect to age. The median duration of follow-up was 6.76 years (range: 0.06 to 18.98). During this follow-up period (132.01 year-patients), 2 children (S3, S14) had abdominal pain requiring hospitalization and another (S9) had a documented episode of acute pancreatitis 2 months after the introduction of an oral contraceptive agent (desogestrel: 0.15 mg; ethynylestradiol: 0.03 mg) (serum amylase: 1010 U/L [control range: 40-220]; serum lipase: 3970 U/L [control range: <190]). A blood sample from S9, taken approximately 20 h after the beginning of abdominal pain and cessation of oral intake, showed plasma triglyceride concentration at 36.52 mmol/L.

In the year preceding the acute pancreatitis, her metabolic control was excellent with a median triglyceride level of 8.35 mmol/L (range: 4.77 to 8.64 mmol/L; n=7). She recovered without sequelae from her pancreatitis.

In an attempt to assess the safety of the dietary intervention, we reviewed growth parameters, hemoglobin levels, and blood chemistry data recorded in patient charts during the follow-up period (Table 4). A total of 148 pairs of weight and height/length measurements at least 6 months apart for the first 3 years of life and at least 1 year apart thereafter were recorded. Three children (S9, S14, S15) had on 1 occasion a weight to height ratio below the 5th percentile (12) at 1, 4.5 and 0.5 years of age, respectively. In all 3 cases, the next available weight to height ratio was above the 5th percentile. No other low weight to height ratios were seen in any of the LPL-deficient children. Six children (S4, S7, S9, S11, S12, S13) had low serum iron levels on at least 1 occasion; 3 of them (S11, S12, S13) demonstrated multiple abnormal values (Table 4). Concomitant hemoglobin levels were always within normal limits. Seven patients (S3, S4, S5, S10, S11, S12, S16) demonstrated high alkaline phosphatase concentrations on at least 1 occasion; 5 of them (S4, S5, S10, S11, S12) had multiple high values. S10 and S11, who are sibs, showed also low total calcium values (S10, 2.13, 2.16 and 2.10 mmol/L; S11, 2.17 mmol/L). None of them had growth retardation. All red blood cell folate and albumin levels were within the normal range.

DISCUSSION

Primary LPL deficiency is an inherited disorder of lipid metabolism characterized by massive accumulation of chylomicrons in plasma. Its clinical presentation during infancy is heterogeneous and nonspecific. However, for almost half of our patients (7/16) the main complaint was irritability with or without fever, vomiting or diarrhea. Two patients presented with lower intestinal bleeding and 5 with pallor, anemia or splenomegaly. Although in all LPL-deficient infants lactescent plasma should have rapidly led to the correct diagnosis, 7 of them underwent extensive evaluation of their clinical condition (septic work-up, exploratory laparotomy, gastrointestinal investigation, or bone marrow examination). In none of them did the results of these investigations elicit additional therapeutic actions other than specific treatment for LPL deficiency. All cases improved rapidly upon cessation of fat intake and introduction of intravenous or oral hydration. Therefore, when a diagnosis of LPL deficiency in infancy is suspected, physicians should consider a careful observation period under dietary treatment before undertaking invasive investigations.

Including patients S8 and S13, 7 LPL-deficient children, have been reported with lower intestinal bleeding in the literature (13-15). Three patients had melena (S13, 13), 2 had grossly bloody stools (S8, 14), 1 had bloody diarrhea (14), and another had rectal bleeding (15). Except in 1 patient where the first episode of bloody diarrhea was described at 4 years of age (14), the other 6 children were 4 months or younger when they experienced lower intestinal bleeding. Concomitant plasma triglyceride levels were reported in 4 cases (S8, S13, 13, 14) and ranged from 280 to 482 mmol/L. Some gastrointestinal investigations (upper gastrointestinal series, barium enema, gastroscopy, sigmoidoscopy or stool cultures) were performed in 6 cases (S8, 13-15) and were negative in all of them. Except for the child with bloody diarrhea (14), gastrointestinal hemorrhage has not recurred.

The cause of lower intestinal bleeding in these 7 children is unknown. However, we can speculate that the presence of large chylomicrons at extremely high concentrations may compromise blood supply to the bowel and lead to intestinal bleeding. It is known that there is a significant linear relationship between plasma viscosity and chylomicron concentrations (16). Therefore, an increase in blood viscosity with a subsequent decrease in local intestinal blood supply may be one of the factors involved in intestinal ischemia. Furthermore, histopathologic analysis of LPL knockout mice, an animal model of LPL deficiency, revealed dilated capillaries that were engorged with chylomicrons in many tissues; in some capillaries, large particles were margined and appeared to block contact between red blood cells and the endothelium, providing another possible explanation for the tissue hypoperfusion (17).

Nine of our patients presented with normocytic anemia which led to blood transfusion in 4 cases. Blood losses were documented in 2 infants. The cause of normocytic anemia in the remaining 7 patients was not obvious. It is doubtful that physiologic anemia of infancy could fully account for the decreased hemoglobin levels observed, especially since 6 of these infants were younger than 2 months of age and none was premature. Chylomicrons may directly interfere with the measurement of hemoglobin; however, the reported effect is a falsely increased hemoglobin reading and not a decreased value (18). In most of our cases, the reported value was measured after resuspension of blood cells in physiologic saline solution, thus correcting for the chylomicron interference. Splenomegaly was noted in 4 of the 9 patients with normocytic anemia, 2 of whom also had intestinal bleeding. Hemolysis was observed with marked hypertriglyceridemia and it was suggested that it could have been due to changes in the lipid composition of erythrocyte membranes (19, 20). Supportive data were not available which would have allowed us to reach a firm conclusion in our patients. Occult blood losses and/or reduced red blood cell life span

appear to be the most attractive hypotheses to explore. Further study is needed to confirm our observations and explain their occurrence. Normocytic anemia was not a persistent anomaly in any of these children after the institution of LPL-deficiency treatment.

Laboratory tests can be misleading in the presence of marked chylomicronemia. The extremely low natremia reported in 3 of our children was most likely artifactual (21). Clinicians should be aware of this pitfall to avoid inappropriate correction of false anomalies. Serum amylase levels have been found to be normal in some patients with pancreatitis documented at laparotomy. Very high plasma triglyceride levels interfere *in vitro* with the determination of amylase activity (1, 22). Although the amylase level was normal in S3, his acute abdominal symptomatology and the presence of ascites at laparotomy with no other anatomical anomaly, argued for a diagnosis of acute pancreatitis in this 1-month-old infant. Including our case, 4 LPL-deficient infants less than 1 year have been reported with acute pancreatitis in the literature (23-25); 2 of them underwent exploratory laparotomy. In 7 of our infants lactescent plasma and/or markedly elevated plasma triglyceride levels were detected weeks to months before a diagnosis of LPL deficiency was considered and treatment started. Considering the serious complications of untreated LPL deficiency that can manifest very early in life, we believe that it is advisable to pursue investigation of chylomicronemia as soon as it is noted and start appropriate dietary fat restriction to maintain plasma triglycerides at desirable levels.

As shown in Figure 1 and Table 2, chylomicronemia responded rapidly to dietary fat restriction, and it was possible to maintain satisfactory metabolic control for a prolonged period of time. This dietary intervention was efficient in preventing acute pancreatitis, the major complication of LPL deficiency. Only 3 episodes of abdominal pain requiring hospitalization were reported with only 1 documented

pancreatitis attack. This episode of acute pancreatitis occurred 2 months after the introduction of an oral contraceptive agent containing estrogen, in a patient who had demonstrated excellent metabolic control in the year preceding the start of this medication. Acute pancreatitis associated with oral contraceptive usage has been described in 2 other LPL-deficient women (26, 27). Development of marked chylomicronemia and acute pancreatitis have also been reported in LPL-deficient women during pregnancy (28-32) and in conjunction with estrogen replacement therapy (33). Although the exact mechanisms underlying estrogen-induced hyperlipidemia remain unclear, estrogen appears to modulate lipid levels by affecting both the rate of production and the efficiency of removal of plasma triglyceride-rich lipoproteins. Estrogen therapy should be avoided in women with familial chylomicronemia.

Treatment of patients with familial LPL deficiency requires severe limitation of fat intake throughout life. The life-threatening complication of chylomicronemia syndrome, acute pancreatitis, which can be prevented by adequately reducing plasma triglyceride concentrations, justifies a rigorous dietary compliance. However, concerns about the safety of this dietary therapy, particularly during the growing years, are legitimate. While achieving adequate metabolic control, the prescribed diet must also support a normal growth rate and maintain normal nutritional status. No persistent adverse effects on weight gain or linear growth were seen in our group of patients although our study was limited by its retrospective nature and the small number of subjects. Hemoglobin, red blood cell folate and albumin concentrations stayed within the control range. However, we observed abnormal values for serum iron, alkaline phosphatase and total calcium. None of these abnormalities were associated with clinical symptoms. We have no data allowing us to distinguish between insufficient intake or inefficient absorption of iron, calcium or vitamin D. No data are available in the literature to estimate the frequency of deficiencies of

minerals and vitamins in patients with familial chylomicronemia. Further studies are needed to better assess the nutritional adequacy of our dietary approach for the LPL-deficient children. In the meantime, these observations stress the importance of close nutritional support monitoring of these children by a dietitian.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jacques Letarte for providing some clinical data, Ms Louise Thibault for her excellent technical assistance, and Ms Micheline Patenaude for her secretarial assistance.

REFERENCES

1. Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p.1913-32.
2. Dionne C, Gagné C, Julien P, et al. Genealogy and regional distribution of lipoprotein lipase deficiency in French-Canadians of Quebec. *Hum Biol* 1993; 65:29-39.
3. Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, et al. A Missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest* 1990;86:728-34.
4. Ma Y, Henderson HE, Ven Murthy MR, et al. A Mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 1991;324:1761-66.
5. Ma Y, Wilson BI, Bijvoet S, et al. A Missense mutation (Asp²⁵⁰/Asn) in Exon 6 of the human lipoprotein lipase gene causes chylomicronemia in patients of different ancestries. *Genomics* 1992;13:649-53.
6. Deckelbaum RJ, Dupont C, Letarte J, Pencharz P. Primary hypertriglyceridemia in childhood. *Am J Dis Child* 1983;137:396-8.
7. Levy E, Thibault LA, Roy CC, et al. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res* 1988;29:215-26.
8. Krauss RM, Levy RI, Fredrickson DS. Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 1974;54:1107-24.

9. Belfrage P, Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 1969;10:341-4.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:9.16-9.19.
11. Bijvoet SM, Hayden MR. Mismatch PCR: A rapid method to screen for the Pro²⁰⁷→Leu mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:541.
12. Hamill PVV, Drizd TA, Johnson CL, et al. Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. *Am J Clin Nutr* 1979;32:607-29.
13. Ameis D, Kobayashi J, Davis RC, et al. familial chylomicronemia (Type I hyperlipoproteinemia) due to a single missense mutation in the lipoprotein lipase gene. *J Clin Invest* 1991;87:1165-70.
14. Black DM, Sprecher DL. Dietary treatment and growth of hyperchylomicronemic children severely restricted in dietary fat. *Am J Dis Child* 1993;147:60-2.
15. Simons LA, Grigor W, Martin HCO, Gibson JC, Gunn AP. Type I hyperlipoproteinaemia and recurrent scrotal pain. *Aust NZ J Med* 1980;10:336-9.
16. Sepowitz AH, Chien S, Smith FR. Effects of lipoproteins on plasma viscosity. *Atherosclerosis* 1981;38:89-95.
17. Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setälä K, et al. Severe hypotriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. *J Clin Invest* 1995;96:2555-68.
18. Gagné C, Auger PL, Moorjani S, et al. Effect of hyperchylomicronemia on the measurement of hemoglobin. *Am J Clin Pathol* 1977;68:584-6.
19. Frohlich J, Godin DV. Erythrocyte membrane alterations and plasma lipids in patients with chylomicronemia and in tangier disease. *Clin Biochem* 1986;19:229-34.

20. Cantin B, Boudriau S, Bertrand M, et al. Hemolysis in primary lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism* 1995;44:652-8.
21. Steffes MW, Freier EF. A simple and precise method of determining true sodium potassium, and chloride concentrations in hyperlipemia. *J Lab Clin Med* 1976;88:683-8.
22. Fallat RW, Vester JW, Glueck CJ. Suppression of amylase activity by hypertriglyceridemia. *JAMA* 1973;225:1331-4.
23. Berger GMB, Bonnici F. Familial hyperchylomicronaemia in four families: Problems in diagnosis, management, and aetiology reviewed. *S Afr Med J* 1977;51:623-8.
24. Previato L, Guardamagna O, Dugi KA, et al. A novel missense mutation in the C-terminal domain of lipoprotein lipase (Glu⁴¹⁰→Val) leads to enzyme inactivation and familial chylomicronemia. *J Lipid Res* 1994;35:1552-60.
25. Benlian P, Foubert L, Gagné E, et al. Complete paternal isodisomy for chromosome 8 unmasked by lipoprotein lipase deficiency. *Am J Hum Genet* 1996;59:431-6.
26. Stuyt PMJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Pancreatitis induced by oestrogen in a patient with type I hyperlipoproteinaemia. *BMJ* 1986;293:734.
27. Schaefer JR, Steinmetz A, Dugi K, et al. Durch orale Kontrazeptiva induzierte Pankreatitis bei Hyperchylomikroämie-Syndrom. *Dtsch med Wschr* 1995;120:325-8.
28. Lykkesfeldt G, Bock JE, Pedersen FD, et al. Excessive hypertriglyceridemia and pancreatitis in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1980;60:79-82.
29. DeChalain TMB, Michell WL, Berger GMB. Hyperlipidemia, pregnancy and pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1988;167:469-73.

30. Watts GF, Morton K, Jackson P, et al. Management of patients with severe hypertriglyceridaemia during pregnancy: Report of two cases with familial lipoprotein lipase deficiency. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:163-6.
31. Ma Y, Liu M-S, Ginzinger D, et al. Gene-environment interaction in the conversion of a mild-to-severe phenotype in a patient homozygous for a Ser¹⁷²→Cys mutation in the lipoprotein lipase gene. *J Clin Invest* 1993;91:1953-8.
32. Ma Y, Ooi TC, Liu M-S, et al. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: Possible association with apolipoprotein E2 isoform. *J Lipid Res* 1994;35:1066-75.
33. Glueck CJ, Lang J, Hamer T, et al. Severe hypertriglyceridemia and pancreatitis when estrogen replacement therapy is given to hypertriglyceridemic women. *J Lab Clin Med* 1994;123:59-64.

LEGEND

Figure 1: Metabolic response to dietary intervention in the first 10 days of treatment in 13 infants for whom data were available. Note that a logarithmic scale is used for triglyceride concentration.

Table 1 Clinical characteristics of LPL-deficient patients at presentation

Genetic category	Sex	Age *	Main Complaints	Physical examination				
				Hepato-megaly	Spleno-megaly	Abdominal tenderness	Eruptive xanthoma	Lipemia retinalis
P207L								
S1	M	5m (2m)	pallor	0	0	0	0	NA
S2	F	1m 13d	irritability	0	0	0	0	0
S3	M	1m 23d	irritability, vomiting	+	+	+	0	+
S4	F	5m 22d (12d)	splenomegaly	+	+	0	0	+
S5	F	3m (1m 15d)	irritability, vomiting, fever	+	0	0	0	NA
S6	F	6m	pallor	0	+	0	0	NA
S7	M	1m 3d	irritability, fever	0	0	0	0	NA
S8	F	1m	vomiting, bloody stools	+	+	0	NA	NA
HTZ G188E								
S9	F	23d (3d)	irritability, fever, diarrhea	0	0	0	NA	NA
S10 [▲]	M	1m 23d (4d)	irritability, fever	0	0	0	NA	+
S11 [▲]	F	3d	positive family history of LPL deficiency	0	0	0	0	0
HTZ P207L/G188E								
S12	M	1m 15d (3d)	anemia	0	0	0	0	+
S13	F	1m	fever, melena	0	+	0	+	+
NA								
S14	F	3m	seizures	+	+	0	+	0
S15	M	20d (4d)	irritability, fever	+	0	+	+	NA
S16	F	1m 15d	pallor	+	+	0	0	NA

The first number indicates the age at which the diagnosis was made and treatment started; when applicable, the number in brackets indicates the age at which lactescent plasma and/or increased triglyceride values were first noted. Investigation was not pursued further.

S10 and S11 are sibs.

HTZ, heterozygote; F, female; m, month; d, day; 0, absent; + present; NA, non-available data; HMZ P207L, homozygotes for P207L mutation; HMZ G188E, homozygotes for G188E mutation; HTZ P207L/G188E, compound heterozygotes for P207L and G188E mutations.

Table 2 Biochemical characteristics of LPL-deficient patients at presentation

Genotypic category	LPLA ($\mu\text{moles FFA} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	Plasma Lipid Values		Hemoglobin (g/L)	Natremia (mmol/L)
		TG (mmol/L)	TC (mmol/L)		
HMZ P207L					
S1	ND	49.67	8.27	NA	NA
S2	NA	220.0	8.0	74	142
S3	ND	25.29*	7.2*	88 [■]	106
S4	ND	37.03	12.15	103	NA
S5	ND	224.7	30.2	94 [■]	132
S6	0.26	46.51	8.0	88	NA
S7	1.04	62.51	18.4	80	142
S8	NA	482.0	77.0	86	142
HMZ G188E					
S9	0.11	64.12	16.55	NA	122
S10	1.0	218.0	31.0	70	138
S11	NA	25.0	NA	176	137
HTZ P207L/G188E					
S12	1.07	241.49	32.17	76	139
S13	NA	460.63	NA	90 [■]	NA
NA					
S14	1.38	15.41	4.26	122	NA
S15	ND	99.35	13.76	115	120
S16	ND	316.12	31.29	77 [■]	NA

■, post-heparin extrahepatic lipoprotein lipase activity; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; HMZ P207L, homozygotes for P207L mutation; HMZ G188E, homozygotes for G188E mutation; HTZ P207L/G188E, compound heterozygotes for P207L and G188E mutations; ND, no detectable activity; NA, non-available data;

* and TC values 3 days after start of treatment;

■ values after blood transfusion.

■ total LPLA: $4.83 \pm 0.90 \mu\text{moles FFA} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (mean \pm SEM) (7).

■ total plasma TG levels: $0.78 \pm 0.32 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SD) (241 children aged 2-18 years).

■ total plasma TC levels: $3.97 \pm 0.85 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SD) (241 children aged 2-18 years).

■ convert values for triglycerides to milligrams per deciliter, multiply by 88.57; to convert values for cholesterol to milligrams per deciliter, multiply by 38.67.

Table 3. Plasma triglyceride concentrations of LPL-deficient children under dietary treatment with respect to their age.

Subject	Duration of follow-up (years)	Median and range (mmol/L)		
		<1 year (n)	1-<2 years (n)	≥2 years (n)
S1	0.42 to 19.25	4.51, 1.16 to 11.12 (n=6)	4.40, 1.19 to 9.82 (n=7)	9.42, 4.15 to 39.76 (n=49)
S2	0.11 to 0.50	10.00, 3.80 to 16.50 (n=6)	-----	-----
S3	0.14 to 16.75	15.18, 6.77 to 23.26 (n=7)	20.99, 7.50 to 32.06 (n=11)	17.04, 5.30 to 44.70 (n=98)
S4	0.47 to 15.50	8.63, 7.10 to 10.83 (n=4)	8.69, 4.86 to 13.66 (n=7)	11.94, 3.85 to 22.35 (n=70)
S5	0.25 to 9.25	4.85, 2.73 to 8.45 (n=7)	4.84, 4.00 to 8.04 (n=7)	9.80, 3.25 to 16.52 (n=17)
S6	0.50 to 9.66	5.24, 4.76 to 5.87 (n=5)	14.80, 5.23 to 39.50 (n=8)	6.01, 3.43 to 34.87 (n=39)
S7	0.09 to 2.33	3.43, 2.39 to 5.41 (n=8)	5.39, 3.69 to 9.33 (n=5)	10.30, 3.83 to 16.57 (n=4)
S8	0.08 to 0.14	2.29 (n=1)	-----	-----
S9	0.06 to 19.04	9.28, 5.53 to 17.04 (n=6)	11.71, 7.73 to 15.24 (n=4)	11.74, 3.99 to 28.86 (n=78)
S10	0.14 to 5.41	4.29, 2.55 to 13.70 (n=7)	10.02, 3.69 to 16.79 (n=3)	9.94, 6.12 to 13.45 (n=12)
S11	0.01 to 3.50	7.95, 3.55 to 12.68 (n=6)	10.28, 8.56 to 11.85 (n=3)	12.52, 6.53 to 20.01 (n=9)
S12	0.11 to 4.83	5.78, 3.60 to 10.85 (n=6)	10.99, 5.96 to 18.05 (n=7)	12.09, 3.44 to 21.24 (n=19)
S13	0.08 to 11.91	4.12, 3.22 to 5.01 (n=2)	5.11, 4.51 to 5.70 (n=2)	7.30, 3.24 to 23.19 (n=33)
S14	0.25 to 8.50	10.29, 8.19 to 12.90 (n=3)	13.16, 12.64 to 18.74 (n=3)	10.54, 5.19 to 22.58 (n=7)
S15	0.06 to 3.66	4.87, 2.37 to 15.63 (n=5)	4.00, 2.69 to 17.72 (n=7)	4.91, 2.42 to 20.77 (n=5)
S16	0.11 to 4.66	6.69, 4.40 to 8.97 (n=2)	13.15, 3.01 to 14.11 (n=3)	10.38, 5.64 to 18.23 (n=16)

Table 4 Hemoglobin and blood chemistry values during follow-up period

Subject	Duration of follow-up (years)	Number of abnormal values; total number of values					
		Hemoglobin	Iron	Alkaline phosphatase	Total calcium	Red blood cell folate	Albumin
1	18.83	0; 5	0; 3	0; 5	0; 5	0; 3	0; 5
2	0.39	0; 1	NA	NA	NA	NA	NA
3	16.61	0; 8	0; 6	1; 5	0; 5	0; 1	0; 5
4	15.03	0; 3	1; 2	2; 3	0; 3	0; 2	0; 2
5	9.0	0; 3	0; 2	4; 4	0; 4	0; 3	0; 4
6	9.16	0; 4	0; 2	0; 3	0; 3	NA	0; 3
7	2.24	0; 3	1; 3	0; 3	0; 2	NA	0; 2
8	0.06	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	18.98	0; 8	1; 3	0; 6	0; 6	0; 1	0; 4
10	5.27	0; 4	0; 2	3; 5	3; 5	0; 2	0; 4
11	3.49	0; 4	2; 3	4; 4	1; 4	0; 2	0; 4
12	4.72	0; 5	4; 5	3; 5	0; 5	0; 1	0; 5
13	11.83	0; 4	3; 4	0; 3	0; 2	NA	0; 3
14	8.25	0; 4	NA	NA	NA	NA	NA
15	3.60	0; 3	NA	NA	NA	NA	NA
16	4.55	0; 5	NA	1; 3	0; 3	NA	NA

non-available data.

Chapitre IV

Caractérisation clinique, biochimique et moléculaire des enfants hypertriglycéridémiques d'origine canadienne française.

Résumé

Les hyperlipidémies sont des désordres métaboliques souvent associés à un risque augmenté d'athérosclérose précoce. Les objectifs de notre étude étaient: 1) de déterminer la fréquence des hypertriglycéridémies (TG > 95^{ième} percentile, à 2 reprises) chez des enfants canadiens français référés à la clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine, en excluant les patients homozygotes pour un déficit en lipase lipoprotéique (LPL); 2) de caractériser leur phénotype clinique et biochimique; et 3) d'évaluer chez ces enfants la prévalence des hétérozygotes pour les mutations québécoises les plus fréquemment responsables du déficit en LPL. En effet, la fréquence des hétérozygotes pour le déficit en LPL est élevée chez les canadiens français (1/139), et dans la population adulte, l'hétérozygotie pour le déficit en LPL a été associée à des anomalies lipidiques diverses. Nous avons révisé les dossiers de 459 patients d'origine canadienne française examinés à la clinique des lipides de 1987 à 1993. Cinquante-trois des 459 (11.5%), âgés de 15 mois à 16 ans, présentaient, avant toute intervention thérapeutique, une hypertriglycéridémie avec des valeurs de LDL-cholestérol \leq 95^{ième} percentile: 19/459 (4.1%) et LDL-cholestérol > 95^{ième} percentile: 34/459 (7.4%). L'hyperlipidémie était secondaire à une pathologie sous-jacente (excepté l'obésité) ou à un traitement médicamenteux chez 8/53 (15.0%) des enfants hypertriglycéridémiques. Une histoire d'hyperlipidémie parentale a été mise en évidence chez 90.5% des patients et une histoire d'athérosclérose précoce chez 54.7%. La tension artérielle était élevée (> 90^{ième} percentile) chez 3.8% des cas. De même, un indice de masse corporelle > 90^{ième} percentile caractérisait 41.5% des sujets.

Les niveaux plasmatiques de HDL-cholestérol étaient diminués de façon significative par rapport aux témoins ($p \leq 0.0005$). Une étude mutationnelle du locus de la LPL a été effectuée chez 44/53 des cas soit ceux dont l'ADN était disponible. Lorsque les 4 mutations ponctuelles faux sens: (P207L, G188E, D250N, et N291S) ont été recherchées, seulement 2 des patients étudiés étaient porteurs de l'une des mutations (N291S). De plus, 16 de nos patients étaient hétérozygotes pour une des 8 mutations fréquentes au niveau du gène du récepteur des LDL responsables d'une hypercholestérolémie familiale (HF) chez les canadiens français. Une histoire familiale d'athérosclérose précoce était plus fréquemment retrouvée chez les patients hétérozygotes pour une mutation du gène du récepteur des LDL que chez ceux ne présentant aucune des mutations recherchées (75% vs 46.4%). Un seul des patients étudiés était porteur du génotype apo E 2/2 (parfois associé à la présentation d'une hyperlipidémie de type III). Chez 38.6% des cas, le génotype était apo E 3/4 (associé dans les études épidémiologiques à des taux plus élevés de cholestérol et triglycérides, ainsi qu'à de taux abaissés de HDL-cholestérol comparativement au génotype apo E 3/3).

En conclusion: 1) seulement 11.5% des enfants vus à notre clinique des lipides présentaient une hypertriglycéridémie; 2) la majorité de ces patients avaient une histoire parentale positive d'hyperlipidémie et/ou une histoire familiale d'athérosclérose précoce; 3) l'obésité était fréquemment associée à une hypertriglycéridémie; 4) l'hypertriglycéridémie de nos patients ne semblait pas expliquée par une hétérozygotie pour le déficit en LPL; 5) 30% des patients étaient des hétérozygotes pour une mutation du gène codant pour le récepteur des LDL (HF prouvée); et 6) le génotype apo E 3/4 était plus fréquent chez nos patients que chez les contrôles.

Introduction

La maladie coronarienne athéroscléreuse est un problème majeur de santé publique en Amérique du Nord. De nombreuses études ont démontré que l'athérosclérose commence dès l'enfance et que les facteurs de risque chez l'enfant sont les mêmes que ceux retrouvés chez l'adulte (National Cholesterol Education Program, 1992). Le diagnostic précoce d'une dyslipidémie chez l'enfant lui permettra donc de bénéficier d'une approche préventive de la maladie coronarienne athéroscléreuse, comme l'ont relevé l'Académie Américaine de Pédiatrie et le National Cholesterol Education Program for Children (National Cholesterol Education Program, 1992. Committee on Nutrition, 1992).

Même si l'hypercholestérolémie est un facteur de risque très important pour la maladie coronarienne, des valeurs normales de cholestérol et de LDL-chol n'excluent pas la possibilité de développer une coronaropathie athéroscléreuse (Goldstein et coll, 1973. Grundy et coll, 1987). La présence d'autres facteurs de risque liés aux lipoprotéines peut favoriser le processus de l'athérosclérose, tels l'hypertriglycémie associée à des niveaux abaissés de HDL-chol, l'hyperlipidémie familiale combinée, l'hyperapobétalipoprotéïnémie, l'augmentation de la lipoprotéine (a) (Utermann 1989) et la diminution des niveaux de HDL-chol.

Plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre l'hypertriglycémie et le risque accru de maladie cardio-vasculaire (Brown 1969. Carlson et coll, 1972. Brunner et coll, 1977. Carlson et coll, 1979), autant chez l'homme que chez la femme, et particulièrement chez les patients diabétiques non insulino-dépendants et chez les survivants à infarctus du myocarde. Cette corrélation est moindre lorsque des analyses multi-variées, tenant compte du chol-total et des HDL-chol, sont réalisées (Heyden et coll, 1980. Hulley et coll, 1980). Ces observations suggèrent que le risque augmenté de maladie cardio-

vasculaire chez les hypertriglycéridémiques est dû non seulement à l'accumulation de particules riches en TG, mais aussi à son association avec d'autres facteurs de risque comme les valeurs abaissées de HDL-chol (Davis et coll, 1980).

Ainsi des facteurs de risque autres que l'hypercholestérolémie ou l'hypertriglycéridémie associées à l'athérosclérose précoce ont été soulignés chez l'enfant (National Cholesterol Education Program, 1992): a) une histoire familiale de maladie cardio-vasculaire précoce, d'accident cérébro-vasculaire ou de maladie vasculaire occlusive périphérique avant l'âge de 55 ans chez un parent, un frère ou une soeur, un grand-parent, un oncle ou une tante; b) le tabagisme; c) l'hypertension artérielle; d) des concentrations abaissées de HDL-chol; e) l'obésité; f) le diabète, et g) la sédentarité.

L'hypertriglycéridémie peut être secondaire à des conditions associées telles que le diabète, l'obésité, l'alcoolisme, l'insuffisance rénale sévère, et plus rarement la glycogénose de type I, l'hypercorticisme ou la lipodystrophie. Certains médicaments peuvent provoquer ou aggraver une hypertriglycéridémie tels l'allopurinol, les benzodiazépines, les bêtabloquants, les diurétiques thiazidiques, la prednisone, la ticlopidine et des dérivés de la vitamine A (Mancini et coll, 1991. Groupe de travail sur les dyslipidémies, 1993). D'autre part, parmi les dyslipidémies primaires nous retrouvons souvent des valeurs élevées de TG chez les patients atteints: a) d'une HF, due à une mutation du récepteur des LDL; b) d'une hyperlipidémie familiale combinée (HFC) avec des taux élevés de LDL-chol et de VLDL-chol avec un enrichissement en apo B; c) d'une dysbêtalipoprotéïnémie de type III associée au génotype apo E 2/2 ou autre anomalie du gène de l'apo E; d) d'une hypertriglycéridémie familiale présentant simultanément une diminution du HDL-chol; e) d'une chylomicronémie due à un déficit en LPL ou en apoCII, et f) d'une hyperlipidémie mixte avec l'augmentation des chylomicrons et des VLDL-chol (Assmann et Brewer, 1991. Groupe de travail sur les dyslipidémies, 1993).

La HFC est caractérisée par une hypertriglycémie ou une hypercholestérolémie ou la présence simultanée des deux. Cette variation phénotypique se retrouve tant chez les membres hyperlipidémiques d'une même famille que chez le patient lui même, à travers le temps. C'est une maladie autosomique dominante avec un risque élevé de maladie cardiovasculaire (Goldstein et coll, 1973). Bien que les causes moléculaires ne soient pas bien établies, les études cinétiques suggèrent une surproduction des particules d'apo B des VLDL par le foie (Cortner et coll, 1991. Sniderman et coll, 1992). Des études moléculaires ont démontré l'absence d'association entre le génotype de l'apo B et le phénotype de la HFC (Rauh et coll, 1990). Par ailleurs, une association significative a été démontrée entre les polymorphismes du groupe de gènes apo AI-CIII-AIV et le phénotype HFC (Hayden et coll, 1987). Cette dernière observation a été remise en question récemment (Wijsman et coll, 1992). Les études faites chez des familles d'hétérozygotes pour un déficit en LPL ont montré une corrélation entre la HFC et l'hétérozygotie pour une des mutations du gène de la LPL, suggérant un risque additionnel de développer une hyperlipidémie (Babirak et coll, 1989. Wilson et coll, 1990. Miesenböck et coll, 1993). L'expression du phénotype peut être modulé par l'âge, l'obésité, un hyperinsulinisme ou l'utilisation de médicaments perturbant le métabolisme des lipides (Wilson et coll, 1990).

Chez les canadiens français du Québec, la fréquence d'un déficit en LPL homozygote est la plus élevée au monde. La fréquence des porteurs hétérozygotes est de 1/139 et peut s'élever jusqu'à 1/40 dans certaines régions (Gagné et coll, 1989). À cause de l'effet fondateur, 3 mutations faux sens comptent pour 97% des allèles mutés chez les patients canadiens français déficients en LPL (Ma et coll, 1991. Ma et coll, 1992), à savoir: la mutation P207L (Ma et coll, 1991), la mutation G188E (Hata et coll, 1992) et la mutation D250N (Ishimura-Oka et coll, 1992). Plus récemment, une autre mutation, N291S a été décrite (Ma et coll, 1993). Dans une population de sujets canadiens français hypertriglycémiques (type IV ou V), 20/121 (16.5%) étaient porteurs au moins de

l'une de quatre mutations de la LPL. La mutation N291S a été retrouvée chez 8 d'entre eux (Minnich et coll, 1995).

De même, en raison de l'effet fondateur, la fréquence de l'HF hétérozygote est 2 fois plus élevée parmi les canadiens français du Québec: 1/270 (Moorjani et coll, 1989). Cette maladie autosomique dominante est due à des mutations du gène du récepteur des LDL (Goldstein et coll, 1995) et les patients atteints présentent des taux élevés de LDL-cholesterol avec ou sans élévation des TG plasmatiques. Les 8 mutations responsables de l'HF chez les canadiens français sont: la grande délétion > 15 kb (Hobbs et coll, 1987); la délétion de 5 kb (Ma et coll, 1989); les mutations faux sens W66G, E207K, et C646Y (Leitersdorf et coll, 1990); la mutation non sens Y468X (Simard et coll, 1994); et les 2 mutations découvertes dernièrement par notre équipe, la duplication de 7pb, 681ins7, et la mutation faux sens Y354C (Assouline et coll, 1997).

Nous avons donc étudié de façon rétrospective 53 enfants d'origine canadienne française qui se sont présentés à notre clinique de lipides avec une hypertriglycémie. Peu d'études de ce genre sont disponibles chez la population pédiatrique. Les objectifs de notre étude étaient: 1) de déterminer la fréquence de l'hypertriglycémie (TG $> 95^{\text{ième}}$ percentile, à 2 reprises) chez les enfants canadiens français référés à la clinique de lipides de l'Hôpital Sainte-Justine, autres que les patients homozygotes pour un déficit en LPL; 2) de caractériser leur phénotype clinique et biochimique; et 3) d'évaluer l'influence du génotype de l'apo E et de l'état hétérozygote pour le déficit en LPL sur les niveaux plasmatiques des TG. Nous avons également déterminé le sous-groupe de patients HF se présentant avec une hypertriglycémie associée.

Méthodes

Cohorte étudiée

Nous avons sélectionné une cohorte de 53 enfants présentant une hypertriglycéridémie à partir des 459 patients suivis à la clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine entre 1987 et 1993. Nos critères d'inclusion étaient: 1) présentation avant l'âge de 18 ans; 2) origine canadienne française à l'histoire; et 3) valeurs plasmatiques initiales (examinées à deux reprises) des TG > 95^{ième} percentile pour l'âge et le sexe, avant toute intervention diététique ou médicamenteuse. Nous avons révisé les dossiers médicaux de ces 53 patients afin de déterminer l'âge au moment du diagnostic, les signes ou symptômes cliniques révélés durant l'examen initial, la présence ou non d'une condition médicale associée, et les valeurs biochimiques initiales.

Analyses biochimiques

Les échantillons sanguins ont été prélevés dans un tube contenant 1 mg/ml d'EDTA après un jeûne de 12 heures. Le chol-total et les TG ont été déterminés par méthodes enzymatiques (Lévy et coll, 1988) et le chol des LDL, calculé par l'équation de Friedewald (Friedewald et coll, 1972). Le chol des HDL a été mesuré après précipitation des lipoprotéines contenant de l'apo B par l'acide phosphotungstique. Les concentrations plasmatiques d'apo AI et d'apo B ont été déterminées par néphélométrie (Lévy et coll, 1989).

Analyses moléculaires

L'ADN génomique a été extrait des leucocytes par extraction au phénol-chloroforme et par précipitation subséquente de l'ADN par l'éthanol (Sambrook et coll, 1989). La méthodologie utilisée pour déterminer la présence d'une des mutations mentionnées a été la suivante: la mutation G188E du gène de la LPL a été détectée par amplification de l'exon 5 par PCR et digestion avec l'enzyme de restriction Ava II (Monsalve et coll, 1990). La mutation P207L du gène de la LPL a été décelée après digestion enzymatique du produit d'amplification par PCR de l'exon 5, la présence de la mutation crée un site de restriction pour l'enzyme Dde I (Bijvoet et coll, 1992). La mutation D250N du gène de la LPL a été détectée par digestion enzymatique avec Taq I du produit d'amplification par PCR de l'exon 6 (Ma et coll, 1992). La mutation N291S a été décelée par digestion enzymatique avec Rsa I du produit d'amplification par PCR de l'exon 6 (Minnich et coll, 1995). Le polymorphisme du gène de l'apolipoprotéine E a été décelé par digestion enzymatique avec Hha I du produit d'amplification par PCR de l'exon 3 (Hixson et Vernier, 1990). Nous avons utilisé l'analyse de buvardage Southern pour trouver les délétions >15 kb et 5 kb du gène du récepteur des LDL (Ma et al, 1989). La mutation W66G a été déterminée par digestion enzymatique avec Bsl I du produit d'amplification (PCR) de l'exon 3 du gène du récepteur des LDL (Hobbs et al, 1992). La mutation E207K a été observée après la digestion enzymatique avec Mnl I du produit d'amplification (PCR) de l'exon 4 du gène du récepteur des LDL (Hobbs et al, 1992). La duplication de 7 pb, 681ins7, dans l'exon 4 du gène du récepteur des LDL a été recherchée par analyse de la présence ou non d'un hétéroduplex du produit d'amplification (PCR) de l'exon 4 du gène du récepteur des LDL (Assouline et coll, 1997). La mutation Y354C a été examinée par amplification (PCR) de l'exon 8 du gène du récepteur des LDL (Hobbs et al, 1992) et digestion enzymatique du produit avec Fnu4H I. La mutation Y468X de l'exon 10 du récepteur des LDL (Simard et al, 1994) a été démontrée par amplification (PCR) de

l'exon 10 et digestion enzymatique du produit avec Bfa I. La mutation C646Y de l'exon 14 du récepteur des LDL a été étudiée par la méthode d'hybridation à l'aide d'oligonucléotides allèle-spécifique du produit d'amplification (PCR) de l'exon 14 (Leitersdorf et al, 1990).

L'analyse statistique descriptive a été effectuée en utilisant le programme Stat View™ SE + Grafics Statistical Software (version 1988-1991, Abacus Concepts, Inc). Nous avons utilisé l'analyse de variance et le test de "t" non pairé pour comparer les différents groupes. Une valeur de $p \leq 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Parmi les 459 enfants suivis à la clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine entre 1987 et 1993, 53 (11.5%) ont présenté des taux de TG > 95^{ième} percentile pour l'âge et le sexe, à deux reprises avant l'intervention diététique. Le groupe est formé de 24 filles et 29 garçons âgés de 15 mois à 16 ans.

Le diagnostic a été fait par dépistage en raison d'une histoire familiale d'hyperlipémie chez 35 (66%) des 53 cas. Les 18 patients restants ont été diagnostiqués suite à des analyses biochimiques pour différentes causes. Nous avons trouvé une histoire positive d'hyperlipémie chez le père et/ou la mère chez 48 (90.5%) des 53 cas. Et 29 (54.7%) des 53 patients avaient une histoire familiale positive d'athérosclérose précoce, définie par la présence d'une maladie cardio-vasculaire avant l'âge de 55 ans chez un parent, un grand-parent, une tante ou un oncle de l'enfant.

Nous avons comparé les résultats des valeurs moyennes plasmatiques des lipides de nos patients avec ceux d'un groupe témoin (n=41) apparié pour l'âge et le sexe. Il s'agit d'enfants d'origine canadienne française, sans histoire connue d'hyperlipidémie familiale ou d'athérosclérose précoce, et sans aucune condition associée à une hyperlipidémie. Tel qu'attendu et comme le montre le tableau I, il y a une augmentation significative ($p=0.0001$) des niveaux de chol-total, LDL-chol, apo B et TG totaux chez nos patients par rapport aux témoins. Ces résultats sont associés à une diminution significative ($p=0.0005$) des taux plasmatiques du HDL-chol.

Tableau I: Valeurs des lipides plasmatiques des patients hypertriglycéridémiques et des témoins, exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

groupe	chol-total (mmol/L)	LDL-chol (mmol/L)	apo B (g/L)	HDL-chol (mmol/L)	apo AI (g/L)	TG totaux (mmol/L)
patients (n=53)	6.43 \pm 1.94 p=0.0001*	4.62 \pm 1.95 p=0.0001*	1.52 \pm 0.51 p=0.0001*	0.99 \pm 0.21 p=0.0005*	1.29 \pm 0.24	1.78 \pm 0.58 p=0.0001*
témoins (n=41)	3.80 \pm 0.58	2.22 \pm 0.53	0.78 \pm 0.15	1.20 \pm 0.33	1.39 \pm 0.26	0.84 \pm 0.38

*= différence significative par rapport aux contrôles.

Pour différencier les hypertriglycéridémie primaires et secondaires, nous avons recherché les causes ou pathologies associées chez nos patients. En effet, 28 (52.8%) des 53 patients ont présenté au moins une condition reliée à leur hypertriglycéridémie: l'obésité dans 22 (41.5%) des 53 cas, définie comme un indice de masse corporelle > 90^{ième} percentile pour l'âge et le sexe; la prise d'anovulants oraux chez 3 (12.5%) des 24 filles; une hépatite à cellules géantes chez un patient traité par corticostéroïdes; une vasculite cérébrale chez une patiente sous corticostéroïdes; de l'asthme chez une patiente sous corticostéroïdes et anovulants oraux; et finalement, un déficit en glycogène synthétase chez une patiente. Chez 2 (3.8%) des 53 patients, nous avons décelé une tension artérielle systolique > 90^{ième} percentile pour l'âge et le sexe à trois reprises lors d'examens physiques sériés.

Nous avons comparé les valeurs moyennes de lipides plasmatiques des hypertriglycéridémies primaires (n=25) avec celles des hypertriglycéridémies secondaires (n=28). Tel que le montre le tableau II, les valeurs de chol-total, LDL-chol, apo B et HDL-

chol sont semblables. Pour ce qui est des valeurs moyennes de TG, le groupe avec une hypertriglycéridémie secondaire montre des valeurs significativement augmentées ($p=0.0001$). De même, les valeurs moyennes d'apo AI sont significativement élevées chez les hypertriglycéridémiques secondaires par rapport aux hypertriglycéridémiques primaires. L'âge au moment du diagnostic a été de façon significative plus précoce chez les hypertriglycéridémiques primaires que chez les hypertriglycéridémiques secondaires. Ceci peut s'expliquer en partie par le dépistage familial qui se fait dans les familles connues dyslipidémiques.

Tableau II: Valeurs des lipides plasmatiques des patients avec une hypertriglycéridémie primaire vs une hypertriglycéridémie secondaire, exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

groupe	chol-total (mmol/L)	LDL-chol (mmol/L)	apo B (g/L)	HDL-chol (mmol/L)	apo AI (g/L)	TG-totaux (mmol/L)
primaire (n=25)	6.55 \pm 1.91	4.91 \pm 1.91	1.48 \pm 0.33	0.99 \pm 0.21	1.22 \pm 0.21 p=0.02*	1.43 \pm 0.39 p=0.0001*
secondaire (n=28)	6.33 \pm 1.98	4.37 \pm 2.00	1.57 \pm 0.64	1.00 \pm 0.22	1.36 \pm 0.24	2.10 \pm 0.55

*= différence significative entre les groupes.

Ces deux groupes ont présenté des fréquences semblables d'histoire familiale d'athérosclérose précoce (56.0% chez les hypertriglycéridémiques primaires et 53.5% chez les hypertriglycéridémiques secondaires), ainsi que des fréquences semblables d'histoire parentale d'hyperlipidémie (92.0% chez les hypertriglycéridémiques primaires et 89.2% chez les secondaires). Il faut tenir compte du biais de sélection introduit par le fait que nous sommes une clinique spécialisée en maladies lipidiques.

Nous disposions de l'ADN génomique pour les études mutationnelles chez 44 des 53 patients. Nous avons recherché chez ces patients les 3 mutations ponctuelles faux sens du locus de la LPL qui comptent pour 97% des allèles mutés chez les canadiens français: P207L, G188E et D250N. Aucun des patients étudiés n'était porteur de ces mutations. Par contre, la mutation A291S du gène de la LPL a été retrouvée chez 2 (4.5%) des 44 patients et chez 5 (2.0%) des 241 témoins. La population témoin est constituée d'enfants d'origine canadienne française, âgés de moins de 18 ans, sans antécédents familiaux d'hyperlipidémie, d'athérosclérose précoce ou de condition associée à une hyperlipidémie secondaire

Le polymorphisme de l'apo E a été également étudié. Les fréquences génotypiques sont indiquées au tableau III. Il faut noter la présence d'une plus haute fréquence, sans atteindre une différence significative, du génotype E 3/4 chez nos patients par rapport au groupe contrôle. Un seul patient a montré le génotype apoE 2/2, capable d'influencer le développement de l'hyperlipidémie de type III.

Tableau III: Fréquence des génotypes de l'apo E chez les patients hypertriglycéridémiques et les témoins, exprimée en pourcentages .

groupe	apo E 3/3	apo E 3/4	apo E 3/2	apo E 4/2	apo E 4/4	apo E 2/2
patients (n=44)	43.2% (n=19)	38.6% (n=17)	11.4% (n=5)	0 % (n=0)	4.5% (n=2)	2.3% (n=1)
témoins (n=241)	60.8% (n=146)	22.4% (n=54)	12.8% (n=31)	2.48% n=6	1.65% (n=4)	0 % (n=0)

L'analyse statistique comparative des valeurs de lipides des 19 patients avec un génotype apo E 3/3 vs les 17 patients avec un génotype apo E 3/4 n'a pas montré de différence significative. Les bilans lipidiques sont semblables chez ces 2 groupes de patients tel que le montre le tableau IV.

Tableau IV: Valeurs des lipides plasmatiques des patients apo E 3/3 et apo E 3/4, exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

groupe	chol-total (mmol/L)	LDL-chol (mmol/L)	apo B (g/L)	HDL-chol (mmol/L)	apo AI (g/L)	TG totaux (mmol/L)
apo E 3/3 (n=19)	6.41 \pm 1.75	4.56 \pm 1.80	1.51 \pm 0.37	1.00 \pm 0.21	1.32 \pm 0.26	1.82 \pm 0.54
apo E 3/4 (n=17)	6.61 \pm 2.12	4.84 \pm 2.14	1.69 \pm 0.72	0.95 \pm 0.19	1.26 \pm 0.22	1.80 \pm 0.47

Une augmentation des niveaux de LDL-chol > 95^{ième} percentile pour l'âge et le sexe a été retrouvée chez 34 (64.1%) des 53 patients au bilan initial. Les 19 (35.9%) patients restants présentaient uniquement une augmentation des TG. Pour caractériser les patients qui avaient une hypercholestérolémie associée à leur hypertriglycéridémie, nous avons recherché les 8 mutations dans le gène du récepteur des LDL responsables d'une HF chez les canadiens français. Seize des 44 (36.4%) patients pour lesquels nous disposions de l'ADN, étaient hétérozygotes pour l'une de ces mutations. Douze pour la grande délétion de > 15 kb, deux pour la mutation C646Y de l'exon 14, un pour la mutation E207K de l'exon 4 et un autre pour la mutation Y468X de l'exon 10. Ces patients avec une HF prouvée avaient une histoire d'athérosclérose précoce familiale plus fréquente (75.0%) que les patients sans mutation décelée (46.4%). L'obésité était

significativement plus fréquente chez les patients sans HF prouvée: 16/28 (57.1%), que chez les HF prouvés: 4/16 (25.0%). Tel que le montre le tableau V, les patients avec une HF prouvée présentaient des valeurs moyennes de chol-total, LDL-chol et apo B significativement plus élevées, et des valeurs de TG-totaux et d'apo AI significativement inférieures que les patients sans mutation décelée.

Tableau V: Valeurs des lipides plasmatiques des patients avec une HF prouvée comparées à celles des patients sans mutation décelée, exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

groupe	chol-total (mmol/L)	LDL-chol (mmol/L)	apo B (g/L)	HDL-chol (mmol/L)	apo AI (g/L)	TG totaux (mmol/L)
HF prouvée (n=16)	8.28 \pm 1.57 p=0.0001*	6.63 \pm 1.42 p=0.0001*	1.80 \pm 0.37 p=0.04*	1.00 \pm 0.27	1.18 \pm 0.23 p=0.02*	1.46 \pm 0.49 p=0.004*
sans mutation (n=28)	5.83 \pm 1.46	3.93 \pm 1.45	1.46 \pm 0.55	1.00 \pm 0.18	1.35 \pm 0.22	1.93 \pm 0.50

*= différence significative entre les groupes.

Discussion

Nous avons trouvé que 11.5% des patients d'origine canadienne française référés à notre clinique des lipides présentaient une hypertriglycéridémie. Cortner et coll (1990) ont étudié 97 familles parmi les 129 envoyées à leur clinique pédiatrique qui présentaient une hyperlipoprotéïnémie héréditaire dominante: 67% présentaient une HFC, 21% une HF, 11% une hyperapobétalipoprotéïnémie familiale et 1% une hypertriglycéridémie familiale. Les résultats de cette étude contrastent considérablement avec ceux de notre clinique montrant une fréquence élevée de HF (Assouline et coll, 1995 et 1997), avec seulement 11.5% des patients présentant une hypertriglycéridémie associée ou non à l'hypercholestérolémie. La disparité peut s'expliquer par la nature de notre clinique qui ne reflète pas celle d'une population pédiatrique en général. De plus, l'effet fondateur est responsable de la haute fréquence de HF au Québec (Bétard et coll, 1992), ce qui fait de la population canadienne française une population particulière.

L'histoire familiale d'hyperlipidémie parentale était très élevée chez nos patients (90.5%) et elle est associée à une histoire d'athérosclérose précoce chez plus de la moitié des cas (54.7%), reflétant le caractère spécialisé de notre clinique. Les valeurs lipidiques de nos patients prédisposent au développement de maladie coronarienne; en particulier les taux élevés de chol-total, LDL-chol, apo B et TG totaux associée à une diminution significative des valeurs de HDL-chol.

Dans la recherche des conditions associées à l'hypertriglycéridémie nous avons trouvé dans notre cohorte une haute prévalence d'obésité (41.5%). Les études épidémiologiques de Framingham ont conclu que l'obésité en soi représente un facteur de risque de développer une maladie coronarienne (Hubert et coll, 1983. Feinleib, 1985. Garrison et Castelli, 1985). Cette association disparaît si l'on élimine de l'analyse

l'hypertension et les facteurs de risque métaboliques (Larsson et coll, 1981. Iverius et Brunzell, 1985), ce qui suggère que les sous-populations obèses les plus à risque sont celles caractérisées par une obésité abdominale (Després et coll, 1992), un diabète non insulino-dépendant (Kissebah et Peiris, 1989), ou une HFC (Brunzell, 1984). L'obésité a été liée à l'apparition du phénotype chez les enfants de parents porteurs d'HFC (Jansen et coll, 1995). Dans notre cohorte, la fréquence d'hypertriglycéridémie secondaire à la prise d'anovulants ou autres médicaments était très faible. À noter qu'un cas de déficit en glycogène synthase a été trouvé chez une fillette de 7 ans. L'association de ce déficit très rare avec l'hyperlipidémie n'est pas claire (Chen et Burchell, 1995).

Lorsque nous avons comparé les bilans lipidiques des patients porteurs d'une hypertriglycéridémie secondaire avec ceux des patients hypertriglycéridémiques primaires, nous avons trouvé des valeurs semblables de chol-total, LDL-chol, apo B et HDL-chol. Par contre, les valeurs de TG étaient significativement plus élevées chez les patients avec une hypertriglycéridémie secondaire. La fréquence élevée d'histoire parentale d'hyperlipidémie et d'histoire familiale d'athérosclérose précoce dans les 2 groupes pourrait suggérer une base héréditaire; l'association avec un facteur de risque supplémentaire comme l'obésité, l'utilisation d'anovulants ou le traitement aux corticostéroïdes pourrait aggraver l'hypertriglycéridémie. Chez nos patients, l'obésité est la condition la plus fréquente. Dans ce contexte, les patients avec une obésité abdominale, montrent une augmentation des niveaux de TG associée à des altérations dans la composition des lipoprotéines (Després et coll, 1989) en conséquence d'un catabolisme diminué des VLDL, d'une diminution de l'activité post-héparine de la LPL et d'une augmentation de la sécrétion des VLDL (Després et coll, 1990). Cette augmentation des VLDL circulantes pourrait expliquer l'augmentation significative d'apo AI chez nos patients avec hypertriglycéridémie secondaire. Cette apoprotéine se trouve autant dans les VLDL d'origine exogène que dans les VLDL sécrétées par le foie. Une augmentation de

l'apo AI a été aussi retrouvée chez des enfants obèses traités pour un syndrome X (Hardin et coll, 1997).

Pour évaluer la contribution des mutations dans l'étiologie de l'hypertriglycéridémie chez nos patients, nous avons recherché les mutations canadiennes françaises du gène de la LPL. Plusieurs études rendent compte de la corrélation entre un état hétérozygote pour un déficit en LPL et le développement d'une hyperlipidémie telle l'HFC (Babirak et coll, 1989), l'hyperlipidémie postprandiale marquée (Miesenböck et coll, 1993) ou l'hypertriglycéridémie familiale (Wilson et coll, 1990). L'hyperlipidémie serait secondaire à la diminution de l'activité post-héparine de la LPL, et modulée par l'âge et l'association d'autres facteurs environnementaux. Seulement 2 (4.5%) des 44 patients étaient hétérozygotes pour la mutation A291S, ainsi que 5 (2.0%) de nos 241 témoins sains. Cette mutation a été reliée à un déficit modéré du catabolisme enzymatique (Ma et coll, 1993). En effet, la mutation A291S est responsable d'une diminution moyenne de 23% in vivo et de 50% in vitro de l'activité de la LPL chez les hétérozygotes en raison d'une dimérisation partiellement déficiente de la LPL. Une augmentation significative des valeurs de TG par rapport aux témoins dans la même famille est rapportée (Syvanne et coll, 1996). Dans l'étude de fréquence des allèles mutés du gène de la LPL chez 121 canadiens français hypertriglycéridémiques, Minnich et coll (1995) ont trouvé que 16.5% étaient porteurs d'une des 4 mutations que nous avons recherchées, alors que la fréquence dans notre population était de 4.5% et ceci, pour une mutation avec un effet phénotypique modéré. Nos deux patients hétérozygotes pour la mutation A291S sont également porteurs d'une des isoformes de l'apo E connues pour aggraver l'hypertriglycéridémie en cas d'association à un déficit partiel de LPL (Ma et coll, 1994). En effet, leur génotype était apo E 3/2 et apo E 3/4 respectivement. Dans notre cohorte, l'état hétérozygote pour une des mutations du gène de la LPL ne semble pas jouer un rôle majeur dans la genèse de l'hypertriglycéridémie.

Dans la méta-analyse sur la modulation des niveaux de TG plasmatiques par le phénotype de l'apo E, Dallongeville et coll (1992) ont montré que les TG étaient plus élevés chez les personnes avec un allèle ϵ 2 et chez celles avec un phénotype apo E 3/4 que chez les sujets apo E 3/3. Nous avons trouvé une fréquence plus élevée de patients apo E 3/4 par rapport aux contrôles (38.6% vs 22.4%), mais lorsque nous comparons les bilans lipidiques des patients apo E 3/4 avec ceux des patients apo E 3/3, les valeurs sont semblables. Probablement la petite taille de notre cohorte ne nous permet pas de voir cet effet. Un seul de nos patients présentait le génotype 2/2 pour l'apo E, qui peut être associé à une hyperlipoprotéïnémie de type III. Seulement 2% des homozygotes apo E 2 développent une hyperlipoprotéïnémie, et ce, rarement avant l'âge adulte et souvent en association avec une obésité, un diabète ou une hypothyroïdie (Mahley et coll, 1995). Notre patient présente un indice de masse corporelle > 90^{ième} percentile et il est porteur de la mutation C646Y du gène du récepteur des LDL, ce qui explique son phénotype lipidique compatible avec une hypercholestérolémie familiale et des valeurs légèrement augmentées de TG (hyperlipidémie de type IIb).

Plus de la moitié de nos patients (64.1%) présentaient des valeurs de LDL-chol au delà du 95^{ième} percentile. Nous avons donc recherché les mutations fréquentes du gène du récepteur des LDL chez les canadiens français. De manière surprenante, 16 de ces patients se sont avérés être des HF prouvés, ce qui représente 36.4% des patients pour qui l'ADN était disponible. Nous avons sélectionné nos patients en ne tenant compte que des valeurs élevées de TG, ce qui confirme que l'HF peut se présenter avec une hypertriglycéridémie associée. En raison de l'effet fondateur, nous trouvons une fréquence deux fois plus élevée de HF au Québec que dans le reste du monde (Bétard et coll, 1992); ceci se reflète dans le fait que 12 des 16 patients HF prouvés présentent la même mutation du gène du récepteur des LDL, la grande délétion de > 15 kb. Nous retrouvons ce même phénomène chez nos patients étudiés pour une hypercholestérolémie (Assouline et coll,

1995). Le défaut génétique démontré chez les patients HF est responsable de l'augmentation significative des valeurs moyennes de chol-total, LDL-chol et d'apo B, ainsi que d'une histoire familiale d'athérosclérose précoce plus fréquente, par rapport aux patients sans mutation décelée. Le groupe sans mutation décelée est caractérisé par une augmentation significative de la fréquence d'obésité, des valeurs de TG et de l'apo AI, reflétant une étiologie plutôt multifactorielle.

En conclusion: 1) seulement 11.5% des enfants d'origine canadienne française vus à notre clinique des lipides présentent une hypertriglycémie; 2) la majorité de ces patients ont une histoire parentale positive d'hyperlipidémie et/ou une histoire familiale d'athérosclérose précoce; cette histoire familiale d'athérosclérose précoce est sensiblement prédominante chez le groupe de patients avec HF prouvée; 3) l'obésité est fréquemment associée à une hypertriglycémie; 4) l'hypertriglycémie de nos patients ne semble pas être expliquée par un état hétérozygote pour un déficit en LPL; 5) 30% des patients sont des hétérozygotes pour une mutation du gène du récepteur des LDL (HF prouvée); et 6) le génotype apo E 3/4 est plus fréquent chez nos patients que chez nos témoins.

Chapitre V

Familial hypercholesterolemia: molecular, biochemical, and clinical characterization of a French-Canadian pediatric population.

Étude dont le sujet a été traité dans un article publié (Assouline et col, 1995). L'article est incorporé ici sous forme d'une photocopie du tiré à part.

En tant que coauteur dans cet article, j'ai collaboré à la révision des dossiers des patients pour leur inclusion dans l'étude, à l'extraction de l'ADN des leucocytes, au dépistage moléculaire des mutations recherchées et à l'analyse des résultats.

Familial Hypercholesterolemia: Molecular, Biochemical, and Clinical Characterization of a French-Canadian Pediatric Population

Linda Assouline, BSc*; Emile Levy, Ph.D*; Juan Carlos Feoli-Fonseca, MD‡; Caroline Godbout, MSc§; and Marie Lambert, MD‡

ABSTRACT. *Background.* Familial hypercholesterolemia (FH) is a dominantly-inherited disorder attributable to a defect in the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene. Five mutations at this locus have been identified in French-Canadians. In children, it may be difficult to clinically distinguish FH from other forms of polygenic or monogenic hyperlipidemia. Therefore, our objectives were to define the molecular basis of our subjects' hypercholesterolemia, to characterize their biochemical phenotype in relation to the underlying molecular defect, and to assess their response to chronic dietary therapy.

Methods. We studied 88 unrelated French-Canadian children with a persistent increase in LDL cholesterol and a parental history of hyperlipidemia. Baseline and end-of-diet lipid and apolipoprotein levels were measured. Mutational analysis at the LDL receptor gene locus was performed.

Results. Heterozygosity for the common French-Canadian LDL receptor gene >10-kb deletion was found in 57% of subjects (group 1), 14% carried one of the other four previously characterized LDL receptor gene mutations (group 2), and none of the five molecular defects tested was detected in 29% (group 3). Total cholesterol, LDL cholesterol, and apolipoprotein B baseline levels were similar among these three groups but significantly higher than in control subjects. However, there was wide interindividual variability even among those carrying the same mutation. Significantly lower baseline levels of high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 were found in group 1 compared with group 3 and the controls. The response to diet was similar among the three groups with an average reduction in the mean level of total cholesterol of 4.4%.

Conclusions. The frequency of proven FH heterozygotes (71%) was remarkable in the pediatric population studied. Our data suggest that, in children, a persistent primary increase in LDL cholesterol associated with a parental history of hyperlipidemia is a good predictor of an underlying monogenic disorder as opposed to a polygenic disorder, at least in French-Canadians. Only molecular analysis allowed us to unequivocally define the cause of our patients' hypercholesterolemia. Most children with familial hyperlipidemia did not reach desirable plasma lipid levels solely under diet therapy. *Pediatrics* 1995;96:239-246; *familial hypercholesterolemia, children, LDL receptor, LDL cholesterol, diet therapy.*

ABBREVIATIONS. LDL, low-density lipoprotein; htzFH, heterozygous familial hypercholesterolemia; FH, familial hypercholesterolemia; HDL, high-density lipoprotein; Apo A1, apolipoprotein A1; Apo B, apolipoprotein B; PCR, polymerase chain reaction; LPL, lipoprotein lipase.

Atherosclerotic coronary heart disease is an important public health problem in North America. Studies have shown that atherosclerosis begins in childhood and that the risk factors involved are the same as for adults (for review, see reference 1). An elevated level of cholesterol transported by low-density lipoprotein (LDL) is one of the major risk factors positively related to the degree of arterial lesions of atherosclerosis. Moreover, it has been demonstrated that lowering the plasma levels of total cholesterol and LDL cholesterol by means of diet and/or drug therapy is associated with a reduced risk of coronary heart disease in adults. Therefore, preventing cardiovascular disease appears possible. The American Academy of Pediatrics and the National Cholesterol Education Program for Children have recently recommended the early identification and treatment of children with primary hyperlipidemia.^{1,2}

Heterozygous familial hypercholesterolemia (htzFH) is a dominantly-inherited form of primary hyperlipidemia attributable to a defect in the LDL receptor gene.³ French-Canadians from the province of Québec show a higher frequency of htzFH (1/270) compared with most countries (1/500) of the western world.⁴ Five mutations at the LDL receptor locus—two large deletions and three missense mutations—have been identified in the French-Canadian population.⁵⁻⁷ Altogether these five mutations accounted for 97% (58/60) of the mutant alleles found in 30 patients diagnosed with homozygous familial hypercholesterolemia (FH) in this province between 1969 and 1992.⁸ These mutations have different effects on the function of the LDL receptor. The most common mutation is a large (>10-kb) deletion that removes the promoter and first exon of the gene, thus abolishing the production of messenger RNA from the mutant allele and, consequently, that of protein.⁸ Another deletion (5-kb) removes exons 2 and 3 of the gene and produces a binding defective allele.⁹ A missense mutation in exon 3 (W66G) is also associated with the production of a binding defective allele.⁹ Missense mutations in exon 4 (E207K) and exon 14 (C646Y) produce transport defective peptides that are completely (C646Y) or partially (E207K) blocked

From the Departments of *Nutrition and †Pediatrics, Hôpital Sainte-Justine and Université de Montréal and the §Department of Mathematics and Statistics, Université de Montréal, Québec, Canada.

Received for publication Aug 2, 1994; accepted Nov 18, 1994.

Reprint request to (M.L.) Service de génétique médicale, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5. PEDIATRICS (ISSN 0031 4005). Copyright © 1995 by the American Academy of Pediatrics.

in their translocation from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus.⁷

In a pediatric population, it is difficult to suspect and confirm the diagnosis of htzFH. Indeed, the child or adolescent who is a FH heterozygote will usually have a normal physical examination because tendon xanthomas are rarely found before the age of 10 years, and only 10 to 15% develop tendon xanthomas in the second decade.³ Moreover, the clinical manifestations of atherosclerosis are rare in children with htzFH.¹⁰ However, premature development of coronary heart disease in about half of their parents, by age 50 years in htzFH fathers and by age 60 years in htzFH mothers,³ provides a strong incentive for the early detection and treatment of these individuals.

Clinical and biochemical criteria have been proposed to help in the diagnosis of htzFH in the pediatric population.^{1,11} The sensitivity and specificity of these criteria have rarely been tested. In their study of kindreds with FH, Kwiterovich et al¹⁰ showed that the use of LDL cholesterol levels (cutpoint = 164 mg/dL or 4.24 mmol/L) to diagnose affected children was associated with 16% misclassification (7.2% false positives and 9.7% false negatives). To the best of our knowledge, no large pediatric studies have thus far been published using either direct detection of mutations or functional assay of the LDL receptor to identify their subjects. Therefore, the objectives of our investigation were: 1) to determine the minimum frequency of subjects with certain htzFH among French-Canadian children referred to the lipid clinic of our institution; 2) to characterize the biochemical phenotype of htzFH children according to the different mutations; 3) to assess whether lipid and lipoprotein profiles of htzFH children are distinguishable from those of children with other familial hypercholesterolemic disorders; and 4) to evaluate the efficacy of our chronic dietary intervention.

METHODS

Study Subjects

The charts of all patients who attended the lipid clinic of Hôpital Sainte-Justine between 1990 and 1992 were reviewed for potential participation in the study. In total, 88 patients were selected. The criteria for inclusion were as follows: 1) plasma LDL cholesterol levels persistently (minimum of three measurements) above 130 mg/dL (3.36 mmol/L) while not receiving any lipid-lowering medication; 2) age 18 years or less; 3) a positive parental history of hyperlipidemia; and 4) French-Canadian ancestry. This cutpoint LDL cholesterol was chosen because the National Cholesterol Education Program has classified children who have LDL cholesterol persistently above 130 mg/dL (3.36 mmol/L) as having high levels necessitating intervention.¹ Patients with concomitant conditions such as diabetes mellitus, kidney, thyroid, or hepatic disorders were excluded. All patients enrolled in the study were unrelated to each other up to the third degree or more. Subjects who were on lipid-lowering medications or any drugs that affect lipoprotein metabolism (except for oral contraceptives) at their first visit to the clinic were not eligible. The baseline clinical and biochemical characteristics of all subjects were those from their first visit at our lipid clinic. A positive family history of premature atherosclerosis was defined as coronary or peripheral vascular disease at or before the age of 55 years in a parent, grandparent, aunt, or uncle. The study was approved by the hospital Ethics Committee, and informed consent was obtained from the parents and/or patients.

Sixty-seven of the 88 participants attended the clinic for 6 months or more and were older than 2 years of age at their first

visit. Data from these 67 subjects were used to evaluate the efficacy of chronic dietary intervention. End-of-diet lipid and lipoprotein levels were the last measurements available before the introduction of lipid-lowering medication or those of the most recent visit to the clinic if the patient was on no lipid-lowering drug. All study participants received our routine nutritional intervention. At their first visit to the clinic, the patients and their parents were given a food frequency questionnaire for completion at home while not changing their usual food habits. After confirmation of persistent hyperlipidemia, they met with a registered dietician who reviewed their food frequency questionnaire and counseled them on the general principles of a low-fat diet. They were instructed to keep a 3-day dietary record for the next visit 1 month later. After reviewing this 3-day record, individual counseling was provided with written recommendations based on the patient's daily total energy requirements. They were advised that total fat should represent <30% of total energy intake and that saturated fat was to be restricted to <10% of total energy intake. Daily cholesterol was to be limited to <125 mg/1000 kcal/day or less than 300 mg/day, whichever was less. After these two initial sessions, the patients and their parents met regularly with the dietician at each clinic visit every 3 to 8 months for further counseling and reinforcement.

Biochemical Analyses

Blood samples were collected in 1 mg/mL ethylenediaminetetraacetic acid after a 12 hour overnight fast. Total cholesterol and triglycerides were determined enzymatically with a commercial kit (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) as described elsewhere.¹² High-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured after precipitation of very low-density lipoprotein and LDL with phosphotungstic acid.¹³ LDL cholesterol was calculated using the Friedewald equation.¹⁴ Plasma concentrations of apolipoprotein A1 (apo A1) and apolipoprotein B (apo B) were assessed by nephelometry using a commercial standard supplied by Hoechst-Roussel, Canada, Inc (Montréal, Canada) as reported previously.¹⁵

Molecular Analyses

Genomic DNA was prepared from white blood cells as described earlier.¹⁶ Southern blot analysis was used to detect >10-kb and 5-kb LDL receptor gene deletions.¹⁴ The methods for point mutation detection were as follows. W66G was demonstrated after polymerase chain reaction (PCR) amplification of exon 3⁹ and digestion of the amplification product with the restriction enzyme BslI (New England Biolabs, Beverly, MA); the presence of the mutation introduces a new restriction site for BslI and thus generates distinct restriction fragments. E207K was detected after PCR amplification of exon 4⁹ and digestion of the amplification product with the restriction enzyme MnlI (New England Biolabs); the presence of the mutation abolishes a restriction site for MnlI. C646Y was screened with allele-specific oligonucleotides as described by Leitersdorf et al.⁷ G188E in exon 5 of the lipoprotein lipase (LPL) gene was detected after PCR amplification of exon 5 and digestion of the amplification product with the enzyme AvaII as described by Monsalve et al.¹⁷ P207L in the LPL gene was screened by mismatch PCR.¹⁸ R3500Q in exon 26 of the apo B gene was detected by mismatch PCR followed by digestion of the amplification product with MspI (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD).¹⁹

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SAS statistical software (Release 6.07, SAS Institute Inc, 1989, Cary, NC). Descriptive statistics were computed first. Then, groups were compared by standard analysis of variance followed, when required, by Fisher's LSD (Least Significant Difference) multiple comparisons procedure to detect group differences. The homogeneity of categorical variables among the different groups were assessed by the χ^2 test. All comparisons were conducted at a 5% significance level. Z scores were determined for the body mass index (weight/height²) because reference values varied according to age in children.²⁰ Only patients older than 5 years at their first visit were considered for calculation of Z scores because no reference values were available for younger children. Z scores were calculated according to the following formula: $Z_i = (X_i - X_{avg})/SD$ where X_i is the value recorded for an individual, X_{avg} is the mean value,

and SD is the standard deviation for age in the population. The percent change in plasma lipid and apolipoprotein levels was defined as [(end-of-diet value - baseline value)/baseline value] × 100. The control group was comprised of 41 subjects age- and sex-matched with children of group 1.

RESULTS

We studied 88 unrelated French-Canadian children who persistently presented LDL cholesterol levels >130 mg/dL (3.36 mmol/L) with a parental history of hyperlipidemia. Our first objective was to define the molecular basis of their hypercholesterolemia. Heterozygosity for the common French-Canadian LDL receptor gene mutation (>10-kb deletion) was found in 50 subjects (57%; group 1). The presence of one of the other four LDL receptor gene mutations previously identified in this population was noted in 12 patients (14%; group 2) (5-kb deletion, n = 1; W66G, n = 2; E207K, n = 1; C646Y, n = 8). None of these five mutations was detected in 26 children (29%; group 3). The ligand for the LDL receptor is apo B, and a mutation at the apo B locus (R3500Q) is known to produce a phenotype similar to that of FH.²¹ None of the group 3 subjects was heterozygous for this mutation. Multiple lipoprotein phenotypes have been associated with the heterozygote state for LPL deficiency.²² The carrier state for this deficiency is particularly common in French-Canadians with a minimal frequency of 1/139, and two mutations at the LPL locus (G188E and P207L) account for 95% of mutant alleles.²³ We speculated that heterozygosity for a LPL gene mutation might be responsible for the familial hyperlipidemia of some of our group 3 children, especially those with type IIIb hyperlipidemia (4/26); however, neither of the two frequent LPL gene mutations was detected in our population.

Table 1 shows the characteristics of the study participants at their first visit to the clinic. The three groups were similar with respect to age, weight, height, body mass index, Z score for body mass index, pubertal stage, and family history of premature atherosclerosis. The male to female ratio was different in groups 1 and 2 compared with group 3.

On physical examination, only one patient in group 1 displayed arcus corneae and none had xanthomas. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the use of oral contraceptives were very low and similar among the three groups.

Baseline plasma lipid and apolipoprotein values are presented in Table 2. Total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B were similar among the three groups of hypercholesterolemic children. As expected, these values were significantly increased compared with those of the controls. Differences in HDL cholesterol and apo A1 values were observed among the three groups of hypercholesterolemic children as well as between them and the controls. The >10-kb deletion group had reduced HDL cholesterol and apo A1 levels compared with group 3 and the controls. The same trend was seen for group 2 but did not reach statistical significance. Triglyceride levels were similar among the 3 groups of hyperlipidemic children. However, triglyceride levels in groups 1 and 3 were significantly higher than in control subjects.

The total to HDL cholesterol ratio, a well-characterized biochemical risk factor for atherosclerosis,²⁴ was elevated in the three groups of hypercholesterolemic subjects (Table 2); the >10-kb deletion group had the highest ratio, which was statistically different from that of groups 2 and 3. As a crude index of the relative composition of lipoprotein, we examined the ratio of LDL cholesterol to apo B and that of HDL cholesterol to apo A1. As expected, the LDL cholesterol to apo B ratios of groups 1, 2, and 3 were higher than that of the controls indicating that their LDL were enriched in cholesterol in comparison with normal subjects. However, the three groups of hyperlipidemic subjects were similar with respect to this LDL cholesterol to apo B ratio. We did not observe group differences in the HDL cholesterol to apo A1 ratios.

The levels of several lipids and apolipoproteins were highly intercorrelated. When baseline data from all hyperlipidemic subjects were analyzed together, total cholesterol level was significantly correlated with apo B ($r = 0.83$; $P = .0001$), LDL cholesterol

TABLE 1. Characteristics of the Study Participants

	Group 1* (n = 50)	Group 2* (n = 12)	Group 3* (n = 26)	P values†
Sex (M:F)	31:19	8:4	8:18	.021
Age‡ (y)	8.79 ± 4.00	9.12 ± 4.16	8.31 ± 3.31	.8033
Weight‡ (kg)	30.40 ± 14.63	31.96 ± 15.30	31.19 ± 16.32	.9420
Height‡ (cm)	129.2 ± 25.0	131.0 ± 25.4	129.8 ± 21.9	.9730
BMI‡ (kg/m ²)	17.02 ± 2.90	17.33 ± 2.74	17.30 ± 3.45	.9084
Z score for BMI‡	-0.03 ± 0.93	0.05 ± 0.57	0.05 ± 0.96	.9356
Prepubertal (%)	74	67	72	.882
Presence of tendon xanthomas (%)	0	0	0	
Presence of arcus corneae (%)	2	0	0	
Alcohol intake (%)	0	0	0	
Cigarette smoking (%)	2	0	0	
Oral contraceptive users (%)	0	8.3	0	
Positive family history of premature atherosclerosis (%)	84	75	77	.658

* Group 1: > 10-kb deletion; group 2: one of the other four mutations; group 3: none of the five mutations tested.

† P values for between group comparisons by standard analysis of variance.

‡ mean ± SD.

BMI, body mass index.

TABLE 2. Baseline Plasma Lipid and Apolipoprotein Levels

	Group 1* (n = 50)	Group 2* (n = 12) mean ± SD	Group 3* (n = 26)	P values†	Control (n = 41) mean ± SD	P values‡
Total cholesterol (mg/dL)	299 ± 49	264 ± 37	284 ± 60	.1000	150 ± 24	.0001
LDL cholesterol (mg/dL)	240 ± 49	206 ± 41	219 ± 58	.0628	88 ± 24	.0001
Apo B (mg/dL)	176 ± 38	159 ± 44	161 ± 42	.2112	80 ± 17	.0001
HDL cholesterol (mg/dL)	40 ± 11	41 ± 8	47 ± 10	.0250	48 ± 14	.0030
Apo A1 (mg/dL)	117 ± 19	122 ± 15	133 ± 17	.0026	140 ± 21	.0001
Triglycerides (mg/dL)	91 ± 43	83 ± 27	95 ± 43	.6980	70 ± 29	.0206
Total: HDL cholesterol ratio	7.91 ± 2.16	6.65 ± 1.95	6.32 ± 1.84	.0041	3.29 ± 0.91	.0001
LDL cholesterol: apo B ratio	1.37 ± 0.20	1.32 ± 0.17	1.37 ± 0.17	.7832	1.10 ± 0.20	.0001
HDL cholesterol: apo A1 ratio	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.35 ± 0.06	.2011	0.34 ± 0.07	.4731

* Group 1: > 10-kb deletion; group 2: one of the other four mutations; group 3: none of the five mutations tested.

† P values for comparison by standard analysis of variance between groups 1, 2 and 3.

‡ P values for comparison by standard analysis of variance between groups 1, 2, 3 and the controls.

To convert values for cholesterol to mmol/L multiply by 0.02586. To convert values for triglycerides to mmol/L, multiply by 0.01129.

with apo B ($r = 0.84$; $P = .0001$), and HDL cholesterol with apo A1 ($r = 0.75$; $P = .0001$). HDL cholesterol and triglyceride levels were inversely related ($r = -0.39$; $P = .0002$). No significant relationship between HDL cholesterol and LDL cholesterol was observed ($r = -0.06$; $P = .5881$).

Defective plasma LDL clearance is a direct consequence of mutations at the LDL receptor locus. However, despite this direct causal relationship, we noted wide interindividual variations in plasma baseline total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B values among the different subjects with proven htzFH (Figure 1). This wide variability was seen even among patients heterozygote for the same mutation (>10-kb deletion) and was similar to that shown by hypercholesterolemic children for whom no mutation was detected. This heterogeneity in the biochemical expression of htzFH within the same mutation could not be explained by an effect of sex (P values for comparisons between males and females = .9331, .9931, and .4322 for total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B, respectively), age ($r = 0.07, 0.08, \text{ and } 0.09$ for correlations with total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B, respectively; $P > .05$ for all), pubertal status (P values for comparisons between prepubertal and pubertal children = .7742, .6848, and .4793 for total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B, respectively), body mass index ($r = 0.18, 0.12, \text{ and}$

0.04 for correlations with total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B, respectively; $P > .05$ for all) or Z score for body mass index ($r = 0.12, 0.05, \text{ and } -0.05$ for correlations with total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B, respectively; $P > .05$ for all). Alcohol intake, cigarette smoking, and oral contraceptive use were very low and could not have contributed to this variability. There was no difference between subjects with and without a family history of premature atherosclerosis with respect to total cholesterol ($P = .4541$), LDL cholesterol ($P = .5241$), or apo B ($P = .4734$). The same conclusions were drawn when data (not shown) from all hypercholesterolemic children were pooled and analyzed together.

To study the effect of chronic dietary intervention on cholesterol levels, we analyzed the data on 67 participants who attended the clinic for 6 months or more and were older than 2 years of age at their first visit. The mean duration of follow-up was 1.11 years for group 1, 1.26 years for group 2, and 1.34 years for group 3. This duration was similar among the 3 groups ($P = .2761$). Table 3 shows the percent change in lipid and apolipoprotein levels at the end of the dietary intervention. The effect of the intervention was similar among the three groups; therefore, we pooled their data for subsequent analyses. We observed a significant 4.4% average reduction in the mean level of total cholesterol after dietary intervention. The

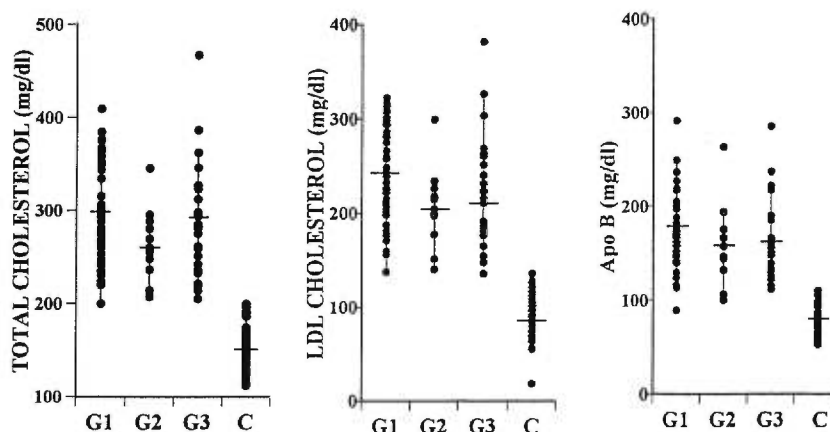


Figure. Distribution of baseline levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B among three groups of hypercholesterolemic children and control subjects. G1, >10-kb deletion group; G2, one of the other four mutations; G3, none of the five mutations tested; C, control.

TABLE 3. Percent Change in Lipid and Apolipoprotein Levels After Dietary Intervention

	Group 1* (n = 38)	Group 2* (n = 11)	Group 3* (n = 18)	Groups 1, 2, and 3 (n = 67)	P values†
	mean % change (95% confidence interval)				
Total cholesterol	-4.9 (-9.0 to -0.8)	-3.9 (-12.8 to 4.9)	-3.7 (-10.3 to 2.9)	-4.4 (-7.5 to -1.4)	.0206
LDL cholesterol	-5.5 (-10.2 to -0.7)	-3.5 (-14.6 to 7.6)	-2.4 (-10.4 to 5.7)	-4.3 (-8.0 to -0.6)	.0600
Apo B	2.1 (-4.7 to 8.9)	-6.0 (-17.9 to 5.9)	8.9 (-1.9 to 19.8)	2.8 (-2.3 to 7.9)	.7842
HDL cholesterol	-0.7 (-7.8 to 6.4)	0.4 (-12.9 to 13.7)	-2.0 (-8.8 to 4.8)	-0.9 (-5.6 to 3.8)	.2728
Apo A1	5.4 (-1.1 to 11.9)	5.0 (-6.1 to 16.2)	2.6 (-6.1 to 11.3)	4.5 (0.03 to 9.0)	.1637
Triglycerides	19.8 (1.3 to 38.4)	-13.2 (-28.1 to 1.7)	-10.3 (-24.7 to 4.0)	6.3 (-5.5 to 18.1)	.2109
Total: HDL cholesterol ratio	-0.8 (-7.5 to 5.9)	-1.9 (-14.0 to 10.1)	-0.4 (-9.1 to 8.3)	-0.9 (-5.5 to 3.7)	.3848

* Group 1: > 10-kb deletion; group 2: one of the other four mutations; group 3: none of the five mutations tested.

† P values for comparisons between baseline and end-of-diet levels for all hypercholesterolemic children irrespective of their mutational group.

mean level of LDL cholesterol tended to decline but this decrease did not reach statistical significance. We detected no significant change in mean apo B, HDL cholesterol, apo A1, and triglyceride levels and in the mean ratio of total to HDL cholesterol. The percent changes in total cholesterol, LDL cholesterol, apo B, HDL cholesterol, apo A1, and triglycerides were inversely related to their baseline values ($r = -0.27, -0.24, -0.34, -0.54, -0.33, -0.42$, respectively; $P < .05$ for all). Pubertal subjects showed more marked changes in mean HDL cholesterol at the end of the period of dietary intervention (-8.6%) than prepubertal children (2.2%, $P = .0422$). Pubertal status did not significantly influence the percent change of other lipid and apolipoprotein levels. We examined the effect of sex, age, body mass index, Z score for the body mass index, duration of the follow-up period, and presence of a family history of premature atherosclerosis upon the response to dietary intervention. None of these factors influenced this response (data not shown).

DISCUSSION

In the hypercholesterolemic population studied, 71% of children were found to have htzFH based on mutational analysis. This is an extremely high frequency. Pediatric studies have seldom attempted to classify subjects who have hyperlipidemia with a parental history of hyperlipidemia according to the underlying defect. No pediatric investigations using definitive diagnostic methods are available for comparison. Cortner et al²⁵ examined 97 families with a history consistent with dominantly-inherited hyperlipidemia and found that 21% had FH, 67% had familial-combined hyperlipidemia, 11% had familial hyperapobetalipoproteinemia, and 1% had familial hypertriglyceridemia.

Many factors could account for the high frequency of htzFH in our hypercholesterolemic population. First, our subjects were chosen from a population attending a reference clinic which, in itself, constituted a biased selection. However, we were very careful to exclude patients related to a subject already enrolled in the study. The 88 children who

entered the study were referred by 72 different physicians (36 specialists and 36 general practitioners). Thus, we sampled a large segment of the population at risk and not a small subgroup that might have had peculiar characteristics. Second, although we used a cutpoint that might appear not to be stringent (LDL cholesterol >130 mg/dL or 3.36 mmol/L), we included only subjects with persistently high levels, which might help to exclude those with polygenic hypercholesterolemia and thus enrich the sample in subjects with true monogenic disorders. Third, it is known that a founder effect is partly responsible for the high prevalence of htzFH among French-Canadians.²⁶ This effect is easily observed in our population where 57% of our hypercholesterolemic children carried the same mutation. Undoubtedly, this founder effect contributed to modification of the relative proportion of different monogenic hypercholesterolemic disorders present in our population. However, despite these three characteristics of the study population, our selection criteria left room for various etiologies, and yet the frequency of htzFH in our high-risk pediatric population appeared very high compared with that found in high-risk adult populations.^{27,28} Our data suggest that, in children, a persistent primary increase in LDL cholesterol associated with a parental history of hyperlipidemia is a good predictor of an underlying monogenic disorder as opposed to a polygenic disorder, at least in French-Canadians. Obviously this hypothesis will require further evaluation in a larger prospective study.

As expected, physical examination was not helpful in suspecting the correct diagnosis as only one patient presented arcus corneae and none had xanthomas. In contrast to most other forms of hyperlipidemia associated with coronary heart disease, FH is not related to obesity,²⁹ and our pediatric subjects with htzFH were not an exception to this rule as demonstrated by their Z score for the body mass index. Thus, in the absence of universal screening, a positive family history of hyperlipidemia and/or premature coronary heart disease will remain the

determining clue leading to the diagnosis of htzFH in children. Although we might overestimate the frequency of premature atherosclerosis among relatives of children with htzFH because of the reporting bias, the impressive figure of 82% (51/62) of our children having a family history of premature atherosclerosis should encourage physicians to record a careful and detailed family history of their pediatric patients to identify this high-risk population. Many studies have demonstrated the limitations of this strategy in identifying hypercholesterolemic children in general.³⁰⁻³⁶ However, family history should be a better predictor of dominant monogenic forms of hypercholesterolemia.

Surprisingly, there are few large ($n > 20$) studies on baseline plasma lipid and apolipoprotein levels in children with htzFH.^{8,10,37,38} The diagnostic criteria used in each of these studies and their reported data are variable. The total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride values of our children with proven htzFH were similar to those published in the large study of Kwiterovich et al¹⁰ ($P = .2878, .1604, .5078, \text{ and } 0.2102$, respectively). To the best of our knowledge, no pediatric data are available for comparison regarding the apo B and apo A1 levels in htzFH.

In FH, the increase in plasma total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B concentrations is causally related to the molecular defect in the LDL receptor. In homozygous FH, both total and LDL cholesterol in plasma have been shown to correlate inversely with the severity of the LDL-receptor deficit, which varies according to the nature of the underlying gene defect.^{8,39} The mean levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B were similar between patients who carried a >10 -kb deletion (group 1) and those exhibiting one of the four other LDL receptor gene mutations (group 2). Thus, although the >10 -kb deletion produces a null allele, its heterozygous expression was not linked with a biochemical phenotype that was markedly more severe than that associated with the expression of one of the other four mutations. However, the small sample size of group 2, in which patients with four different mutations were pooled, could have prevented the detection of a small effect. When we considered the ratio of total to HDL cholesterol, which is a strong predictor of the risk of myocardial infarction, group 1 subjects were more severely affected than those in group 2. Moorjani et al⁸ reported a statistically significant difference between the mean plasma cholesterol concentration (313 mg/dL or 8.1 mmol/L) of children carrying the >10 -kb deletion compared with those carrying the W66G mutation (278 mg/dL or 7.2 mmol/L).

We observed a wide variability in the biochemical expression of htzFH among subjects carrying the same mutation (>10 -kb deletion). This heterogeneity within the same mutation cannot be explained by sex, pubertal status, body mass index, or Z score for the body mass index. In a longitudinal study of seven children with htzFH, Kessling et al⁴⁰ reported an age-dependent increase in total cholesterol levels. We could not confirm this observation in our population as there

was no correlation between age and baseline concentrations of total cholesterol, LDL cholesterol, and apo B. However, our study was cross-sectional and not longitudinal. Alcohol intake, cigarette smoking, and oral contraceptive use were virtually nonexistent and could not have contributed to the variability observed. There was no relationship between the presence or absence of a family history of premature atherosclerosis and total cholesterol, LDL cholesterol, or apo B. Variations in htzFH expression among individuals with the same mutation have been reported.⁴¹⁻⁴⁴ The mechanisms underlying this variability within the same mutation are poorly understood.

Although the basic defect in FH is a deficit in LDL receptor activity, reduced concentrations of plasma HDL cholesterol have been recorded in many patients with htzFH.^{10,45,46} This characteristic adds another risk factor for atherosclerosis for these patients.^{45,46} It is noteworthy that the reduction in plasma HDL cholesterol levels was most apparent in our hypercholesterolemic subjects with proven htzFH. Those with none of the mutations tested had HDL cholesterol similar to control levels. It is tempting to speculate that there is a specific relationship between the anomalies observed in HDL cholesterol concentrations and the molecular defect at the LDL receptor locus; however, the mechanism underlying this relationship is not known. HDL cholesterol concentrations were unrelated to LDL cholesterol. An alternative explanation is that there is a genetic linkage between the LDL receptor locus and a gene locus important for HDL metabolism; then, the biological association observed could have arisen through linkage disequilibrium.

As described by others,^{10,46} we found a negative correlation between plasma HDL cholesterol and triglycerides. Using a cutpoint of 140 mg/dL (1.58 mmol/L) for triglycerides, only 6% (4/62) of our children with confirmed htzFH had type IIb hyperlipidemia, a figure similar to the 10% (10/105) reported by Kwiterovich et al.¹⁰

The molecular defect responsible for hypercholesterolemia in group 3 subjects is unknown. None of the five LDL receptor gene mutations causing FH in French-Canadians was detected. Altogether, these five mutations accounted for 97% (58/60) of the mutant alleles found in the 30 patients diagnosed with homozygous FH in this population between 1969 and 1992.⁸ Therefore, we speculate that a substantial number of group 3 patients are phenocopies rather than true FH heterozygotes. Our data suggest that, in a pediatric population, the precise cause of hypercholesterolemia with a parental history of hyperlipidemia may be very difficult to establish by solely applying usual clinical and biochemical criteria. Indeed, the clinical phenotypes of these group 3 patients, including the family history of premature atherosclerosis and their biochemical phenotypes, were indistinguishable from those with confirmed htzFH.

We assessed the efficacy of chronic dietary intervention in 67 subjects who attended the clinic for >6 months. The dietary response was similar among the three groups of hypercholesterolemic children. We observed a 4.4% average reduction in mean total

cholesterol levels. A similar trend was noted for LDL cholesterol, but it did not reach statistical significance. No significant change was seen in the total to HDL cholesterol ratio. These reductions were less than those anticipated from the results reported in the literature. We reviewed 18 studies published between 1973 and 1993 that evaluated the efficacy of a low-fat low-cholesterol diet in hypercholesterolemic children.^{37,47-63} The designs of these protocols were very different from one another but all involved free-living patients. The average reduction in the mean total cholesterol levels varied from 6% (48) to 20% (49), and half of them showed an average reduction of >10%.^{49-51,53,55-57,60-62} Our results are consistent with those of many previous controlled studies of adult outpatients with hypercholesterolemia. Most of these investigations registered a marginal effect on plasma cholesterol concentration.^{64,65} A possible explanation for the limited effect of our dietary intervention on plasma lipid levels is that all our patients had at least one parent with hyperlipidemia and were already exposed to restricted dietary habits thus minimizing further gains from dietary intervention. Alternatively, inherited hypercholesterolemia may be less responsive to diet therapy. We did not measure compliance to the dietary prescription, and suboptimal compliance could have contributed to the poor response.

There were considerable interindividual variations in the response to diet. Again, this variability was evident even among subjects who carried the same mutation (>10-kb deletion). Such variability has been observed in most other pediatric studies where the question was addressed.^{37,47-49,51,57,59,62} Age, sex, body mass index, Z score for the body mass index, duration of the follow-up period, and family history had no predictive value with respect to cholesterol reduction. This is in agreement with the finding by Mietus-Snyder et al⁵⁹ and Kuehl et al.⁵⁸ The percent changes in lipid and apolipoprotein in our subjects were inversely related to their baseline levels. Glassman et al⁵⁶ found that patients with the highest total and LDL cholesterol levels showed the most important response to dietary modification. In the study by Kuehl et al,⁵⁸ initial total cholesterol concentration had no predictive value. Responsiveness to diet therapy is the result of a complex interaction between the basic defect leading to hypercholesterolemia, other genetic factors, and the environment. At present, it is not possible to predict the response to diet therapy in an individual child. Despite its limitation, dietary intervention remains the initial therapeutic approach to the management of hypercholesterolemia in childhood. However, we must realize that few children with monogenic hypercholesterolemic disorders will reach and maintain desirable plasma lipids levels solely under diet therapy.

Many questions remain unanswered regarding the pathophysiology of FH. It is hoped that the present availability of a definitive molecular diagnosis and the elucidation of gene-gene and gene environment interactions will improve our capability of predicting individual risks of disease and offer appropriate treatments.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a grant from the Fondation de l'hôpital Sainte-Justine.

REFERENCES

1. National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics*. 1992;89:525-584
2. Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics. Statement on cholesterol. *Pediatrics*. 1992;90:469-473
3. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. Toronto, Ontario, Canada: McGraw-Hill; 1989:1215-1250
4. Moorjani S, Roy M, Gagné C, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis*. 1989;9:211-216
5. Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1987;317:734-737
6. Ma Y, Bétard C, Roy M, Davignon J, Kessling AM. Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet*. 1989;36:219-228
7. Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French-Canadian population. *J Clin Invest*. 1990;85:1014-1023
8. Moorjani S, Roy M, Torres A, et al. Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1993;341:1303-1306
9. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 1992;1:445-466
10. Kwiterovich PO Jr, Fredrickson DS, Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia), a study of its biochemical, genetic, and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest*. 1974;53:1237-1249
11. Cortner JA, Coates PM, Liacouras CA, Jarvik GP. Familial combined hyperlipidemia in children: clinical expression, metabolic defects, and management. *J Pediatr*. 1993;123:177-184
12. Lévy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, Lepage G, Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res*. 1988;29:215-226
13. Lopez-Virella MF, Stone P, Ellis S, Cowell JA. Cholesterol determination in high density separated by the different methods. *Clin Chem*. 1977;23:882-891
14. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502
15. Lévy E, Lepage G, Bendayan M, et al. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res*. 1989;30:1197-1209
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
17. Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, et al. A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest*. 1990;86:728-734
18. Bivoet SM, Hayden MR. Mismatch PCR: a rapid method to screen for the Pro207→Leu mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Hum Mol Genet*. 1992;1:541
19. Hansen PS, Rüdiger N, Tybjaerg-Hansen A, Faergeman O, Gregersen N. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J Lipid Res*. 1991;32:1229-1233
20. National Heart, Lung and Blood Institute. *The Lipid Research Clinics Population Studies Data Book, Volume I: The Prevalence Study*. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; July 1980. NIH Publication 80-1527
21. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 1990;31:1337-1349
22. Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis*. 1989;9:326-334
23. Dionne C, Gagné C, Julien P, et al. Genealogy and regional distribution

- of lipoprotein lipase deficiency in French-Canadians of Quebec. *Hum Biol.* 1993;65:29-39
24. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1991;325:373-381
 25. Cortner JA, Coates PM, Gallagher PR. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr.* 1990;116:514-519
 26. Bétard C, Kessling AM, Roy M, Chamberland A, Lussier-Cacan S, Davignon J. Molecular genetic evidence for a founder effect in familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Genet.* 1992;88:529-536
 27. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973;52:1544-1568
 28. Koivisto U-M, Hämäläinen L, Taskinen M-R, Kettunen K, Kontula K. Prevalence of familial hypercholesterolemia among young North Karelian patients with coronary heart disease: a study based on diagnosis by polymerase chain reaction. *J Lipid Res.* 1993;34:269-277
 29. Miettinen TA, Aro A. Comparison of clinical findings in patients with hypertriglyceridaemia and familial hypercholesterolaemia. *Ann Clin Res.* 1973;5:1-6
 30. Dennison BA, Kikuchi DA, Srinivasan SR, Webber LS, Berenson GS. Parental history of cardiovascular disease as an indication for screening for lipoprotein abnormalities in children. *J Pediatr.* 1989;115:186-194
 31. Griffin TC, Christoffel KK, Binns HJ, McGuire PA, and the Pediatric Practice Research Group. Family history evaluation as a predictive screen for childhood hypercholesterolemia. *Pediatrics.* 1989;84:365-373
 32. Shea S, Basch CE, Irigoyen M, et al. Failure of family history to predict high blood cholesterol among Hispanic preschool children. *Prev Med.* 1990;19:443-455
 33. Davidson DM, Van Camp J, Iftner CA, Landry SM, Bradley BJ, Wong ND. Family history fails to detect the majority of children with high capillary blood total cholesterol. *J Sch Health.* 1991;61:75-80
 34. Starc TJ, Belamarich PF, Shea S, et al. Family history fails to identify many children with severe hypercholesterolemia. *Am J Dis Child.* 1991;145:61-64
 35. Steiner NJ, Neinstein LS, Pennbridge J. Hypercholesterolemia in adolescents: effectiveness of screening strategies based on selected risk factors. *Pediatrics.* 1991;88:269-275
 36. Gagliano NJ, Emans SJ, Woods ER. Cholesterol screening in the adolescent. *J Adolesc Health.* 1993;14:104-108
 37. Glueck CJ, Mellies MJ, Dine M, Perry T, Laskarzewski P. Safety and efficacy of long-term diet and diet plus bile acid-binding resin cholesterol-lowering therapy in 73 children heterozygous for familial hypercholesterolemia. *Pediatrics.* 1986;78:338-348
 38. Stein EA. Drug therapy in children and adolescents with familial hypercholesterolemia. *Prog Clin Biol Res.* 1988;255:273-280
 39. Thompson GR, Seed M, Nithyananthan S, McCarthy S, Thorogood M. Genotypic and phenotypic variation in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis.* 1989;9(suppl 1):I-75-I-80
 40. Kessling AM, See M, Taylor R, Wynn V, Humphries. Rising cholesterol levels in children with familial hypercholesterolaemia. *Biomed Pharmacother.* 1990;44:373-379
 41. Hobbs HH, Leitersdorf E, Leffert CC, Cryer DR, Brown MS, Goldstein JL. Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors. *J Clin Invest.* 1989;84:656-664
 42. Vega GL, Hobbs HH, Grundy SM. Low density lipoprotein kinetics in a family having defective low density lipoprotein receptors in which hypercholesterolemia is suppressed. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:578-585
 43. Defesche JC, van de Ree MA, Kastelein JJP, et al. Detection of the Pro664 Leu mutation in the low-density lipoprotein receptor and its relation to lipoprotein(a) levels in patients with familial hypercholesterolemia of Dutch ancestry from The Netherlands in Canada. *Clin Genet.* 1992;42:273-280
 44. Kotze MJ, Davis HJ, Bisshart S, Langenhoven E, Brusnick J, Oosthuizen CJ. Intrafamilial variability in the clinical expression of familial hypercholesterolemia: importance of risk factor determination for genetic counselling. *Clin Genet.* 1993;43:295-299
 45. Streja D, Steiner G, Kwiterovich PO Jr. Plasma high-density lipoproteins and ischemic heart disease. Studies in a large kindred with familial hypercholesterolemia. *Ann Intern Med.* 1978;89:871-880
 46. Moorjani S, Gagné C, Lupien PJ, Brun D. Plasma triglycerides related decrease in high-density lipoprotein cholesterol and its association with myocardial infarction in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism.* 1986;35:311-316
 47. Glueck CJ, Fallat R, Tsang R. Pediatric familial type II hyperlipoproteinemia: therapy with diet and cholestyramine resin. *Pediatrics.* 1973;52:669-679
 48. Glueck CJ, Fallat RW, Mellies M, Tsang RC. Pediatric familial type II hyperlipoproteinemia: therapy with diet and colestipol resin. *Pediatrics.* 1976;57:68-74
 49. Rose V, Allen DM, Pearse RG, Chapell J. Primary hyperlipoproteinemia in childhood and adolescence: identification and treatment of persons at risk for premature atherosclerosis. *Can Med Assoc J.* 1976;115:753-757
 50. Farah JR, Kwiterovich PO, Neill CA. Dose-effect relation of cholestyramine in children and young adults with familial hypercholesterolemia. *Lancet.* 1977;1:59-63
 51. Glueck CJ, Tsang RC, Fallat RW, Mellies MJ. Diet in children heterozygous for familial hypercholesterolemia. *Am J Dis Child.* 1977;131:162-166
 52. Stein EA, Shapero J, McNeerney C, Glueck CJ, Tracy T, Gartside P. Changes in plasma lipid and lipoprotein fractions after alteration in dietary cholesterol, polyunsaturated, saturated, and total fat in free-living normal and hypercholesterolemic children. *Am J Clin Nutr.* 1982;35:1375-1390
 53. Kwiterovich PO Jr, Bachorik PS, Franklin FA, et al. Effect of dietary treatment on the plasma levels of lipids, lipoprotein cholesterol and LDL B protein in children with type II hyperlipoproteinemia. *Prog Clin Biol Res.* 1985;188:123-137
 54. Vartiainen E, Puska P, Pietinen P, Nissinen A, Leino U, Uusitalo U. Effects of dietary fat modifications on serum lipids and blood pressure in children. *Acta Paediatr Scand.* 1986;75:396-401
 55. Widhalm K. Dietary treatment of hypercholesterolemia in children: recent aspects. *Prog Clin Biol Res.* 1988;255:219-230
 56. Glassman M, Spark A, Berezin S, Schwarz S, Medow M, Newman LJ. Treatment of type IIa hyperlipidemia in childhood by a simplified American Heart Association diet and fiber supplementation. *Am J Dis Child.* 1990;144:973-976
 57. Pradines S, Bost M, Dietsch J, Chambon E. La diététique dans les hypercholestérolémies familiales type IIa. Enquête grenobloise 1983-1988. *Pédiatrie.* 1990;45:599-604
 58. Kuehl KS, Cockerham JT, Hitchings M, Slater D, Nixon G, Rifai N. Effective control of hypercholesterolemia in children with dietary interventions based in pediatric practice. *Prev Med.* 1993;22:154-166
 59. Mietus-Snyder M, Baker AL, Neufeld EJ, et al. Effects of nutritional counseling on lipoprotein levels in a pediatric lipid clinic. *Am J Dis Child.* 1993;147:378-381
 60. Ohta T, Nakamura R, Ikeda Y, Hattori S, Matsuda I. Follow up study on children with dyslipidaemia detected by mass screening at 18 months of age: effect of 12 months dietary treatment. *Eur J Pediatr.* 1993;152:939-943
 61. Polonsky SM, Bellet PS, Sprecher DL. Primary hyperlipidemia in a pediatric population: classification and effect of dietary treatment. *Pediatrics.* 1993;91:92-96
 62. Quivers ES, Driscoll DJ, Garvey CD, et al. Variability in response to a low-fat, low-cholesterol diet in children with elevated low-density lipoprotein cholesterol levels. *Pediatrics.* 1992;89:925-929
 63. Widhalm K, Brazda G, Schneider B, Kohl S. Effect of soy protein diet versus standard low fat, low cholesterol diet on lipid and lipoprotein levels in children with familial or polygenic hypercholesterolemia. *J Pediatr.* 1993;123:30-34
 64. Ramsay LE, Yeo WW, Jackson PR. Dietary reduction of serum cholesterol concentration: time to think again. *Br Med J.* 1991;303:953-957
 65. Hunninghake DB, Stein EA, Dujovne CA, et al. The efficacy of intensive dietary therapy alone or combined with lovastatin in outpatients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1993;328:1213-1219

Chapitre VI

Identification of two novel LDL receptor gene defects in French-Canadian pediatric population: mutational analysis and biochemical studies.

Étude dont le sujet a été traité dans un article publié (Assouline et coll, 1997). L'article est incorporé ici sous forme d'une photocopie du tiré à part.

En tant que coauteur dans cet article, j'ai collaboré à la révision des dossiers des patients, à l'échantillonnage des membres des familles étudiées, à l'extraction de l'ADN des leucocytes, au dépistage moléculaire des mutations et à l'analyse des résultats.

RESEARCH ARTICLE

Identification of Two Novel LDL Receptor Gene Defects in French-Canadian Pediatric Population: Mutational Analysis and Biochemical Studies

Linda Assouline,¹ Eran Leitersdorf,^{1,3} Marie Lambert,² Ayeleth Reshef,³ Juan C. Feoli-Fonseca,² and Emile Levy^{1,3*}

¹Department of Nutrition, Hôpital Ste-Justine, Université de Montreal, Québec H3T 1C5, Canada; Fax: 514-345-4999

²Department of Pediatrics, Hôpital Ste-Justine, Université de Montreal, Québec H3T 1C5, Canada

³Division of Medicine, Center for Research, Prevention and Treatment of Atherosclerosis, Hadassah University Hospital, Jerusalem 91120, Israel

Communicated by Charles R. Scriver

Familial hypercholesterolemia (FH) is at least twofold more prevalent in French Canadians from Québec than in most Western populations. Although our recent data confirmed this high frequency of heterozygous FH in our pediatric population with hypercholesterolemia, none of the five established molecular defects for the French-Canadian population was detected in 29% of the unrelated French-Canadian children characterized by a persistent increase in LDL (low density lipoprotein receptor) cholesterol and a positive parental history of hyperlipidemia (Assouline et al., 1995). To probe for new mutations, six of these molecularly undiagnosed children were investigated as index patients. By using single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequencing, two novel mutations were identified in two of these subjects: (1) 7-base pair (bp) duplication following nucleotide 681 (according to the cDNA sequence) in exon 4 (681ins7), which causes a frameshift, the introduction of a stop at codon 208, and premature chain termination, and (2) A to G change in exon 8 substituting a tyrosine for a cysteine at amino acid 354 (Y354C). A third subject carried the recently reported exon 10 mutation (Y468X), whereas the remaining three patients demonstrated various known polymorphisms with no effect on gene product. Rapid molecular assays were developed to detect the two new mutations as well as the Y468X mutation. Screening of our cohort showed heterozygosity in 1/88, in 2/88, and in 2/88 of patients for the 681ins7, the Y354C, and the Y468X mutations, respectively. *Hum. Mutat.* 9:555-562, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: low-density lipoprotein receptor; familial hypercholesterolemia; children; single-strand conformation polymorphism; mutation; atherosclerosis

INTRODUCTION

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder caused by mutations in the LDL receptor gene (Goldstein et al., 1995, for review). The prevalence of FH heterozygotes is ~1 in 500 in Western populations. However, in French Canadians, the frequency of FH has been found to be at least twofold higher due to a founder effect (Moorjani et al., 1989). Until recently, five molecular aberrations had been reported (Minnich et al., 1995, for review). They accounted for 83% of mutant alleles responsible for heterozygous FH in an adult French-Canadian population. These five mutations included two large deletions (>15-kb and 5-kb deletions) and three missense mutations (W66G, E207K, and C646Y).

The recent identification of a new mutation in exon 10 (Y468X) further raises the proportion of French-Canadian heterozygous FH subjects who can be diagnosed directly by mutation detection (Simard et al., 1994).

Atherosclerosis takes root in childhood, and lesions significantly develop in young adulthood (NCEP, 1992). Therefore, early diagnostic and preventive measures are highly recommended for children with primary hyperlipidemia (NCEP, 1992). Recently, we studied the molecular basis of hypercholesterolemia in 88 unrelated French-Canadian children with a persistent increase in LDL (low-density lipoprotein)

Received 12 February 1996; accepted 1 July 1996.

*Correspondence to: Dr. Emile Levy, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec H3T 1C5, Canada.

cholesterol and a parental history of hyperlipidemia (Assouline et al., 1995). Heterozygosity for the common French-Canadian LDL receptor gene deletion (> 15-kb) was found in 57% of subjects, and 14% carried one of the other four previously characterized LDL receptor gene mutations (5-kb deletion, W66G, E207K, C646Y). Although the frequency of proven FH heterozygotes (71%) was remarkable in the pediatric population studied, none of the five common LDL receptor gene mutations nor the apolipoprotein B (apo B) ligand gene mutation (R3500Q) were detected in 29% (26/88 children). These findings prompted us to assess the contribution of new mutant LDL receptor alleles (including the recent Y468X) to explain the hypercholesterolemia shown by these children. Using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and DNA sequencing, we detected two novel molecular aberrations: a 7-bp duplication (681ins7) in exon 4 leading to frameshift and premature chain termination, and a missense mutation in exon 8.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 88 hypercholesterolemia French-Canadian children, unrelated to each other to the third degree or more, with hypercholesterolemia were the subjects of a recent study (Assouline et al., 1995). They all had plasma LDL cholesterol levels persistently above 3.4 mmol/L without other associated disorders, and a parental history of hyperlipidemia. A complete description of this population has been given elsewhere (Assouline et al., 1995). None of the five common French-Canadian mutations at the LDL receptor locus nor the R3500Q mutation at apo B locus were found in 26 patients. Six of them, who are the subject of the present study, volunteered for further investigations including a skin biopsy. The clinical and biochemical characteristics of these subjects were those from their first visit at our lipid clinic; none was on lipid-lowering medications or any drugs that affect lipoprotein metabolism at that time. This study was approved by the hospital ethics committee, and informed consent was obtained from the parents.

Biochemical Analysis

Blood samples were collected in 1 mg/ml EDTA after a 12-hr overnight fast. Plasma was used for lipid and apolipoprotein determinations, whereas blood cells were treated for DNA preparation. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein (HDL) cholesterol, apolipoprotein A1 (apo A1), and apo B were measured as described previ-

ously (Levy et al., 1989). LDL cholesterol levels were calculated using the Friedewald equation.

Fibroblast Culture and LDL Receptor Activity

A skin biopsy was taken from the probands. Explants were cultured in Dulbecco's modification of Eagle's medium (Gibco-BRL, Life Technologies N.Y.) containing 100 IU/ml of penicillin, 50 µg/ml of streptomycin, 2 mM glutamine, and 15% fetal calf serum. The assay of ¹²⁵I-labeled LDL binding, internalization, and proteolytic degradation by cultured skin fibroblasts was performed as previously well described (Levy et al., 1990). Specific receptor activities were calculated by subtracting the nonspecific receptor activities from the total in the respective samples.

SSCP Analysis and DNA Sequencing

Genomic DNA was prepared from white blood cells by standard methods. Oligonucleotides flanking the promoter region and the coding region of each one of the 18 exons, including intronic splice junctions (except for exons 6, 10, 11, 15 and 18) of the LDL receptor gene, were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification of subjects' genomic DNA as described in Reshef et al. (1996). The standard PCR reaction and cycling conditions for each set of primers as well as conditions for SSCP analysis are well discussed in Reshef et al. (1996). Following detection of an abnormal migration pattern, the corresponding region was re-amplified and detection assays for published polymorphisms were performed (Leitersdorf et al., 1989). In cases where the abnormal pattern could not be explained by any currently known polymorphisms for the LDL receptor gene, the fragment was sequenced.

An abnormal pattern not explained by any known polymorphism was found to be located in the 3'-portion of exon 4. For sequencing, we isolated a homoduplex of the mutated allele by PCR amplification of the 3'-half of exon 4, electrophoresis of this PCR product on a 8% polyacrylamide gel to separate the mutated and wild alleles, and excision of the band corresponding to the mutant allele from the gel. DNA sequencing of symmetric PCR templates (100 ng) was performed using the Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit on an Applied Biosystems 373 automated sequencer (Mississauga, Ontario, Canada). Sequences were analysed with the software SeqEd V 1.0 (Applied Biosystems).

Exon 8 PCR product containing both normal and mutated alleles was sequenced directly by the chain-termination DNA sequencing method using a commercial kit (Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit, U.S. Biochemical, La Jolla, CA), according to

instructions supplied by the manufacturer. [³⁵S]-labelled dATP (Dupont-New England Nuclear, Boston, MA) was used for autoradiographic detection of the sequence.

Direct Detection of Mutant Alleles

Heteroduplex analysis was used for direct detection of the 7-bp duplication in exon 4 (681ins7). The entire exon 4 was amplified and DNA fragments were size-fractionated on a 8% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. Examination of the mutated sequence in exon 8 revealed that the missense mutation Y354C creates a restriction site for the enzyme BsoF1 enabling for quick screening using PCR amplification of exon 8 followed by digestion of the amplification product with BsoF1 (New England Biolabs, Beverly, MA). Similarly, exon 10 mutation (Y468X) was demonstrated after PCR amplification of this exon and digestion of the amplification product with BfaI (New England Biolabs).

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical Characteristics of Subjects

We studied six French-Canadian children who were unrelated to each other to the third degree or more, who persistently presented elevated LDL cholesterol levels with a parental history of hyperlipidemia, and who volunteered for skin biopsies. From a previous study they were known not to carry any of the five common French-Canadian mutations at the LDL receptor locus nor the R3500Q mutation at apo B locus (Assouline et al., 1995). Table 1 shows their individual plasma lipid and apolipoprotein values at baseline. In order to understand the molecular basis of their hypercholesterolemia, we assayed the LDL receptor activity of their fibroblasts in culture. The LDL receptor activities of fibroblasts from normal individuals and >15kb deletion FH subjects were used as references for control and affected values, respectively. As seen in Table 2, when their cells were incubated with ¹²⁵I-LDL for 4 hr at 37°C, only one-

third to two-thirds of the normal amount ¹²⁵I-LDL bound to high affinity surface receptor sites. Similarly, the internalization and degradation processes were reduced when compared with those in normal cells.

Neutral Polymorphisms and Y468X Mutation

In an attempt to identify a genetic defect underlying the decrease in LDL receptor activity, we analysed by SSCP all exons and the promotor of the LDL receptor gene of our six patients. Overall, nine anomalous migration patterns were detected, of which six corresponded to the presence of known polymorphisms with no effect on gene product (data not shown). Two anomalous electrophoretic patterns (exons 4 and 8) were noted in two different subjects (patients 1 and 2, respectively), which could not be explained by the existence of such polymorphisms. Furthermore, an abnormal band was apparent in exon 10 of patient 3. PCR amplification of exon 10 from patient-3 DNA, followed by digestion of the amplification product with BfaI (data not shown), revealed the presence of a recently reported mutation in the French-Canadian population (Simard et al., 1994). This mutation, a cytosine to guanine transversion (TAC→TAG), converts tyrosine to stop at codon 468 (Y468X), leading to premature chain termination. The corresponding LDL receptor binding activity of patient-3 fibroblasts was reduced to 29% of controls and was comparable to the residual activity of fibroblasts from a heterozygous FH patient carrying the >15-kb deletion (Table 2). The Y468X mutation was found in another hypercholesterolemic child belonging to our initial cohort (2/88).

Novel 7-bp Duplication in Exon 4

On SSCP analysis, patient-1 DNA displayed an abnormal migration pattern of exon 4. Sequencing of the mutant homoduplex fragment revealed the presence of 7-bp duplication, 5'ATCTGACATCTGAC3', following nucleotide 681 according to the numbering of nucleotides of the cDNA sequence (Yamamoto et

TABLE 1. Lipid, Lipoprotein, and Apoprotein Values of Study Participants

Patients ^a	1	2	3	4	5	6	Controls (n=41) mean±SD
Sex	M	M	F	F	F	F	
Age (Yr, mo)	7,2	4,3	3,0	11,8	10,8	8,3	2-15 (yrs)
TG (mmol/L)	0.91	0.81	0.80	1.69	1.13	0.79	0.79±0.33
TC (mmol/L)	7.14	8.10	7.28	8.35	5.74	7.36	3.89±0.61
LDL-C (mmol/L)	5.77	6.75	5.45	6.52	3.82	5.99	2.28±0.62
HDL-C (mmol/L)	0.96	0.98	1.47	1.06	1.41	1.01	1.25±0.35
Apo A-I (g/L)	1.10	1.25	1.20	1.34	1.53	1.19	1.40±0.21
Apo B (g/L)	1.65	1.63	1.35	1.40	1.31	1.67	0.80±0.17

^aTG, triglycerides; TC, total cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; Apo A-I, apolipoprotein A-I; Apo B, apolipoprotein B. To convert values for cholesterol to mg/dl, multiply by 38.67. To convert values for triglycerides to mg/dl, multiply by 88.57.

TABLE 2. Binding and Metabolism of ^{125}I -LDL in Fibroblasts of Study Participants^c

Subject	Binding	Internalization % of control values	Proteolytic degradation
1	29	69	49
2	67	63	58
3	29	34	33
4	59	67	73
5	49	58	48
6	31	41	28
>15 kb deletion	29	50	42

^cSkin fibroblasts were cultured in medium supplemented with 10% fetal calf serum for 5 days and LDL receptor was upregulated by subsequent 48-hr incubation in medium with lipoprotein deficient serum (LPDS). The medium was replaced by a fresh one containing LPDS, and 10 $\mu\text{g/ml}$ of ^{125}I -LDL in the absence or presence of 500 $\mu\text{g/ml}$ of unlabelled lipoproteins. The binding technique, as well as the internalization and proteolytic degradation, were measured by established methods (17,18). Results are expressed as % of LDL receptor activity observed in healthy control fibroblasts. Data concomitantly obtained from a French-Canadian heterozygote with LDL receptor gene >15 kb deletion are presented as a receptor defective reference value.

al., 1984) and is designated 681ins7 (Fig. 1). This duplication causes a frameshift and the introduction of a stop at codon 208. The LDL-receptor-binding activity of patient-1 fibroblasts was 29% the internal control value, comparable to the LDL receptor activity of fibroblasts from a FH patient heterozygote for the >15-kb deletion (Table 2).

The 681ins7 mutation is easily detected by the PCR amplification of exon 4 and heteroduplex analysis of the amplification product. As seen in Figure 2, the proband's father (I-2) and sister (II-2) amplification products showed the presence of this heteroduplex consistent with their increased plasma concentrations of LDL cholesterol and apo B. In contrast, the mother (I-1) was normolipemic and displayed only a wild-type exon-4 amplification product. Of the 88 unrelated hypercholesterolemic children initially studied (176 chromosomes), no further case carrying the 681ins7 mutation was found.

Small duplications in the LDL receptor gene are rare, with only two other cases reported so far (Hobbs et al., for review, 1992; Cavanaugh et al., 1994) and none ever in exon 4. Five nonsense mutations have been described in exon 4 including a E207X mutation in very close proximity of the stop at codon 208 introduced by the 681ins7 mutation; all resulted in class I defect where mutant allele failed to produce immunoprecipitable LDL receptor protein (Gudnadson et al., 1994). These circumstantial evidences support that this novel mutation is responsible for the FH phenotype segregating in this family and that this duplication may result in a class I defect. Further experiments are needed to definitely proof this last point.

Novel Y354C Mutation in Exon 8

Patient-2 DNA presented an abnormal electrophoretic pattern in exon 8 that failed to correspond to the known Stu I polymorphic site in this exon of

the LDL receptor gene. Direct sequencing of the exon revealed that one allele carried an adenine to guanine transition (TAC \rightarrow TGC), substituting a tyrosine for a cysteine at codon 354 (Y354C) (Fig. 3). The LDL receptor activity of the proband's fibroblasts was mildly affected (67% residual binding activity compared to internal normolipidemic control) (Table 2).

This missense mutation creates a new restriction site for BsoF1, enabling its quick screening. Restriction analysis of PCR-amplification products of exon 8 in the three-generation pedigree of the proband revealed the presence of the Y354C mutation in 7 family members on the maternal side (Fig. 4). Increased LDL cholesterol levels co-segregated with the mutant allele. Among the 88 patients of our original cohort, the Y354C mutation was detected in another patient, unrelated to the third degree or more to the original proband (2/176 chromosomes). This second patient presented markedly elevated plasma LDL cholesterol and apo B values (6.75 mmol/L and 1.63 g/L, respectively). The mutation was not found in the 45 normolipidemic control DNA samples tested (90 chromosomes). Further evidence for the pathogenic nature of this mutation is that it occurs in a highly conserved region of the LDL receptor.

Exons 7-14 of the LDL receptor gene encode a 400 amino acid sequence that is 33% identical to a portion of the human epidermal growth factor (EGF) precursor. (Goldstein et al., 1995, for review). This region includes three growth factor repeats (A, B, and C), which are 40-amino acid cysteine-rich sequences. The EGF precursor homology domain is required for the acid-dependent dissociation of lipoproteins from the receptor in the endosome during receptor recycling (Davis et al., 1987). Observations based on various mutations in the EGF precursor domain also indicate that this region plays a role in favoring the configuration of the receptor protein for

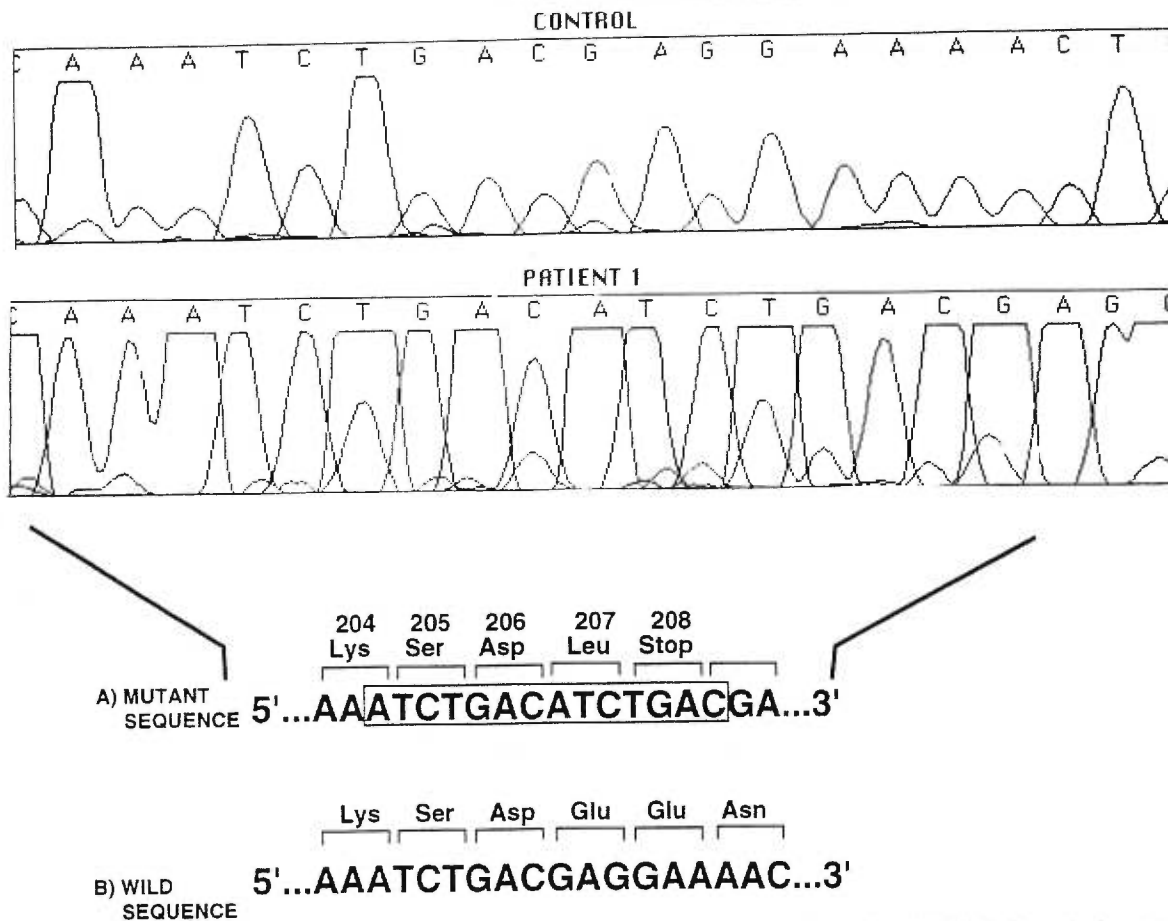


FIGURE 1. Identification of the LDL receptor mutation. The DNA sequence analysis reveals the duplication of 7 bp (ATCTGAC) at codon 206, causing a frameshift and conse-

quently a stop signal at codon 208. This figure is the output of the direct ABI automatic sequencing of the exon 4 PCR product. Box indicates the duplicated sequence.

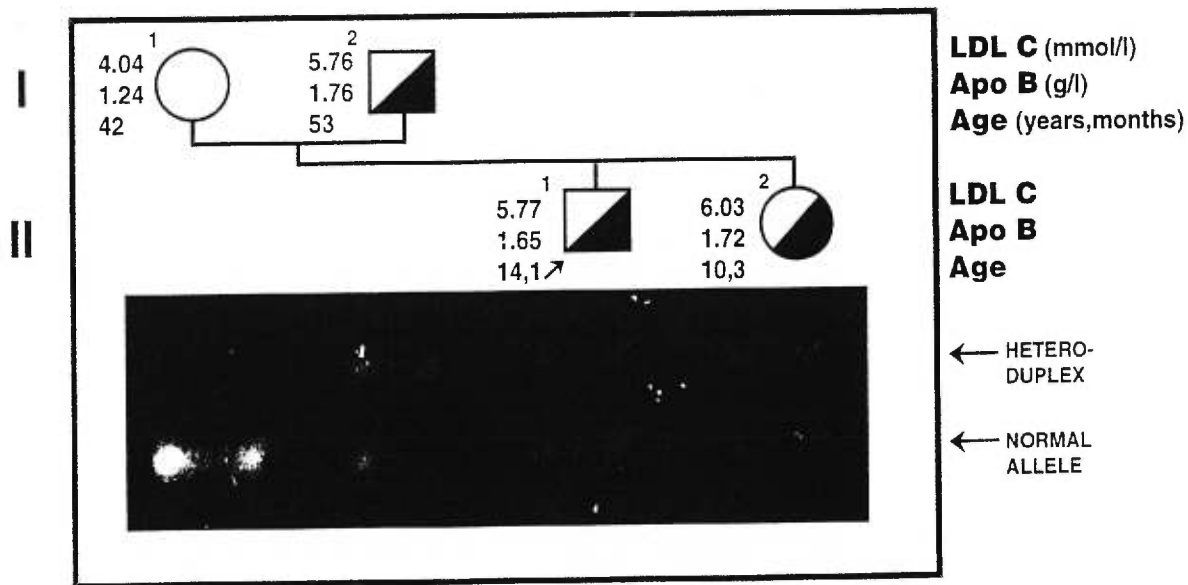


FIGURE 2. Pedigree, age, LDL cholesterol and apoB values of patient-1 family members. The detection was carried out by heteroduplex formation in heterozygote individuals following PCR amplification of exon 4 and 8% PAGE. The index case (proband), carrying the 7-bp duplication, is indicated by an

arrow. Half-filled squares and circles represent males and females, respectively, that are heterozygous for the duplication. Note: The mutant allele, which is 7bp longer than the normal one, cannot be separated on a mini 8% PAGE. A longer migration (20 cm-12% PAGE) is required for its detection.

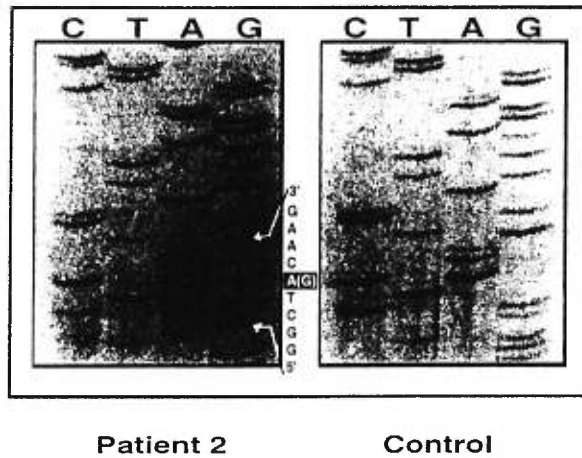


FIGURE 3. DNA sequence analysis corresponding to exon 8 of mutant LDL receptor gene showing the presence of mutant and wild-type allele in patient-2 and only wild-type allele in control.

binding to its ligand (Davis et al., 1987; Kelley et al., 1987). The Y354C mutation herein described results in change of a highly conserved tyrosine to a cysteine at amino acid 354, which is comprised in repeat B. The LDL receptor gene is characterized by shared sequences with several other genes. The growth factor repeats of the EGF homology region are found in the other members of the LDL receptor gene family, plasma proteases of the blood clotting system, cell-surface receptors, adhesive glycoproteins, and developmental proteins. A "BLAST" database protein alignment search showed that the specific tyrosine in repeat B of the EGF homology region is conserved between human LDL and VLDL receptors and through LDL receptors of different species, including *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, rabbit, chicken, bovine, and chinese hamster. Alignment of amino acids sequences from EGF-like repeats demonstrated also conservation of the tyrosine in many

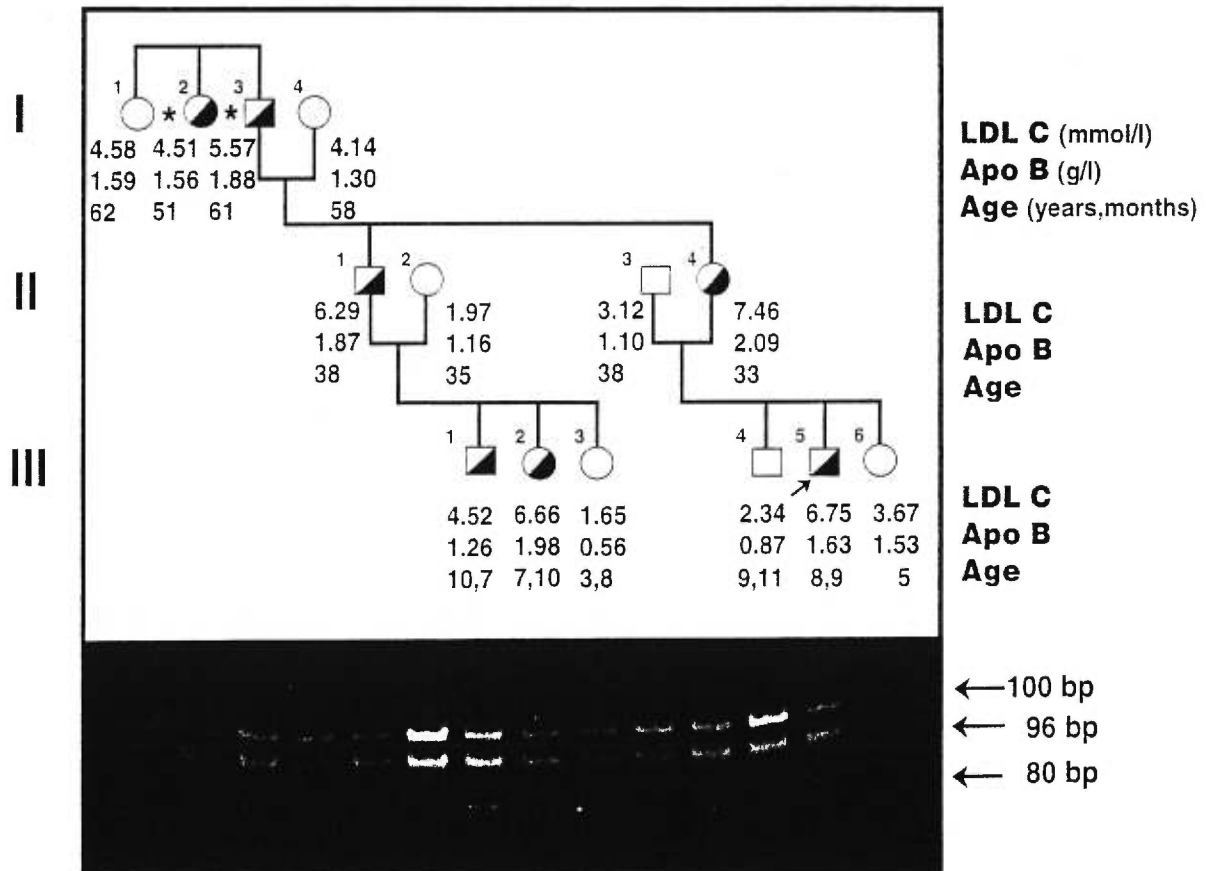


FIGURE 4. Pedigree, age, LDL cholesterol, apoB values, and mutation analysis of the LDL receptor gene in family members of patient -2. PCR amplification of exon 8 was followed by digestion with restriction enzyme BsoFI and 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Y345C mutation creates a new restriction site for BsoFI; therefore, the mutant allele displays 100bp and 80 bp fragments,

whereas the wild-type allele displays 100bp and 96bp fragments. The proband is indicated by an arrow. Half-filled squares and circles represent males and females, respectively, heterozygous for the Y345C mutation. Asterisk (*) indicates individuals taking lipid lowering medications at the time of sampling for blood lipid analysis.

proteins, including bovine thrombomodulin, human Factors IX and X, human proteins C and S, mouse EGF precursor, transcripts of the Notch locus and the D1 locus in *Drosophila melanogaster*, and the Lin-12 locus in *Caenorhabditis elegans* (Doolittle et al., 1984; Greenwald, 1985; Sudhof et al., 1985a,b; Wharton et al., 1985; Dahlback et al., 1986; Jackman et al., 1986; Davis et al., 1987; Kelley et al., 1987; Mehta et al., 1991). Such a broad conservation of this single amino acid among related proteins of different species and between proteins of different functions sharing a common structural motif suggests an important role for this amino acid in structure and/or function. The highly cysteine-rich region of this EGF-like repeat is believed to form intrinsic folding as a result of disulfide bond formation (Sudhof et al., 1985b; Hobbs et al., 1992). The change of an aromatic amino acid, tyrosine, to one with sulfhydryl group, cysteine, may create an incorrect disulfide bonding important in conformation and consequently in positioning the ligand binding site at the surface of the cell membrane, or in assuring the stability of the receptor protein.

Molecular Characterization of the Remaining Three Patients

Although patients 4, 5, and 6 presented clinical and biochemical characteristics indistinguishable from those of patients 1, 2, and 3 (Tables 1 and 2), SSCP analysis of their genomic DNA did not display any abnormality other than those corresponding to known polymorphisms with no obvious effect on lipid levels.

The molecular defect responsible for hypercholesterolemia is unknown in the remaining 25% (21/88) patients. The sensitivity of PCR-SSCP to detect mutations in the LDL receptor gene has been estimated to be near 80–90% (Hayashi et al., 1993). New approaches are evidently necessary to identify further LDL receptor gene defects in the patients with diminished LDL receptor activity. Other mutations at gene loci encoding transcription factors regulating the expression of the LDL receptor gene may be involved (Wang et al., 1994). Alternatively, these patients may represent true phenocopies with no genetic defect of the LDL receptor pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Liat Triger and Shoshi Shpizen for their excellent technical assistance and Danielle St-Cyr for typing the manuscript. This work was supported in part by grants from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (réseau FRSQ/Hydro-

Québec), the MRC, and the Sarah Mayer Research Foundation.

REFERENCES

- Assouline L, Levy E, Feoli-Fonseca JC, Godbout C, Lambert M (1995) Familial hypercholesterolemia: Molecular, biochemical, and clinical characterization of a French-Canadian pediatric population. *Pediatrics* 96:239–246.
- Cavanaugh JA, Eastal S, Simons LA, Thomas DW, Serjeantson SW (1994) FH-Sydney 1 and 2: Two novel frameshift mutations in exon 10 of the low-density lipoprotein receptor gene detected by heteroduplex formation. *Hum Mutat* 4:276–280.
- Dahlback B, Lundwall A, Stenflo J (1986) Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4199–4203.
- Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russell DW, Brown MS (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326:760–765.
- Doolittle RF, Feng D-F, Johnson MS (1984) Computer based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* 307:558–566.
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (1995) Familial hypercholesterolemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, pp 1981–2030.
- Greenwald I (1985) Lin-12, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor. *Cell* 43:583–590.
- Gudnason V, Day INM, Humphries SE (1994) Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 14:1717–1722.
- Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2:338–346.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1:445–466.
- Jackman RW, Beeler DL, VanDeWater L, Rosenberg RD (1986) Characterization of a thrombomodulin cDNA reveals structural similarity to the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8834–8838.
- Kelley MR, Kidd S, Deutsch WA, Young MW (1987) Mutations altering the structure of epidermal growth factor-like coding sequences at the *Drosophila* Notch Locus. *Cell* 51:539–548.
- Leitersdorf E, Chakravarti A, Hobbs HH (1989) Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. *Am J Hum Genet* 44:409–421.
- Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L, Roy CC (1989) Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* 30:1197–1209.
- Levy E, Thibault L, Roy CC, Letarte J, Lambert M, Seidman E (1990) Mechanisms of hypercholesterolemia in glycogen storage disease type I: defective metabolism of low density lipoprotein in cultured skin fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 20:253–260.
- Mehta KD, Chen W-J, Goldstein JL, Brown MS (1991) The low density lipoprotein receptor in *xenopus laevis* I: Five domains that resemble the human receptor. *J Biol Chem* 266:10406–10414.
- Minnich A, Roy M, Chamberland A, Lavigne J, Davignon J (1995) New methods for rapid detection of low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 28:277–284.

- Moorjani M, Roy M, Gagné C, Davignon J, Brun D, Toussaint M, Lambert M, Campeau L, Blaiichman S, Lupien P (1989) Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis* 9:212-216.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) (1992) Report of the expert panel on blood cholesterol in children and adolescents. *Pediatrics* 89:525-584.
- Reshef A, Nissen H, Triger L, Hensen TS, Eliav O, Schurr D, Safadi R, Gare M, Leitersdorf E (1996) Molecular Genetics of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum Genet* (in press).
- Simard J, Moorjani S, Vohl M-C, Couture P, Torres AL, Gagné C, Després J-P, Labrie F, Lupien PJ (1994) Detection of a novel mutation (stop 468) in exon 10 of the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Mol Genet* 3:1689-1691.
- Sudhof TC et al. (1985a) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228:893-895.
- Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW (1985b) The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228:815-822.
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor release by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77:53-62.
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene products that shares homology with proteins containing EGF-like rep. *Cell* 43:567-581.
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russel DW (1984) The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39:27-38.

Discussion générale et conclusion

L'étude des maladies héréditaires, telles que les dyslipidémies, est particulièrement intéressante au Québec. D'une part, le système de santé et l'universalité des services médicaux permettent de rejoindre tous les malades, de faire une évaluation médicale de pointe et de donner un traitement adéquat. D'autre part, les dyslipidémies héréditaires sont plus fréquentes dans cette province et leur étude est facilitée par le fait que peu de mutations sont responsables de la très grande majorité des défauts moléculaires retrouvés chez les canadiens français. L'analyse des facteurs cliniques, biochimiques et moléculaires de ces maladies offre donc la possibilité d'élucider les interactions gène-gène et gène-environnement qui modulent leur présentation phénotypique.

En ce qui concerne notre étude sur le déficit en LPL, le choix d'étudier seulement les patients diagnostiqués avant l'âge d'un an est unique. C'est dans cette tranche d'âge que la majorité des nos patients sont diagnostiqués, et la littérature ne compte aucune étude qui regroupe autant de patients diagnostiqués en si bas âge. Notre expérience va sûrement aider le médecin qui fera face éventuellement à un patient déficient en LPL. La prise en charge précoce d'une maladie métabolique permettra un meilleur contrôle de ses complications, et par conséquent une meilleure évolution du patient.

Nous avons démontré une grande variabilité dans la présentation clinique du déficit en LPL. Si l'observation d'un sérum lactescent conduit fréquemment au diagnostic chez un patient asymptomatique, d'autres patients par contre, peuvent subir des complications graves comme la pancréatite aiguë. Dans notre cohorte, l'irritabilité était le mode de présentation le plus fréquent chez le nourrisson (7/16), deux patients se sont présentés avec méléna et 5 autres avec pâleur, anémie ou splénomégalie. Chez 9 de nos patients, une anémie normocytaire a été observée à la présentation initiale de la maladie et n'a plus été

retrouvée lors du suivi à long terme. Nous pensons que cette anémie pourrait être causée par deux conséquences de concentrations plasmatiques très élevées de grosses particules que sont les chylomicrons: d'une part la survenue de saignements intestinaux par processus ischémique et d'autre part, une survie érythrocytaire réduite par modification de la composition lipidique de la membrane.

Le nombre restreint de mutations responsables du déficit en LPL au Québec, nous a permis de faire un diagnostic moléculaire précis chez tous ceux pour lesquels nous avons accès à de l'ADN. Nous n'avons pas trouvé de différence de présentation phénotypique par rapport au génotype chez nos patients homozygotes pour les mutations P207L et G188E. Ceci peut s'expliquer par le fait que les deux mutations retrouvées affectent de façon importante le site actif de la protéine.

L'une des conclusions les plus intéressantes de cette étude est de constater que l'intervention diététique, non seulement prévient les complications, mais permet aussi une croissance normale. Toutefois, le suivi diététique doit être assuré par un professionnel dans le domaine; non seulement pour surveiller et faire des recommandations concernant la diète, mais aussi, pour rencontrer les besoins nutritifs de l'enfant. L'analyse du journal alimentaire du patient est à cette fin essentielle.

Nous avons retrouvé une incidence de 11.5% d'hypertriglycéridémie chez les enfants dyslipidémiques d'origine canadienne française vus à la clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine. Cette hypertriglycéridémie est très souvent associée à une hypercholestérolémie. La recherche étiologique de la dyslipidémie chez nos patients nous a permis de mettre en évidence une composante génétique et une composante environnementale. La contribution génétique, la plus importante, est donnée par le sous-groupe de patients avec une HF hétérozygote prouvée. En effet, un tiers de notre cohorte

porte ce trait. Il y a aussi la contribution d'un état hétérozygote pour la mutation N291S du gène de la LPL chez deux de nos patients, ainsi qu'une fréquence accrue du génotype apo E 3/4 par rapport aux témoins. Nous nous attendions à retrouver une plus grande influence mutationnelle du gène de la LPL, telle que décrite dans les études faites chez les hétérozygotes obligatoires adultes provenant de familles où l'on avait diagnostiqué un ou plusieurs sujets homozygotes pour le déficit en LPL. Mais il semble ne pas en être ainsi chez l'enfant canadien français, même si le taux de porteurs hétérozygotes est très élevé au Québec.

L'obésité contribue de façon importante au développement d'une hypertriglycéridémie chez l'enfant. En effet, nous avons trouvé des valeurs de TG significativement plus élevées chez les obèses, par rapport aux autres patients. Les autres causes environnementales associées à une hypertriglycéridémie sont plutôt rares chez l'enfant, ce qui s'explique en partie par le maintien à long terme des bonnes habitudes de vie.

Cette étude nous a permis de mettre en relief les principaux facteurs de risque associés à l'hypertriglycéridémie chez l'enfant. Notamment, nous avons trouvé des fréquences élevées d'histoire parentale d'hyperlipidémie et d'athérosclérose précoce, des valeurs abaissées de HDL-chol, des valeurs élevées de LDL-chol, ainsi qu'une obésité fréquemment présente.

Pour ce qui est des études sur l'hypercholestérolémie familiale, nous avons trouvé que la grande majorité des enfants canadiens français présentant une hypercholestérolémie persistante avec histoire parentale d'hyperlipidémie, sont des HF hétérozygotes prouvés. En effet, 75% des cas ont montré une des 8 mutations du gène du récepteur des LDL recherchées. Donc, chez l'enfant québécois, avoir une histoire parentale d'hyperlipidémie

associée à des valeurs élevées de LDL-chol plasmatique, oriente vers une étiologie monogénique plus que polygénique. Cependant, la variabilité biochimique retrouvée parmi les enfants porteurs de la délétion > 15 kb, nous permet de soupçonner la contribution d'autres facteurs génétiques du métabolisme des lipides, surtout ceux qui peuvent être responsables d'un abaissement des valeurs de HDL-chol ou d'une augmentation des valeurs de LDL-chol. La variabilité biochimique, associée à l'absence de signes cliniques chez l'enfant hypercholestérolémique, nous permet de conclure que seule l'analyse moléculaire fournit un diagnostic précis de la maladie.

Nous avons trouvé, du côté thérapeutique, que l'intervention diététique ne suffit pas à diminuer les valeurs de LDL-chol aux niveaux désirés chez l'enfant HF. Nous concluons à ce sujet, que la réponse à la diète est le résultat de l'interaction du défaut de base, d'autres facteurs génétiques et de l'environnement. La clarification de ces interactions nous permettra de mieux établir les facteurs de risque associés à la maladie cardio-vasculaire, et par conséquent, d'offrir un meilleur traitement.

Le défaut moléculaire responsable de l'hypercholestérolémie chez 25% de nos patients n'a pas pu être expliqué par une mutation du gène du récepteur des LDL, même si nous avons utilisé des techniques de détection mutationnelle de grande sensibilité. Certainement, d'autres gènes tels que ceux qui codent pour des facteurs de régulation de la transcription du gène du récepteur des LDL, sont impliqués.

En étudiant les hyperlipidémies chez l'enfant au Québec, nous avons pu établir les facteurs étiologiques responsables, ainsi que déceler les facteurs de risque de la maladie cardio-vasculaire associés à ces hyperlipidémies. Connaître ces facteurs et leurs effets dans la régulation du métabolisme des lipides permettra de mieux traiter les enfants dyslipidémiques et de prévenir l'athérosclérose précoce.

Bibliographie

Assmann G, and Brewer HB. Genetic (primary) forms of hypertriglyceridemia . *Am J Cardiol* 1991;68:13A-16A.

Assouline L, Lévy E, Feoli-Fonseca JC, Godbout C, and Lambert M. Familial hypercholesterolemia: molecular, biochemical, and clinical characterization of a French-Canadian pediatric population. *Pediatrics* 1995;92:239-246.

Assouline L, Leitersdorf E, Lambert M, Reshef A, Feoli-Fonseca JC, Levy E. Identification of two novel LDL receptor gene defects in French Canadian pediatric population: mutational analysis and biochemical studies. *Hum Mutat* 1997;9:555-562.

Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, and Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989;9(3):326-334.

Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A, and Poapt M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. *N Engl J Med* 1978;298:1265-1273.

Beisiegel U, Weber W, and Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8342-8346.

Bétard C, Kessler AM, Roy M, Chamberland A, Lussier-Cancan S, and Davignon J. Molecular genetic evidence for a founder effect in familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Genet* 1992;88:529-536.

Bijvoet SM, Hayden MR. Mismatch PCR: a rapid method to screen for the Pro207→Leu mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:541.

Brown DF. Blood lipids and lipoproteins in atherogenesis. *Am J Med* 1969;46(5):691-704.

Brown MS, and Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver: control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 1983;72:743-747.

Brunner D, Altmann S, Loebel K, Schwartz S, Lerin S. Serum cholesterol and triglycerides in patients suffering from ischemic heart disease and in healthy subjects. *Atherosclerosis* 1977;28(2):197-204.

Brunzell JD. Are all obese patients at risk for cardiovascular disease? *Int J Obes* 1984;8:571-578.

Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. Mc Graw-Hill, New York 1995:1913-1932.

Carlson LA, Bottiger LE. Ischemic heart disease in relationship to testing values of plasma triglycerides and cholesterol. *Lancet* 1972;1:865-868.

Carlson LA, Bottiger LE, Ahfeldt PE. Risk factors for myocardial infarction in the Stockholm Prospective Study: A 14-years follow-up focusing on the role of plasma triglycerides and cholesterol. *Acta Med Scand* 1979;206(5):351-360.

Chen Y-T and Burchell A. Glycogen storage diseases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. McGraw-Hill, New York 1995:935-965.

Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics. Statement on cholesterol. *Pediatrics* 1992;90:469-473.

Cortner JA, Coates PM, and Gallagher PR. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr* 1990;116:514-519.

Cortner JA, Coates PM, Bennett MJ, Cryer DR, and Ngoc-Anh Le. Familial combined hyperlipidemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J Inher Metab Dis* 1991;14:915-922.

Dallongeville J, Lussier-Cancan S, and Davignon J. Modulation of plasma triglycerides levels by apo E phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992;33:447-454.

Davis CE, Gordon D, LaRosa J, Wood PD, Halperin M. Correlations of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels with other plasma lipid and lipoprotein concentrations. The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation* 1980;62(suppl IV):IV-24-30.

Day I, and Humphries S. Genetic tests for familial hypercholesterolemia. *Nat Biotech* 1996;14:1227-1228.

de Gennes JL, Ménagé JJ. and Truffert J. Hypertriglycémie exogène (hypertchylomicronémie) essentielle de type I: étude clinique et évolutive de cinq observations. *Nouv Presse Med* 1972;1:1835-1840.

Deeb SS, and Peng R. Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 1989;28:4131-4135.

Després JP, Moorjani S, Tremblay A, et al. Relation of high plasma triglycerides levels associated with obesity and regional adipose tissue distribution to plasma lipoprotein-lipid composition in premenopausal women. *Clin Invest Med* 1989;12:374-380.

Després JP, Moorjani S, Pouliot MC, et al. Correlates of plasma very-low-density lipoprotein concentration and composition in premenopausal women. *Metabolism* 1990;39:577-583.

Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, and Bouchard C. Genetic aspects of susceptibility to obesity and related dyslipidemias. *Mol Cell Biochem* 1992;113:151-169.

Dionne C, Gagné C, Julien P et al. Genealogy and regional distribution of lipoprotein lipase deficiency in French-Canadians of Quebec. *Hum Biol* 1993;65:29-35.

Feinleib M. Epidemiology of obesity in relation to health hazards. *Ann Intern Med* 1985;103:1019-1024.

Fielding CJ. Lecithin:cholesterol acyltransferase. In: Esfahanie M, Swaney J (eds). *Advances in cholesterol research*. Caldwell, NJ, Telford; 1990:270.

Foubert L, Benlian P, and Turpin G. La lipoprotéine lipase: enzyme multifonctionnelle du métabolisme des lipoprotéines. *Presse Med* 1996;25:207-210.

Fredrickson DS, and Lees RS. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation* 1965;31:321-327.

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

Gagné C, Brun D, Moorjani S, and Lupien PJ. Hyperchylomicronémie familiale: étude de l'activité lipolytique dans une famille. *Un Med Can* 1977;106:333-338.

Gagné C, Brun LD, Julien P, Moorjani S, and Lupien PJ. Primary lipoprotein lipase deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *Can Med Assoc J* 1989;140:404-411.

Gagné C, and Gaudet D. Les dyslipoprotéïnémies au Québec: le déficit primaire en lipase lipoprotéique et l'hypercholestérolémie familiale. *Un Med Can* 1995;sept:61-67.

Garrison RJ and Castelli WP. Framingham Heart Study: an assessment of the relationship between relative weight and 30-year mortality in Framingham men. *Ann Intern Med* 1985;103:1006-1009.

Goldstein JL. The cardiac manifestations of the homozygous and heterozygous forms of familial type II hyperbetalipoproteinemia. *Birth Defects* 1972;8:202.

Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease: 2. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-1568.

Goldstein JL, and Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;249:5153-5162.

Goldstein JL, Hobbs HH, and Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. Mc Graw-Hill, New York 1995:1981-2030.

Groupe de travail sur les dyslipidémies. Diagnostic et traitement des dyslipidémies. Bibliothèque nationale du Québec. Gouvernement du Québec, Ministère de la Santé et des Services sociaux. 1993.

Grundy SM, Chait A, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Atherosclerosis* 1987;7:203-207.

Hardin DS, Hebert JD, Bayden T, Dehart M and Mazur L. Treatment of Childhood Syndrome X. *Pediatrics* 1997;100:257,e5. *Pediatrics electronic pages*: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/100/2/e5>.

Hata A, Ridinger DN, Sutherland SD, et al. Missense mutations in exon 5 of the human lipoprotein lipase gene. Inactivation correlates with loss of dimerization. *J Biol Chem* 1992;267:20132-20139.

Havel RJ, and Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. Mc Graw-Hill, New York 1995:1841-1851.

Hayden MR, Kirk H, Clark C, et al. DNA polymorphism in and around the apo-AI-CIII gene and genetic hyperlipidemias. *Am J Hum Genet* 1987;40:421-430.

Heyden S, Heiss G, Hames CG, Bartel AG. Fasting triglycerides as predictors of total and CHD mortality in Evans County, Georgia. *J Chronic Dis* 1980;33:275-282.

Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545-548.

Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, and Goldstein JL. Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1987;317:734-737.

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-466.

Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, and Castelli W. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-977.

Hulley SB, Resnmann RH, Bawol RD, Brand RJ. Epidemiology as a guide to clinical decisions: The association between triglycerides and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1980;302(25):1383-1389.

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;33:745-754.

Iverius PH and Brunzell JD. Obesity and common genetic metabolic disorders. *Ann Intern Med* 1985;103:1050-1051.

Jansen S, Zambrana JC, López Miranda J, et al. Posible relación entre sobrepeso y prevalencia de hiperlipemia en hijos de enfermos con hipercolesterolemia familiar heterocigota e hiperlipemia familiar combinada. *Med Clin* 1995;105:85-88.

Julien P. High frequency of lipoprotein lipase deficiency in the Quebec population. *Can J Cardiol* 1992;8:675-676.

Kissebah AH and Peiris AN. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1989;5:83-109.

Krauss RM, Levy RI, and Fredrickson DS. Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 1974;54:1107-1124.

Kwiterovich PO, Fredrickson DS, and Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic, and clinic presentation in childhood. *J Clin Invest* 1974;53:1237-1249.

Larsson B, Bjorntorp P, and Tibblin G. The health consequences of moderate obesity. *Int J Obes* 1981;5:97-116.

Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest* 1990;85:1014-1023.

Levy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, Lepage G, and Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glucogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res* 1988;29:215-226.

Levy E, Lepage G, Bendayan M, et al. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* 1989;30:1197-1209.

Ma Y, Bétard C, Roy M, Davignon J, Kessling AM. Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet* 1989;36:219-228.

Ma Y, Henderson HE, Ven Murthy MR, et al. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 1991;324:1761-1766.

Ma Y, Wilson BI, Bijvoet S, et al. A Missense Mutation (Asp250/Asn) in Exon 6 of the Human Lipoprotein Lipase Gene Causes Chylomicronemia in Patients of Different Ancestries. *Genomics* 1992;13:649-653.

Ma Y, Zhang H, Liu M-S, Frohlich J, Brunzell JD, and Hayden MR. Type III hyperlipoproteinemia in apoE 2/2 homozygotes: possible role of mutations in the lipoprotein lipase gene. *Circulation* 1993(suppl);88:1-179.

Ma Y, Ooi TC, Liu M-S, et al. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. *J Lipid Res* 1994;35:1066-1075.

Mahley RW and Rall SC, Jr. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. Mc Graw-Hill, New York 1995:1953-1980.

Mancini M, Steiner G, Betteridge DJ, and Pometta D. Acquired (secondary) forms of hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 1991;68:17A-21A.

Miesenböck G, Hölzl B, Föger B, Brandstätter E, Paulweber B, Sandhofer F, and Patsch JR. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest* 1993;91:448-455.

Minnich A, Kessling A, Roy M, et al. Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J Lipid Res* 1995;36:117-124.

Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, et al. A Missense Mutation at Codon 188 of the Human Lipoprotein Lipase Gene is a Frequent Cause of Lipoprotein Lipase Deficiency in Persons of Different Ancestries. *J Clin Invest* 1990;86:728-734.

Moorjani S, Roy M, Gagné C, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec province. *Arteriosclerosis* 1989;9:212-216.

Moorjani S, Roy M, Torres A, et al. Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1993;341:1303-1306.

National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992;89:525-584.

Rauh G, Schuster H, Mueller B, et al. Genetic evidence from 7 families that the apolipoprotein B gene is not involved in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1990;83:81-87.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:9.16-9.19.

Simard J, Moorjani S, Vohl MC, et al. Detection of a novel mutation (stop 468) in exon 10 of the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia among French Canadian. *Hum Mol Genet* 1994;3:1689-1691.

Slack J. Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinemia states. *Lancet* 1969;2:1380-1382.

Sniderman A, Brown BG, Stewart BF, and Cianflone K. From familial combined hyperlipidemia to hyperapo B: unravelling the overproduction of hepatic apolipoprotein B. *Curr Opin Lipidol* 1992;3:137-142.

Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, and Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985; 228:815-822.

Syvanne M, Antikainen M, Ehnholm S, Tenkanen H, Lahdenpera S, Ehnholm C, and Taskinen MR. Heterozygosity for Asn291→Ser mutation in the lipoprotein lipase gene in two Finnish pedigrees: effect of hyperinsulinemia on the expression of hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1996;37(4):727-738.

Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherosclerosis. *J Clin Invest* 1990;86:379-384.

Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989;246:904-910.

Wijsman EM, Motulsky AG, Guo SW, et al. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the AI-CIII-AIV gene cluster complex. *Circulation* 1992;86(suppl I):1-429.

Wilson DE, Emi M, Iverius P-H, et al. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest* 1990;86:735-750.

Wojciechowski A, Farrall M, Cullon P, et al. Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 1991;349:161-164.

Wood S, Schertzer M, Hayden M, and Ma Y. Support for founder effect for two lipoprotein lipase (LPL) gene mutations in French-Canadians by analysis of GT microsatellites flanking the LPL gene. *Hum Genet* 1993;91:312-316.

Remerciements

Ce travail a été possible grâce à la précieuse collaboration de nombreux individus.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de recherche, le docteur Marie Lambert et le docteur Émile Lévy.

Je veux remercier l'aide reçu de la part des membres des équipes de recherche de Dr. Lambert et Dr. Lévy, spécialement Linda Assouline et Nathalie Brun.

Je suis également reconnaissant aux membres du Service de génétique médicale et du Département de nutrition de l'Hôpital Sainte-Justine, pour le support logistique et financier, ainsi qu'au Département de pédiatrie de l'Hôpital Sainte-Justine, pour m'avoir octroyé une bourse de recherche.

Finalement, je tiens à remercier les patients de la Clinique des lipides de l'Hôpital Sainte-Justine, pour leur collaboration à nos études.