



Université de Montréal

**Association de polymorphismes dans le gène  
*GPIIbP1* avec l'hypertriglycémie**

Par :  
Simon-Pierre Guay

Département des Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)  
en Sciences biomédicales

Déposé, Décembre 2010

© Simon-Pierre Guay, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
**Association de polymorphismes dans le gène  
*GPIIbP1* avec l'hypertriglycémie**

Présenté par :  
Simon-Pierre Guay

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

---

Dre Diane Brisson - Directrice de recherche

---

Dr Daniel Gaudet - Codirecteur de recherche

---

Dr Yohan Bossé - Président rapporteur

---

Dr Paul Poirier - Examineur externe

## Résumé

L'hypertriglycéridémie (hyperTG) est une dyslipidémie fréquente, caractérisée par une augmentation de la concentration plasmatique en triglycérides (TG). L'hyperTG est considérée comme un facteur de risque indépendant de la maladie cardiovasculaire, particulièrement de la maladie coronarienne athérosclérotique. Plusieurs facteurs environnementaux et génétiques ont été associés avec l'hyperTG. Cependant, près de 90% des cas d'hyperTG primaire sont encore incomplètement caractérisés au niveau moléculaire. Dernièrement, la protéine *GPIHBP1* (*glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1*), qui a un rôle clef dans le métabolisme des TG, a été associée à l'expression d'hyperTG sévère et rare chez l'humain. Ce mémoire présente les résultats de nos travaux qui ont été effectués afin d'identifier de nouvelles bases moléculaires associées à l'expression de l'hyperTG dans le locus du gène *GPIHBP1*.

Nous avons observé que le polymorphisme *GPIHBP1* g.-469G>A (rs72691625), dont la fréquence de l'allèle mineure a été évaluée à 19,6% dans notre échantillon, serait associé à l'expression d'hyperTG (TG  $\geq$  2mmol/L) dans une population canadienne-française. Ce polymorphisme est associé à un risque 1,67 fois plus grand d'exprimer une triglycéridémie  $\geq$  2mmol/L chez les porteurs hétérozygotes et 5,7 fois plus grand chez les porteurs homozygotes, comparativement aux non-porteurs. Ce risque d'hyperTG serait exacerbé par la présence concomitante d'une mutation hypertriglycéridémiant dans le gène codant pour la lipoprotéine lipase. La présence de ce polymorphisme serait particulièrement associée à l'expression de la dysbêtalipoprotéinémie familiale et de l'hypertriglycéridémie familiale endogène.

*GPIHBP1* g.-469G>A est le premier polymorphisme fréquent identifié dans le promoteur du gène à être associé avec l'expression d'hyperTG. *GPIHBP1* émerge de plus en plus comme un gène candidat intéressant pour la recherche de nouvelles bases moléculaires pouvant expliquer certaines formes d'hyperTG primaire fréquente.

**Mots clés :** *GPIHBP1*, polymorphisme, hypertriglycéridémie, métabolisme lipidique-lipoprotéique, lipoprotéine lipase

## Summary

Hypertriglyceridemia (hyperTG) is a frequent dyslipidemia referring to an increased fasting plasma triglyceride (TG) level  $\geq 2$  mmol/L. HyperTG is an independent risk factor for cardiovascular disease, such as coronary artery diseases. Several environmental and genetic factors have been associated with hyperTG. Although several gene factors were associated with hyperTG, nearly 90% of cases of primary hyperTG are still incompletely characterized at the molecular level. Recently, few cases of rare and severe hyperTG have been associated with some rare polymorphisms in the gene coding for GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1). This manuscript resumes our research regarding the identification of new molecular bases associated with the expression of frequent hyperTG subtypes in the gene locus *GPIHBP1*.

Our results show that the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism (rs72691625), whose the minor allele frequency was estimated to 19.6% in our sample, was associated with the expression of hyperTG (TG  $\geq 2$  mmol/L) in a French-Canadian population. Subjects heterozygous and homozygous for this polymorphism respectively had a 1.67-fold and 5.70-fold increased risk to exhibit plasma TG levels  $\geq 2$ mmol/L as compared to non-carriers. This increased risk of hyperTG observed in g.-469A carriers seems to be exacerbated by the concomitant presence of a frequent loss-of-function lipoprotein lipase gene variant. This polymorphism seems also particularly associated with dysbetalipoproteinemia and familial hypertriglyceridemia.

The g.-469G>A polymorphism is the first common polymorphism in the *GPIHBP1* gene promoter to be associated with the expression of hyperTG. *GPIHBP1* emerges as a significant candidate for the molecular based of primary hyperTG.

**Key words:** *GPIHBP1*, polymorphism, hypertriglyceridemia, lipid-lipoprotein metabolism, lipoprotein lipase

## Table des matières

Résumé .....	iii
Summary .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements .....	xi
Avant-propos .....	xiii
<b>Chapitre I : Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre II : Métabolisme lipidique-lipoprotéique et hypertriglycéridémie</b> .....	4
2.1 Métabolisme lipidique-lipoprotéique .....	4
2.2 Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides .....	6
2.3 Risques associés à l'hypertriglycéridémie .....	9
2.4 Implication pathophysiologique de l'hypertriglycéridémie .....	12
2.5 Classification des hypertriglycéridémies .....	15
2.6 Gènes associés avec l'expression d'hypertriglycéridémie .....	18
<b>Chapitre III : La lipoprotéine lipase et l'expression de l'hypertriglycéridémie primaire</b> .....	21
3.1 Caractéristiques de la lipoprotéine lipase .....	21
3.2 La lipoprotéine lipase et l'hypertriglycéridémie primaire .....	24
<b>Chapitre IV : GPIHBP1 : un nouveau modulateur de la triglycéridémie</b> .....	28
4.1 La découverte de GPIHBP1 : preuves expérimentales de son implication dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique .....	28
4.2 GPIHBP1 : une plateforme endothéliale pour la lipolyse .....	29
4.3 GPIHBP1 : un stabilisateur de la lipoprotéine lipase .....	34
4.4 GPIHBP1 : une navette transendothéliale .....	36
4.5 Le gène <i>GPIHBP1</i> et l'hypertriglycéridémie primaire .....	37
<b>Chapitre V : Article: <i>A common polymorphism in the GPIHBP1 gene promoter is associated with hypertriglyceridemia in a French-Canadian population</i></b> .....	41
5.1 Avant-propos .....	41
5.2 Résumé .....	43
5.3 Abstract .....	44
5.4 Introduction/Background .....	45

5.5 Materials and methods .....	46
5.6 Results .....	51
5.7 Discussion .....	55
5.8 Conclusion .....	58
5.9 Acknowledgment .....	58
5.10 Disclosure.....	58
5.11 References.....	59
<b>Chapitre VI : Discussion générale et conclusion .....</b>	<b>64</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>71</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	Les caractéristiques intrinsèques de cinq différents types de lipoprotéines.....	5
<b>Tableau II.</b>	Classification des dyslipoprotéïnémies de Fredrickson, Levy et Lees .....	16
<b>Tableau III.</b>	Rôles et risques associés aux polymorphismes identifiés dans les gènes codant pour la lipoprotéine lipase, les apolipoprotéines E, C-II, C-III, A-V et la lipase hépatique. ....	20
<b>Table IV.</b>	<i>Clinical criteria used for hypertriglyceridemia subtype diagnosis .</i>	47
<b>Table V.</b>	<i>Amplification and sequencing primers used for GPIHBP1 .....</i>	49
<b>Table VI.</b>	<i>Subjects' characteristics according to the GPIHBP1 g.-469G&gt;A genotype .....</i>	52
<b>Table VII.</b>	<i>Subject's lipid-lipoprotein profile according to the GPIHBP1 g. -469G&gt;A genotype .....</i>	53



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	Structure générale d'une lipoprotéine .....	4
<b>Figure 2.</b>	Voies exogène et endogène du métabolisme des lipoprotéines .....	8
<b>Figure 3.</b>	Schéma représentant la relation entre l'hypertriglycéridémie et l'expression du diabète de type 2, de l'hypertension artérielle et de la maladie coronarienne athérosclérotique.....	12
<b>Figure 4.</b>	Représentation schématique du mécanisme complexe de régulation tissu-spécifique de la lipoprotéine lipase.....	23
<b>Figure 5.</b>	Structure tertiaire de la protéine GPIHBP1.....	31
<b>Figure 6.</b>	Plateforme endothéliale pour l'hydrolyse des chylomicrons par la lipoprotéine lipase .....	32
<b>Figure 7.</b>	Représentation schématique de l'interaction entre la lipoprotéine lipase, les HSPG, l'ANGPTL3, l'ANGPTL4 et la protéine GPIHBP1 .....	35
<b>Figure 8.</b>	Translocation transendothéliale de la lipoprotéine lipase .....	37
<b>Figure 9.</b>	Séquence primaire de la protéine GPIHBP1 et identification des cinq polymorphismes associés à l'expression d'hypertriglycéridémie extrême chez l'humain (C56R, C65Y, C65S, C68G, Q115P). .....	40
<b>Figure 10.</b>	<i>Linkage disequilibrium relationships between polymorphisms in GPIHBP1 gene locus .....</i>	50
<b>Figure 11.</b>	<i>Estimated relative risk (odds ratio) to exhibit elevated plasma TG levels (<math>\geq 2.0</math> mmol/L) associated with the presence of the GPIHBP1 g.-469G&gt;A genotype .....</i>	53
<b>Figure 12.</b>	<i>Estimated relative risk (odds ratio) to exhibit elevated plasma TG levels (<math>\geq 2.0</math> mmol/L) associated with the presence of the GPIHBP1 g.-469G&gt;A genotype and frequent hyperTG loss-of-function LPL genotypes (D9N, N291S, P207L, G188E, D250N). .....</i>	54
<b>Figure 13.</b>	<i>Distribution of hyperTG subtypes according to the presence of the GPIHBP1 g.-469G&gt;A genotype and frequent hyperTG loss-of-function LPL genotypes (D9N, N291S, P207L, G188E, D250N). ...</i>	54

## Liste des abréviations

ABCA1	<i>ATP-binding cassette 1</i>
AGL	Acide gras libre
ANGPTL3	<i>angiopoietin-like protein 3</i>
ANGPTL4	<i>angiopoietin-like protein 4</i>
Anti-ANGPTL3	Anticorps anti- <i>angiopoietin-like protein 3</i>
Anti-ANGPTL4	Anticorps anti- <i>angiopoietin-like protein 4</i>
apo	Apolipoprotéine
ASP	Protéine stimulatrice de l'acylation
ATP-dépendant	Adénosine triphosphate-dépendant
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
c-HDL	HDL cholestérol
c-LDL	LDL cholestérol
CM	Chylomicrons
DT2	Diabète de type 2
GPIHBP1	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1</i>
Gpihbp1 -/-	Déficience totale pour le gène GPIHBP1
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
hSR-B1	<i>Human scavenger receptor, class B, member 1</i>
HTA	Hypertension artérielle
hyperTG	Hypertriglycémie
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
LCAT	Lécithine-cholestérol-acyl-transférase
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDLR	Récepteur des LDL
LH	Lipase hépatique
LMF1	Facteur de maturation des lipases 1
LPL	Lipoprotéine lipase
LXR $\alpha$	<i>Liver X receptor <math>\alpha</math></i>

Ly6	<i>Lymphocyte antigen 6</i>
MAF	Fréquence de l'allèle mineur
MCA	Maladie coronarienne athérosclérotique
MCV	Maladie cardiovasculaire
MTP	Protéine de transfert microsomial
NCEP ATP III	<i>(National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III)</i>
PIPLC	Phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
SLSJ	Saguenay–Lac-Saint-Jean
SM	Syndrome métabolique
STREGA	<i>Strengthening the Reporting of Genetic Association studies</i>
STROBE	<i>Strengthening for Reporting of Observational Studies in Epidemiology</i>
TG	Triglycéride
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

## Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formation universitaire.

Je tiens premièrement à remercier le Programme de bourses d'études supérieures du Canada Frederick Banting et Charles Best des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), ainsi que le Programme de bourses de formation de maîtrise du Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour leur soutien financier dont j'ai pu bénéficier tout au long de ma formation.

Il serait ingrat de déposer ce travail sans remercier Dre Diane Brisson, ma directrice de recherche, qui s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de ma formation et de la réalisation de ce mémoire. Sans oublier aussi l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans quoi ce projet n'aurait jamais vu le jour. Dre Brisson et Dr Daniel Gaudet, mon codirecteur de recherche, m'ont donné mes premières chances dans le domaine de la recherche, et pour cela je leur en serai éternellement reconnaissant. Je tiens, sans complaisance, à remercier également le Dr Luigi Bouchard, mon parrain de recherche, pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes, l'aide qu'il m'a apportée, ainsi que pour ses encouragements. Merci à vous trois pour tout ce que vous avez fait et surtout pour le sentiment de confiance que j'ai ressenti venant de votre part.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à tous les étudiants, techniciens de laboratoires et personnels de recherche du laboratoire ECOGENE-21, particulièrement à Nadia Mior, Sébastien Claveau, Denise Morin, Julie Méthot, Nancy Tremblay, Martin Lambert, Jocelyn Lambert, Maxime Dumont, Pierre-Olivier Simard, Stéphanie Thibault et Yacine Loucif. Vos connaissances diverses, votre joie de vivre, vos encouragements et surtout tous les moments inoubliables en votre compagnie ont fait passer ces deux années à la vitesse de la lumière. Sans toutefois tous vous nommer, merci de faire partie de mon univers et d'avoir partagé cette merveilleuse aventure scientifique avec moi.

Je tiens aussi à signifier ma gratitude envers mes parents, mes amis et tous mes proches qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce projet et de mes études. Vous comptez beaucoup pour moi!

Merci à tous et à toutes.

## Avant-propos

Le présent mémoire comporte six chapitres traitant de l'hypertriglycéridémie associée à une déficience génétique en GPIHBP1. Le premier chapitre constitue une brève introduction facilitant la compréhension de l'esprit dans lequel ce projet a été réalisé et illustrant sa pertinence. Le deuxième chapitre constitue une revue de littérature qui décrit le métabolisme lipidique-lipoprotéine, l'hypertriglycéridémie et ses risques associés, ses étiologies principales et ses différents types. Les chapitres trois et quatre décrivent respectivement l'implication de la lipoprotéine lipase et de la protéine GPIHBP1 dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et dans l'étiologie de différents sous-types d'hypertriglycéridémie.

Le cinquième chapitre est composé d'un article récemment soumis à la revue *BMC Medical Genetics*. Les résultats présentés sont issus de mon travail de recherche effectué dans le cadre du programme de ma formation en maîtrise en sciences biomédicales de l'Université de Montréal, sous la direction des Drs Diane Brisson et Daniel Gaudet.

Le sixième et dernier chapitre présente une discussion des principaux résultats obtenus dans le cadre de cette recherche et constitue une conclusion globale sur le projet, tout en apportant des perspectives de recherches futures.

Bonne lecture !

## Chapitre I : Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent un ensemble de plusieurs phénotypes complexes relatifs au cœur et aux vaisseaux sanguins, regroupant notamment les maladies thromboemboliques ou les maladies coronariennes athérosclérotiques (MCA). Les MCV sont modulées autant par des facteurs génétiques qu'environnementaux [1]. Depuis plus de quarante ans, plusieurs études épidémiologiques de grande envergure, telles que INTERHEART et Framingham, ont permis d'identifier de nombreux facteurs et de comprendre leur impact sur le risque cardiovasculaire [2, 3].

Divers facteurs de risque cardiovasculaires, dits traditionnels, ont déjà été identifiés, notamment le tabagisme, la sédentarité, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle (HTA), et le diabète de type 2 (DT2). Leur étude a d'ailleurs permis d'améliorer la compréhension des processus cardiovasculaires, d'élaborer des campagnes de santé publique et d'améliorer le suivi des individus à risque [4]. Toutefois, malgré les efforts effectués dans le développement et la mise en place d'approches préventives, les MCV constituent encore aujourd'hui, avec différents types de cancers, la principale cause de décès dans plusieurs pays industrialisés et l'un des plus grands fardeaux de notre système national de soins de santé [5]. Il devient de plus en plus important d'identifier d'autres marqueurs génétiques et environnementaux permettant de cibler plus rapidement et plus efficacement les personnes à risque afin de favoriser le développement d'approches préventives plutôt que curatives.

Si l'augmentation de l'espérance de vie moyenne est en partie responsable de l'augmentation de la prévalence des MCV, l'épidémie d'obésité et de diabète faisant rage présentement dans le monde en est aussi très certainement responsable. Parmi les différents modulateurs de l'expression des MCV associés à l'obésité et au diabète, le métabolisme lipidique-lipoprotéique, l'inflammation, le stress oxydatif et la dysfonction endothéliale ont fait l'objet d'une grande proportion des études [4]. Le métabolisme lipidique-lipoprotéique est l'un des modulateurs ayant attiré le plus l'attention jusqu'à présent. En plus d'influencer lui-même l'expression des MCV, le métabolisme lipidique-lipoprotéique est sous l'influence de divers facteurs qui sont

aussi des modulateurs connus du risque cardiovasculaire, tel que l'âge, le sexe, la distribution des masses grasses et maigres, les habitudes de vie (tabagisme, alcoolisme, nutrition, etc.), ainsi qu'une multitude de variables génétiques. Les perturbations du métabolisme lipidique-lipoprotéique peuvent être la cause de diverses dyslipidémies, telles que l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie (hyperTG). Contrairement à l'hypercholestérolémie qui est considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant depuis plus de 50 ans, l'hyperTG n'est considérée comme tel que depuis une quinzaine d'années [6, 7].

L'hyperTG est une dyslipidémie fréquente, caractérisée par une augmentation de la concentration plasmatique en triglycérides (TG). Sa prévalence est en augmentation dans toutes les sociétés du monde, parallèlement à celle de l'obésité et du diabète [8]. Au Canada et aux États-Unis, la prévalence de l'hyperTG se situe entre 20 et 35%, selon l'origine ethnique, le genre et les valeurs seuils utilisées [9-11]. L'hyperTG est considérée comme un trait métabolique complexe, et son étiologie est le résultat de facteurs primaires (génétiques), secondaires (diabète, obésité abdominale, hypothyroïdie, alcoolisme, certains médicaments, etc.) ou d'une combinaison des deux. Plusieurs facteurs génétiques ont été associés à l'expression des différentes formes d'hyperTG, en particulier ceux identifiés dans les gènes codant pour la lipoprotéine lipase (LPL), l'apolipoprotéine (apo) E, l'apo C-II, l'apo C-III et la lipase hépatique (LH). Toutefois, près de 90% des cas d'hyperTG primaire sont incomplètement caractérisés au niveau moléculaire [12]. Cette statistique suggère que plusieurs autres variants géniques peuvent influencer significativement l'expression de l'hyperTG.

Récemment, quelques rares mutations ont été identifiées dans le gène codant pour la protéine GPIHBP1 (*glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1*) et associées avec l'expression d'une hyperTG sévère [13-15]. GPIHBP1 est une protéine nécessaire au processus lipolytique des lipoprotéines riches en TG [16]. Il a été suggéré que GPIHBP1 : 1) fonctionnerait comme une plate-forme pour la lipolyse; 2) stabiliserait la LPL; 3) permettrait la migration transendothéliale de la LPL; 4) augmenterait l'efficacité d'hydrolyse de la LPL; et 5) jouerait un rôle dans le transport cellulaire du cholestérol [16-19]. Les différents rôles de *GPIHBP1* dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique en font un gène

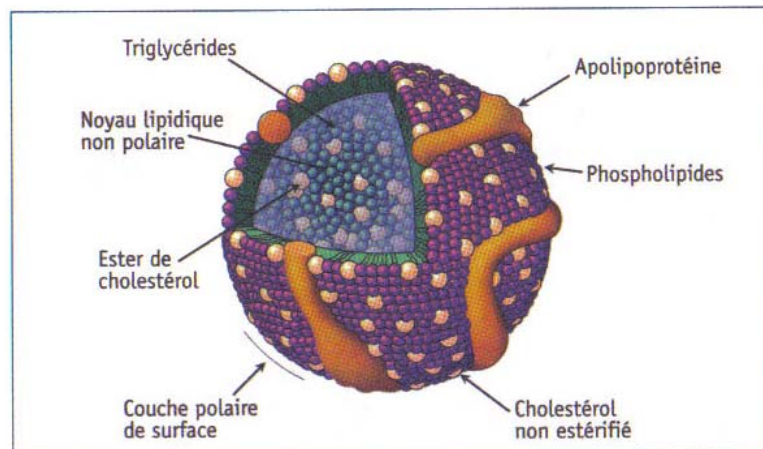


candidat très intéressant pour la recherche de nouveaux variants géniques pouvant être associés à l'expression de différentes formes d'hyperTG. L'objectif principal du présent projet de maîtrise était donc de vérifier l'influence de polymorphismes dans le gène *GPIHBP1* sur l'expression de différents types d'hyperTG.

## Chapitre II : Métabolisme lipidique-lipoprotéique et hypertriglycémie

### 2.1 Métabolisme lipidique-lipoprotéique

En raison de leur caractère hydrophobe, les lipides sont transportés dans le sang sous forme de lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont constituées d'une coque externe hydrophile composée de phospholipides, de cholestérol et de protéines, ainsi que d'une partie centrale hydrophobe contenant des TG, des esters de cholestérol et des vitamines liposolubles (figure 1) [20]. Il existe cinq principaux types de lipoprotéines qui se distinguent en fonction de leur teneur et de leur composition en apolipoprotéines et en lipides, et également en fonction de leur diamètre et de leur densité (tableau I). D'une manière générale, plus une lipoprotéine contient des TG, moins elle sera dense; plus elle contient de protéines, plus elle sera dense [21, 22].



**Figure 1 :** Structure générale d'une lipoprotéine.

Tiré de : Gagné C., Gaudet D., *Les dyslipoprotéïnémies: l'approche clinique*. 3e édition, LIPIMED Communications. Canada. 2007. 305 pages [21].

Le métabolisme lipidique-lipoprotéique est constitué de trois voies métaboliques majeures : la voie exogène, la voie endogène et le transport à rebours du cholestérol. La voie exogène implique les lipides provenant de l'alimentation qui sont mis en circulation sous forme de chylomicrons (CM) sécrétés par les intestins,

lesquelles permettent le cheminement de ces lipides alimentaires jusqu'au foie (voie entérohépatique). La voie endogène implique la fabrication de lipides par le foie et leur mise en circulation sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL), qui fourniront l'apport en lipide aux différents autres tissus de l'organisme [23]. Les CM et les VLDL sont des lipoprotéines ayant une très forte teneur en TG et un contenu relativement faible en cholestérol. Ces deux lipoprotéines sont donc appelées lipoprotéines riches en TG. Par ailleurs, la voie endogène et le métabolisme continu des VLDL conduisent à la production de deux autres types de lipoprotéines : les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les lipoprotéines de faible densité (LDL). Les lipoprotéines de haute densité (HDL), quant à elles, ont une origine mixte, issue d'une production tissulaire (hépatique ou intestinale) ou plasmatique.

<b>Lipoprotéines</b>	<b>Diamètre (Å)</b>	<b>Densité (g/mL)</b>	<b>Composition lipidique principale</b>	<b>Apoprotéines</b>
Chylomicrons	900-5000	< 0,94	Triglycérides alimentaires	A- I, A-II, B-48, C- I, C-II, C-III, E
VLDL	500	< 1,006	Triglycerides endogènes	B-100, C-I, C-II, C-III, E
IDL	300	1,000-1,019	Cholestérol Triglycérides	B-100, C, E
LDL	200	1,019-1,063	Cholestérol	B-100
HDL	50	1,063-1,120	Cholestérol	A-I, A-II, C, E

**Tableau I** : Les caractéristiques intrinsèques de cinq différents types de lipoprotéines.

Inspiré de : Mahley RR, Rall SC. 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 bases of inherited disease, 8nd edition. New York : McGraw-Hill; 2001. pp. 2835-2862 [22].

Le transport à rebours du cholestérol joue un rôle d'éboueur. Lors de ce mécanisme, les HDL naissantes provenant du foie et de l'intestin captent le cholestérol libre non estérifié des surfaces cellulaires par le biais des transporteurs ABCA1 (*ATP-binding cassette 1*). Le cholestérol contenu dans les particules HDL sera par la suite estérifié

par la lécithine-cholestérol-acyle-transférase (LCAT) afin d'en faciliter l'élimination au niveau du foie [24]. La majeure partie des résidus HDL est captée par des récepteurs d'épuration au niveau hépatique qui sont ainsi responsables du recyclage du cholestérol, tel que hSR-B1 (human *scavenger receptor, class B, member 1*) et CD36 (*cluster of differentiation 36*) [25]. Toutefois, le cholestérol estérifié transporté par les HDL peut aussi être transféré, en échange de molécules de TG, aux autres lipoprotéines contenant l'apo B (VLDL et CM) par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) [24]. Le cholestérol estérifié transféré aux particules VLDL sera éliminé au niveau hépatique et les TG des HDL seront hydrolysés par la LH.

Le métabolisme lipidique-lipoprotéique est ainsi dépendant de l'interaction entre plusieurs intermédiaires au niveau cellulaire et en circulation : des lipides, des apolipoprotéines, des enzymes, des récepteurs, ainsi que d'une grande quantité d'autres transducteurs et effecteurs. Les sections subséquentes décriront plus en détail le métabolisme des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL) et le rôle des différents intermédiaires impliqués.

## ***2.2 Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides***

Les VLDL et les CM sont particulièrement enrichis en TG. Leur contenu protéique n'est toutefois pas identique. Les CM contiennent plusieurs protéines différentes à leur surface, soit les apo A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E et B-48. La portion protéique des VLDL est apparentée à celle des CM (tableau I), mais leur assemblage est basé surtout autour de l'apo B-100 [20]. L'apo B-48 et l'apo B-100 sont toutes deux issues du même gène, soit l'*APOB* [26]. Toutefois, la biogenèse de l'apo B-48 implique un mécanisme unique par lequel le codon CAA (codant pour le résidu glutamine) est changé pour le codon stop UAA, provoquant ainsi l'arrêt de la traduction et la troncation de l'apo B-100 pour former l'apo B-48 (représentant 48% de l'apo B-100) [27].

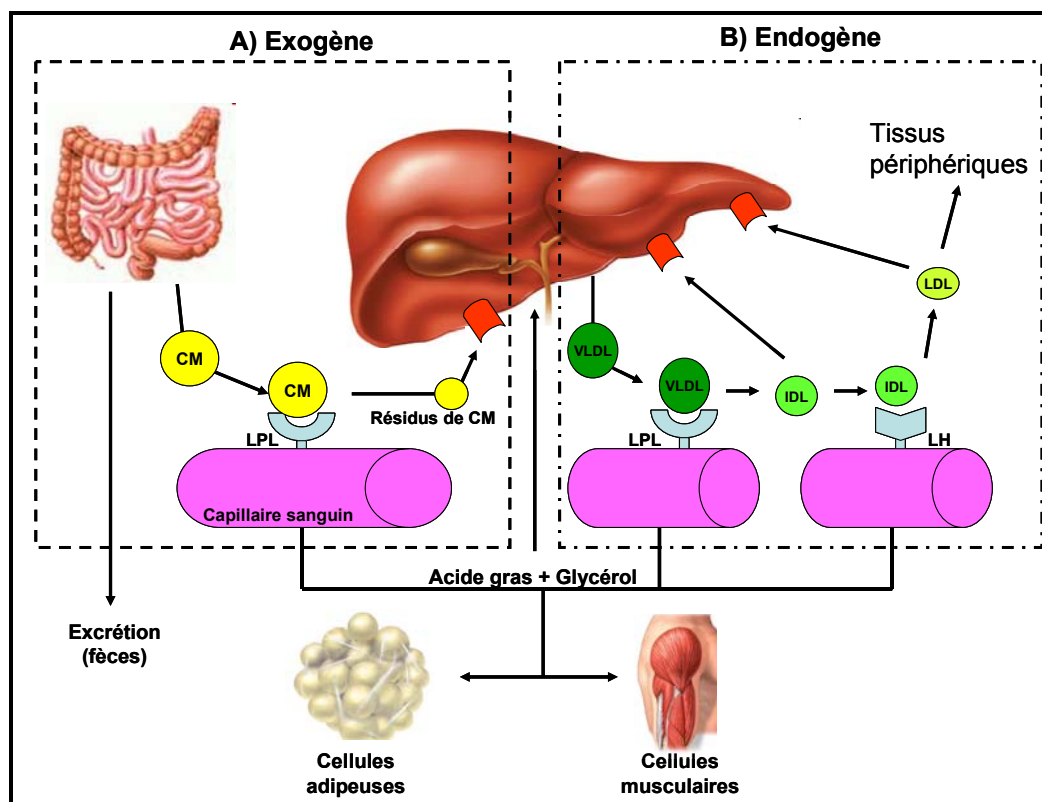
L'anabolisme des CM et des VLDL est assez semblable. Leur assemblage nécessite l'action de la protéine de transfert microsomial (MTP), réunissant l'apo B sécrétée par le réticulum endoplasmique, les TG et les esters de cholestérol [28]. À la suite de leur fabrication, les CM et les VLDL entrent dans la circulation sanguine. Le petit

intestin sécrète les CM dans le réseau lymphatique et ces dernières entrent ensuite dans la circulation sanguine par le canal thoracique. Une fois mis en circulation, les CM sont généralement rapidement métabolisés; leur temps de résidence dans le système sanguin étant de quelques minutes seulement [23]. Les VLDL qui sont sécrétées par le foie, restent quant à elles beaucoup plus longtemps en circulation, notamment en raison de leur catabolisme plus complexe.

Tout comme pour l'anabolisme, les premières étapes du catabolisme des CM et des VLDL sont assez semblables (figure 2). En effet, les TG contenus dans les CM et les VLDL sont tout d'abord hydrolysés par une enzyme clef du métabolisme lipidique-lipoprotéique, la LPL. L'hydrolyse des TG libère du glycérol et des acides gras libres (AGL). Repris au niveau du tissu adipeux, notamment grâce aux mécanismes CD36-dépendant et ATP-dépendant (adénosine triphosphate-dépendant), les acides gras servent à l'édification des réserves d'énergie suite à leur réestérification [29]. Récoltés au niveau du muscle lors d'état de jeûne prolongé, ils peuvent également servir de source d'énergie [29]. Le glycérol peut, quant à lui, être capté par le foie et le tissu adipeux, grâce à l'expression de l'aquaporine 7 au niveau des adipocytes et de l'aquaporine 9 au niveau des hépatocytes. Le glycérol peut être utilisé particulièrement comme substrat dans la néoglucogenèse ou dans la réestérification des AGL [30].

Les CM et les VLDL prendront ensuite deux voies métaboliques différentes. Les CM résiduels, maintenant plus pauvres en TG et proportionnellement enrichis en cholestérol, seront éliminés au niveau hépatique grâce aux récepteurs épurateurs (*scavenger*) reconnaissant l'apo E [20]. Les VLDL, quant à elles, subiront une hydrolyse continue de leur contenu en TG, ce qui fera graduellement diminuer leur diamètre et augmenter leur densité (figure 2). Rendu à une taille d'environ 300Å, les VLDL seront alors considérées comme des IDL. Ces lipoprotéines subiront encore une fois l'hydrolyse par l'action conjointe de la LPL et de la LH. Cette hydrolyse subséquente des IDL mènera à la formation de lipoprotéines de taille encore plus réduite (diamètre < 270Å), les LDL [20, 31]. Les LDL se caractérisent à la fois par un contenu relativement élevé en cholestérol et plutôt faible en protéine. De ce fait, la classe lipoprotéique des LDL a été considérée comme l'un des plus importants facteurs de risque cardiovasculaires. Leur concentration en cholestérol (c-LDL), leurs

caractéristiques physiques (densité, diamètre) et leur temps de résidence en circulation sont d'ailleurs des facteurs importants du risque coronarien [32, 33].



**Figure 2 :** Voies exogène et endogène du métabolisme des lipoprotéines.

A) L'intestin met en circulation des lipides provenant de l'alimentation sous forme de chylomicrons (CM). Les triglycérides, contenus dans les CM, sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), libérant du même coup des acides gras et du glycérol. Les résidus de CM sont captés généralement par un récepteur épurateur (*scavenger*) hépatique.

B) Les lipides fabriqués par le foie sont mis en circulation sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL). L'action concomitante de la LPL et de la lipase hépatique (LH) diminuera le diamètre et la teneur en triglycérides des VLDL, les transformant spécifiquement en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) puis en lipoprotéines de faible densité (LDL). Les IDL et les LDL peuvent être captés par le foie grâce à des récepteurs épurateurs (*scavenger*). Les LDL sont aussi captés par les cellules périphériques, grâce au récepteur des LDL se liant spécifiquement à l'apolipoprotéine B-100 située à la surface des LDL.

Inspiré de : Betteridge DJ, Illingworth DR, and Shepherd J, eds. Lipoproteins in Health and Disease London, Arnold, 1999. 1302 pp. ISBN 0-340-55269-7 [33]

En circulation, les LDL sont captées par la plupart des cellules périphériques (cellules androgéniques, cellules hépatiques et les cellules incapables de synthétiser leur propre cholestérol) grâce au récepteur des LDL (LDLR), qui reconnaît et lie l'apo B-100 à la surface des particules LDL [31]. Le complexe ligand-récepteur ainsi

formé est internalisé par endocytose et démantelé à l'intérieur des lysosomes. Le cholestérol cellulaire servira par la suite à la synthèse des hormones sexuelles, des glucocorticoïdes et d'autres intermédiaires cellulaires, en plus d'être présent dans la membrane cellulaire afin d'y apporter une certaine rigidité. La majeure partie du cholestérol est cependant récupérée par le foie et servira à l'élaboration des sels biliaires ou sera estérifiée au niveau du cytosol pour ensuite être stockée dans la cellule [20]. L'excédent du cholestérol cellulaire sera quant à lui pris en charge par les particules HDL dans un processus de transport à rebours, tel que décrit précédemment. Cette fonction des particules HDL leur confère d'ailleurs un rôle cardioprotecteur et assure l'homéostasie de la cholestérolémie.

L'action coordonnée de plusieurs enzymes et récepteurs, tels que la LPL, la LH, la LCAT, la CETP, le LDLR et les récepteurs reconnaissant l'apo E et/ou l'apo B, permet ainsi le maintien de l'homéostasie des concentrations plasmatiques de TG et de cholestérol. La perturbation de l'une ou l'autre de ces étapes est associée à l'expression de dyslipidémies fréquentes. Par exemple, l'augmentation de l'anabolisme endogène ou exogène de lipoprotéines riches en TG et/ou une diminution de leur catabolisme peut mener à l'expression d'hyperTG. L'hyperTG est donc une entité hétérogène pouvant refléter l'accumulation de CM ou de VLDL, ou de lipoprotéines résiduelles issues de la dégradation périphérique de ces lipoprotéines, due à plusieurs facteurs.

### ***2.3 Risques associés à l'hypertriglycéridémie***

Selon le NCEP-ATP III (*National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III*), la concentration plasmatique normale de TG à jeun se situe en deçà de 1,7 mmol/L (<150 mg/dL) [34, 35]. Dans sa mise à jour de 2009, la Société canadienne de cardiologie suggère notamment une triglycéridémie à jeun inférieure à 1,7 mmol/L comme cible thérapeutique secondaire dans ses lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la dyslipidémie et pour la prévention des maladies cardiovasculaires chez l'adulte [36]. Par ailleurs, l'étude longitudinale *Framingham Heart Study* a démontré que les patients ayant une triglycéridémie supérieure à 1,7 mmol/L et une concentration plasmatique de cholestérol-HDL (c-HDL) inférieure à 1,03 mmol/L constituent un groupe plus à risque de maladies

coronariennes [37]. La pertinence de l'hyperTG comme marqueur de la MCV a toutefois fait l'objet de nombreux débats au fil des années. Quelques études n'ont en effet remarqué qu'une faible, voir même aucune association significative entre la triglycéridémie et l'expression de MCV [38-41]. Ces études ont aussi affirmé que l'association fréquemment observée entre la triglycéridémie et le risque cardiovasculaire serait en fonction des niveaux de c-HDL, qui sont corrélés négativement à la triglycéridémie moyenne [41]. Par contre, cela ne signifie pas pour autant que la triglycéridémie n'est pas cliniquement importante [42, 43]. En effet, plusieurs autres études ont démontré une association significative entre la triglycéridémie et le risque de MCV, indépendamment des concentrations de c-HDL [42, 44-47]. Une méta-analyse basée sur 17 études populationnelles prospectives a notamment démontré qu'une augmentation de la triglycéridémie était associée avec une augmentation du risque cardiovasculaire, et ce, même après ajustement pour les niveaux de c-HDL [46]. Selon cette méta-analyse, une hausse de 1 mmol/L de la triglycéridémie moyenne à jeun augmenterait le risque cardiovasculaire de 32% et de 76% chez les hommes et les femmes respectivement, sur une période de plus de 10 ans [46].

Quelques études affirment que la triglycéridémie postprandiale serait toutefois un facteur de risque coronarien beaucoup plus significatif que la triglycéridémie à jeun [44, 47]. L'utilisation de la triglycéridémie postprandiale en clinique impliquerait cependant la mise en place d'une prise contrôlée et normalisée d'un repas riche en gras, en plus de l'identification de valeurs seuils pouvant permettre le diagnostic d'une hyperTG postprandiale. Le problème de l'utilisation de la triglycéridémie postprandiale réside en fait dans son interprétation et sa signification. L'utilisation de l'hyperTG postprandiale comme marqueur de risque de MCV serait donc moins accessible cliniquement comparativement à la triglycéridémie à jeun qui, elle, implique un seul prélèvement sanguin après un jeûne de 12 heures. La triglycéridémie à jeun est d'ailleurs une composante importante de certains phénotypes utilisés présentement en clinique pour identifier les patients à risque de complications cardiovasculaires.

L'hyperTG est notamment une composante du syndrome métabolique (SM). Ce phénotype complexe constitue un regroupement de perturbations cliniques fréquentes

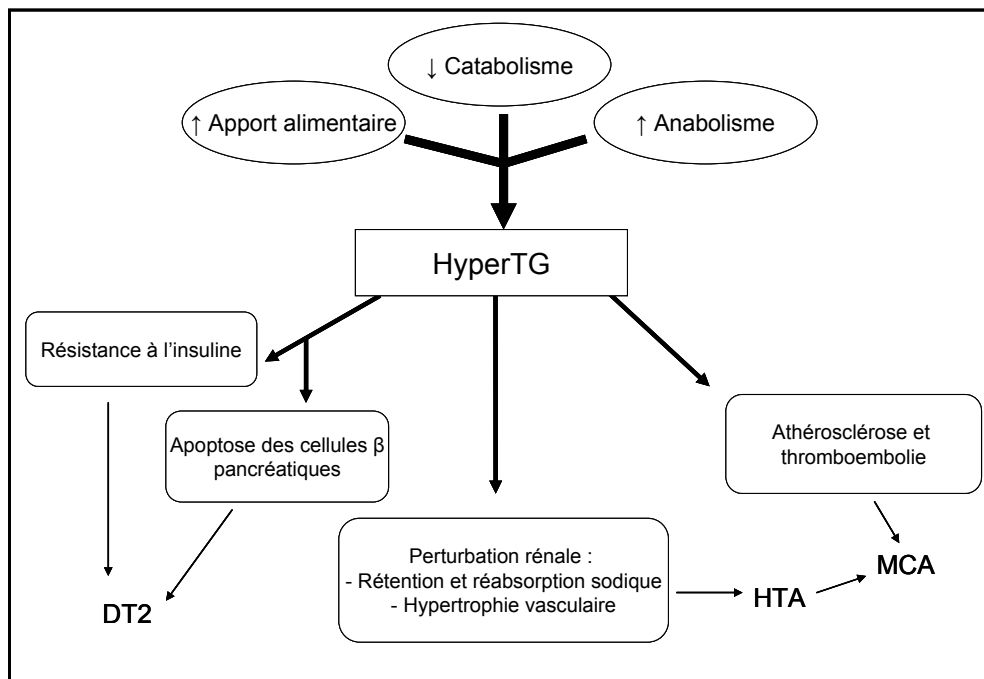


comprenant l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, des dyslipidémies (augmentation des concentrations d'apo B et de TG, diminution du niveau de c-HDL), l'inflammation et l'HTA [1, 48, 49]. L'expression du SM est reconnue depuis longtemps pour être un modulateur important du risque de DT2 et de MCV, en plus d'être associée à d'autres complications cardiométaboliques [50, 51]. L'expression clinique de MCA serait toutefois davantage associée avec le nombre de facteurs du SM retrouvé chez les patients que par le diagnostic clinique du SM lui-même [52]. L'hyperTG à jeun a d'ailleurs fréquemment été identifiée comme l'une des composantes du SM associées le plus significativement avec l'expression de complications cardiovasculaires [52-55]. Plusieurs guides thérapeutiques en lien avec l'expression de différentes composantes du SM ont été élaborés dans la plupart des pays occidentaux afin de cibler les patients à risque [48, 56]. L'hyperTG est sans équivoque une composante importante de ces guides thérapeutiques, notamment en raison de son association avec l'expression de l'obésité et de perturbations métaboliques associées à la résistance à l'insuline.

Le SM n'est toutefois pas le seul outil pouvant être utilisé en clinique afin d'identifier les gens à risque de complications cardiovasculaires. Il a été démontré que l'hyperTG à jeun (TG > 2mmol/L) couplée à un tour de taille élevé (>85cm chez la femme et >90 cm chez l'homme), identifierait les individus à risque de développer une MCA ou le DT2 [57-59]. Reconnu sous le nom de « phénotype de la taille hypertriglycéridémiant », cette combinaison phénotypique permettrait de cibler plus efficacement les personnes ayant une obésité viscérale, et donc celles plus à risque de complications métaboliques. Ce phénotype serait notamment associé à l'expression d'une triade métabolique athérogénique réunissant une hyperinsulinémie, une hyperapolipoprotéïnémie de type B et une accumulation de particules LDL petites et denses [57]. Le phénotype de la taille hypertriglycéridémiant semble d'ailleurs être aussi efficace que le SM pour cibler les personnes à risque, et voir même plus efficace chez les patients de moins de 60 ans [60, 61]. Malgré la controverse autour de l'hyperTG, il est évident qu'il s'agit d'une perturbation très importante du bilan lipidique associée vraisemblablement à une augmentation du risque cardiovasculaire, en plus d'être considérée comme un facteur de risque de plusieurs perturbations métaboliques.

## 2.4 Implication pathophysologique de l'hypertriglycéridémie

L'association entre la triglycéridémie et le risque cardiovasculaire n'est pas uniquement soutenue par des analyses épidémiologiques [37, 42-47]. En effet, elle est liée à différents mécanismes pathophysiologiques conduisant au développement du DT2, de l'HTA et de la MCA (figure 3) [62].



**Figure 3 :** Schéma représentant la relation entre l'hypertriglycéridémie et l'expression du diabète de type 2, de l'hypertension artérielle et de la maladie coronarienne athérosclérotique. L'hypertriglycéridémie (hyperTG) réfère à une accumulation plasmatique de triglycérides (TG) provenant soit : d'un surplus alimentaire, d'une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG ou d'une augmentation de l'anabolisme de ces mêmes lipoprotéines. L'hyperTG issue de ces perturbations métaboliques interférerait avec la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline et induirait l'apoptose des cellules pancréatiques de type  $\beta$ , diminuant du même coup la sécrétion insulinaire et la sensibilité cellulaire. Par ces mécanismes pathophysiologiques, l'hyperTG pourrait être associé au développement du diabète de type 2 (DT2). L'hyperTG, particulièrement en cas de résistance à l'insuline, semblerait aussi influencer l'expression d'hypertension artérielle (HTA), par ses actions sur l'hémodynamie rénale, la rétention et la réabsorption sodique, ainsi que sur l'hypertrophie vasculaire. L'hyperTG serait de plus associée avec l'athérosclérose et la thromboembolie, tous deux des facteurs de risque élevés pour le développement de la maladie coronarienne athérosclérotique (MCA).

Inspiré de : Xie C, Wang ZC, Liu XF, *et al.* The common biological basis for common complex diseases: evidence from lipoprotein lipase gene. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 3-7. [62]

Le DT2 est une perturbation du métabolisme glucidique augmentant le risque de MCV et dont la prévalence ne cesse d'augmenter d'année en année [63]. Plusieurs facteurs environnementaux et héréditaires contribueraient à son développement.

Certains modèles animaux ont permis de démontrer que l'hyperTG pourrait perturber directement la réponse insulinémique et donc influencer le risque de DT2 [64]. Les mécanismes moléculaires et/ou cellulaires par lesquels l'hyperTG induirait une résistance à l'insuline ne sont toutefois pas entièrement caractérisés. Il faut comprendre tout d'abord que l'hyperTG est associée notamment à une augmentation de l'exposition et de l'entreposage de TG au niveau des tissus non adipeux (muscles squelettiques, foie, pancréas, reins, etc.), ainsi qu'à une augmentation du flux d'acide gras au niveau de ces mêmes tissus. Or, il a été observé que l'augmentation de l'utilisation énergétique des TG par les tissus périphériques pourrait inhiber, ou du moins diminuer, la captation cellulaire et l'oxydation du glucose (cycle de Randle) [65, 66]; que l'accumulation intracellulaire de certains produits métaboliques des TG interférerait avec la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline [67]; et qu'une augmentation du flux d'AGL au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas pourrait perturber leur fonction cellulaire et promouvoir leur apoptose [68]. Toutes ces observations permettraient, d'une part, d'expliquer l'association fréquemment observée entre l'hyperTG et l'expression du DT2, et d'autre part, d'apporter une piste à la compréhension de la présente épidémie mondiale de DT2.

L'HTA est une composante importante du SM et un facteur de risque reconnu pour plusieurs complications cardiovasculaires (insuffisance cardiaque), neurologiques (accident vasculaire cérébral) et rénales (insuffisance rénale) [69]. En 2000, on estimait à environ 26,4 % la proportion mondiale d'hypertendus, et selon des prédictions, cette proportion pourrait atteindre près de 30% d'ici d'ici 2025 [70]. Plusieurs études ont démontré que la résistance à l'insuline et un métabolisme lipidique anormal, notamment l'expression d'une hyperTG, pouvaient avoir un rôle dans le développement de l'HTA. Cette assomption du lien entre l'hyperTG et le développement de l'HTA vient de l'observation que certains marqueurs génétiques associés avec l'hyperTG semblent être plus fréquemment observés chez les individus hypertendus par rapport aux individus normotendus [71, 72]. Les mécanismes par lesquels l'hyperTG influencerait l'expression de l'HTA ne sont cependant pas encore clarifiés. Les mécanismes sous-jacents sembleraient toutefois impliquer les effets hémodynamiques d'une concentration plasmatique élevée en TG, dont ceux de la rétention hydrique pouvant être associée à l'hyperTG [62, 73]. Ainsi, les

perturbations du métabolisme lipidique-lipoprotéique joueraient un rôle crucial dans l'occurrence et le développement de l'HTA.

En raison de l'absence d'accumulation de TG au niveau des plaques athéromateuses, l'implication de ces lipides plasmatiques dans l'athérogénèse avait au départ été négligée. Par la suite, l'implication de l'hyperTG dans l'étiologie de la résistance à l'insuline et de l'HTA, et son association avec l'expression de MCA, ont conduit à l'hypothèse que l'hyperTG pouvait avoir un impact indirect sur le risque coronarien. Toutefois, l'hyperTG semblerait aussi promouvoir le développement de MCA d'une manière directe. L'hyperTG, particulièrement celle observée lors d'un état postprandial et caractérisée par l'accumulation de petits résidus de lipoprotéines proathérogéniques, serait associée à l'athérosclérose [74]. Cette association proviendrait notamment de la capacité de ces petits résidus à infiltrer la paroi artérielle et ainsi, à contribuer au stress endothélial et à l'évolution de la plaque athéromateuse [75, 76]. L'hyperTG stimulerait aussi l'activité de la CETP et par conséquent la formation de particules VLDL plus larges et de particules LDL petites et denses [77-79]. Ce sous-type de particules LDL est notamment associé avec un risque athérogène beaucoup plus élevé, en raison de leur plus grande facilité à infiltrer la paroi artérielle, de leur plus grande affinité pour les protéoglycanes de la paroi artérielle et de leur plus grande susceptibilité à l'oxydation [32]. La compréhension de l'effet proathérogénique des particules lipoprotéiques riches en TG est toutefois très complexe, particulièrement en raison de l'hétérogénéité considérable qui existe parmi elles. La contribution réelle des lipoprotéines riches en TG dans le développement de MCA proviendrait ainsi, non seulement de mécanismes indirects, mais aussi d'une interaction entre différents mécanismes directs et indirects.

Considérant l'implication du métabolisme des TG dans de nombreux mécanismes pathophysiologiques, l'association observée entre l'hyperTG et l'expression de différentes perturbations métaboliques ne serait pas seulement de nature épidémiologique. L'hyperTG est un facteur de risque du développement du DT2, de l'HTA et de la MCA. Il est donc primordial de documenter les facteurs associés à l'expression clinique des différents sous-types d'hyperTG afin de permettre l'identification des personnes à risque et d'instaurer des programmes de prévention mieux adaptés.

## ***2.5 Classification des hypertriglycéridémies***

Différents sous-types d'hyperTG ont été décrits dans la littérature, lesquels diffèrent par leur sévérité, leur prévalence, leur étiologie et leur expression clinique. La classification la plus fréquemment employée pour décrire les formes d'hyperTG est celle proposée en 1967 par Fredrickson et ses collaborateurs [80]. Cette classification distingue six formes d'hyperlipoprotéïnémies, numérotées I, IIa, IIb, III, IV et V, en fonction de l'aspect du plasma, des niveaux plasmatiques de cholestérol et de TG et des résultats de l'électrophorèse des lipoprotéines (tableau II). Les types I, IIb, III, IV et V sont les formes ayant une composante hypertriglycéridémique. Le type IIa, quant à lui, est une forme d'hypercholestérolémie sévère caractérisée par une accumulation excessive de particules LDL. Tous comme le type IIa, les types I et V sont des dyslipidémies sévères, qui sont toutefois caractérisées par un état lipémique, défini par des valeurs de triglycéridémie à jeun supérieures à 10 mmol/L, et pouvant atteindre plus de 100 mmol/L. Ces deux types d'hyperTG présentent un risque élevé de pancréatite aiguë et nécessitent souvent une intervention rapide [81]. Ces formes sévères d'hyperTG n'ont pas systématiquement été associées avec une augmentation significative du risque coronarien au départ, entre autres en raison de leur association avec des niveaux plasmatiques faibles en c-LDL [82]. Cependant, depuis qu'une forme prématurée d'athérosclérose a été observée chez des patients et des modèles de souris hyperTG de type I, le risque coronarien associé à ces types sévères d'hyperTG ne peut plus être considéré comme nul [83, 84]. Les formes modérées d'hyperTG (IIb, III, IV), quant à elles, sont plus fréquentes et de nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'elles étaient associées à l'expression de pathologies cardiovasculaires [85, 86].

La classification de Fredrickson permet de faire un bilan assez précis des patients. Elle ne repose toutefois que sur l'identification des taux plasmatiques élevés de cholestérol et de triglycérides. Elle ne permet donc pas de distinguer les formes primaires et secondaires, ni de classer les hypocholestérolémies ou les dyslipoprotéïnémies où les valeurs de cholestérolémie et de triglycéridémie sont apparemment normales. C'est d'ailleurs pourquoi cette classification, datant des années 70, est fortement discutée dans les milieux cliniques depuis quelques années. Dans la dernière décennie, différentes études ont notamment utilisé d'autres

méthodes de stratification pour subdiviser les cas d'hyperTG [87-89]. Il importe donc de bien documenter l'étiologie de l'hyperTG, notamment par des examens de laboratoires complémentaires, et de se questionner sur les différentes composantes génétiques possibles.

Types	Aspect du plasma	Portions lipidiques augmentées	Électrophorèse
I	Collet crémeux Clair	Triglycérides (> 10,0 mmol/L)	Chylomicrons
IIa	Clair	Cholestérol	$\beta$
IIb	Clair ou trouble	Cholestérol Triglycérides	$\beta$ Pré- $\beta$
III	Clair ou trouble	Cholestérol Triglycérides	Bande large $\beta$
IV	Clair ou trouble	Triglycérides	Pré- $\beta$
V	Collet crémeux Trouble	Triglycérides (> 10,0 mmol/L)	Chylomicrons Pré- $\beta$

**Tableau II** : Classification des dyslipoprotéinémies de Fredrickson, Levy et Lees.  
 Cette classification distingue six différentes dyslipidémies selon l'aspect du plasma, les portions lipidiques augmentées et la migration électrophorétique des lipoprotéines. Les types I, IIb, III, IV et V sont ceux ayant une composante d'hyperTG. Les types I et V sont considérés comme des hyperTG sévère, tandis que les type IIb, III et IV sont plutôt considéré comme des hyperTG modérée.

Inspiré de : Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967, 276(4):215-225 contd. [80]

L'hyperTG peut aussi être classifiée selon son étiologie primaire (génétique) ou secondaire (environnemental). Cependant, il n'est pas rare que les causes primaires et secondaires d'hyperTG cohabitent. En fait, la plupart des patients hypertriglycéridémiques ont au moins un facteur secondaire, tels que : la consommation chronique d'alcool, l'hypothyroïdisme, l'obésité, le diabète, une mauvaise alimentation, la sédentarité, la grossesse, des problèmes rénaux et certaines médications (corticostéroïdes, substituts d'estrogènes oraux, thérapie antirétrovirale, etc.) [90]. Il ne faut toutefois pas sous-estimer l'importance des facteurs primaires

dans l'étiologie de l'hyperTG. En effet, il est très fréquent que deux personnes ayant une exposition comparable à des facteurs secondaires ne développent pas une dyslipidémie similaire, ce qui suggère l'implication d'une susceptibilité génétique différente. La composante primaire d'une dyslipoprotéinémie se représente cliniquement comme la portion résiduelle observée après que les facteurs secondaires aient été repérés, traités et contrôlés [91].

Cinq différents types d'hyperTG primaires ont été décrits dans la littérature. Parmi eux, deux sont associés à l'expression d'un état lipémique, soit une triglycéridémie extrême de plus de 10 mmol/L, caractérisée par une accumulation excessive de CM ou de VLDL. Il s'agit de l'hyperchylomicronémie familiale (type I) et, plus fréquemment, de l'hyperlipémie primaire mixte (type V) [80]. Les trois autres types, soit la dysbêtalipoprotéinémie familiale (type III), l'hyperlipémie familiale mixte (type IIB) et l'hypertriglycéridémie familiale endogène (type IV), présentent généralement une hyperTG modérée ( $2 < TG < 10$  mmol/L), même si une hyperTG sévère peut parfois être observée chez certains patients.

La dysbêtalipoprotéinémie familiale est une dyslipidémie hautement athérogène, caractérisée par la présence à jeun de particules IDL dans le plasma, une augmentation du ratio VLDL-cholestérol/TG et l'expression de différents types de xanthomes palmaires, planaires ou tubéreux [22]. La dysbêtalipoprotéinémie familiale est associée au syndrome de résistance à l'apo E. Ce syndrome est le plus fréquemment causé par l'isoforme apo E2, qui possède une affinité moins grande pour le récepteur d'épuration (« scavenger »), comparativement à l'isoforme apo E3 [92]. Toutefois, la dysbêtalipoprotéinémie familiale n'est pas exclusivement diagnostiquée chez les individus homozygotes pour l'allèle apo E2. La majorité de ces patients demeurent normolipémiques pendant des décennies, particulièrement s'il n'y a pas d'autres facteurs dyslipidémiant primaires ou secondaires concomitants [93]. Il importe donc d'identifier ces facteurs de risque additionnels pouvant favoriser l'expression de ce type d'hyperTG et de bien documenter leur contribution au phénotype hypertriglycéridémiant.

L'hypertriglycéridémie familiale endogène et l'hyperlipémie familiale mixte sont, quant à elles, des hyperTG primaires beaucoup plus fréquentes que la

dysbétalipoprotéïnémie familiale. Leur étiologie et leur expression clinique sont aussi beaucoup plus hétérogènes, notamment en raison de leur association avec plusieurs facteurs dyslipidémians primaires et secondaires [91]. L'hypertriglycéridémie familiale endogène résulte d'une surproduction de particules VLDL, avec ou sans une diminution de leur catabolisme, et est associée avec une hyperTG et une cholestérolémie normale. Quant à elle, l'hyperlipémie familiale mixte est caractérisée à la fois par une augmentation des lipoprotéines riches en TG et des niveaux de c-LDL [80, 94].

À l'exception de l'hyperchylomicronémie familiale, la base moléculaire de ces différentes hyperTG n'est pas clarifiée pour l'instant. Par ailleurs, bien que le patron de transmission de certaines semble être autosomique dominant (notamment pour l'hyperlipémie familiale mixte) et que leur expression semble nécessiter certains isoformes (apo E2 pour la dysbétalipoprotéïnémie familiale), leur pénétrance est loin d'être complète [93]. En fait, l'expression d'une hyperTG primaire résulte souvent de la combinaison de l'effet de plusieurs variants géniques qui interagissent entre eux, et beaucoup plus rarement, un seul gène défectueux peut entraîner son expression. Jusqu'à maintenant, plusieurs polymorphismes situés dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG ont été associés avec l'expression de différentes hyperTG. Néanmoins, la recherche de nouvelles bases moléculaires est encore nécessaire puisque près de 90% des cas d'hyperTG primaires ne sont pas adéquatement caractérisés au niveau moléculaire. L'étude de l'effet de nouveaux déterminants génétiques de l'hyperTG apportera notamment des connaissances et des éléments informatifs sur la contribution relative de ces différentes variables sur l'expression de l'hyperTG et sur la modulation du risque cardiovasculaire.

## ***2.6 Gènes associés avec l'expression d'hypertriglycéridémie***

Les hyperTG primaires peuvent résulter d'un défaut génétique de la voie exogène du métabolisme des TG (perturbation du métabolisme des CM), de la voie endogène (augmentation de la production de VLDL par le foie) ou des deux (inactivation ou saturation de la LPL) [95]. Le métabolisme des lipoprotéines riches en TG implique une succession d'étapes mettant en jeu une multitude de protéines, d'enzymes et de



récepteurs. Le rôle de chacun d'entre eux a largement été étudié chez des modèles animaux génétiquement déficients. Chez l'humain, l'importance de ces derniers a été mise en évidence par l'identification de variants géniques associés à l'expression de différentes formes d'hyperTG. Plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés et associés avec l'hyperTG, notamment grâce à des études familiales, à des études d'association à grande échelle GWAS (*Genome-wide association study*) et à l'utilisation de modèles animaux [93].

Les gènes codant pour la LPL, la LH, l'apo E, l'apo C-II, l'apo C-III et l'apo A-V sont parmi ceux ayant attiré le plus l'attention de la communauté scientifique en raison de leur influence significative sur la triglycéridémie [96-110]. Soulignons, par exemple, l'association entre la déficience génétique totale en LPL et l'hyperchylomicronémie familiale ou celle entre l'isoforme apo E2 et la dysbêtalipoprotéïnémie familiale. Le tableau III présente une liste partielle de polymorphismes rares ou de faible fréquences (fréquence de l'allèle mineur (MAF) < 5,0%) et fréquents (MAF  $\geq$  5,0%) observés au niveau de ces différents gènes qui sont reconnus pour avoir une influence significative sur le bilan lipidique. Dans la littérature, la classification des polymorphismes rares s'effectue généralement de cette façon : *low-frequency polymorphism* (MAF entre 0,5 et 5%), polymorphismes rare (MAF entre 0,05 et 0,5) et *private polymorphism* (MAF < 0,05%) [111]. Dans le présent mémoire, le terme polymorphisme rare englobe ces trois sous-types.

Depuis le début des années 2000, les GWAS ont permis d'identifier plusieurs variants communs associés avec les concentrations plasmatiques de lipides. L'année dernière, Teslovich et ses collaborateurs ont notamment identifié 95 loci associés avec les variations interindividuelles des concentrations de c-LDL, de c-HDL et de TG [112]. Il a aussi été observé que des variants rares au niveau de loci identifiés par les GWAS (gène codant pour l'apo A-V, la LPL et l'apo B) expliqueraient une certaine proportion de l'expression de différentes formes d'hyperTG primaires [113]. Toutefois, malgré l'ampleur des connaissances actuelles, les causes génétiques qui sous-tendent ces hyperTG primaires ne sont pas toutes connues pour l'instant. En effet, seulement 10% des cas d'hyperTG sont complètement caractérisés au niveau moléculaire [106]. Dans quelques populations, la fréquence de certains variants géniques est très élevée, augmentant du même coup leur importance dans la

participation à l'étiologie de la maladie. Dans la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) par exemple, certains polymorphismes dans le gène codant pour la LPL ont une fréquence allélique de plus de 5% [114, 115], ce qui fait de la population du SLSJ une population idéale pour l'étude de l'impact de ces variants géniques.

Gènes	Rôles	Polymorphismes et risques associés	Références
Lipoprotéine lipase (LPL)	Enzyme présente à la surface endothéliale des capillaires avoisinants les cellules adipeuses et musculaires. Elle catalyse l'hydrolyse des triglycérides transportés par les lipoprotéines circulantes.	D9N, G188E, P207L, D250N et N291S sont tous associés avec une perturbation du profil lipidique, notamment une augmentation de la triglycéridémie et du risque cardiovasculaire. S447X et T-93→T sont associés avec une amélioration du profil lipidique, une augmentation de l'activité de la LPL et un profil cardioprotecteur.	96-97
Apolipoprotéine E (Apo E)	Apolipoprotéine contenue sur les lipoprotéines riches en triglycérides et jouant un rôle important dans leur catabolisme. Elle est le principal ligand d'un sous-type de récepteur permettant la captation cellulaire des lipoprotéines.	Trois isoformes : E2 (C112R) est associé au désordre génétique de la dysbétalipoprotéïnémie (type III) et avec une augmentation du risque coronarien; E3 est l'isoforme le plus fréquent et considéré comme celui normal; E4 (C158R) est associé avec la maladie d'Alzheimer, l'hypertriglycéridémie et l'athérosclérose.	96, 98-100
Apolipoprotéine C-II (Apo C-II)	Apolipoprotéine présente à la surface des lipoprotéines riches en triglycérides et indispensable pour l'action hydrolytique de la LPL (cofacteur de la LPL).	V17X et Y37X ont été associés avec une diminution de l'activité de la LPL, concomitante avec une augmentation de la triglycéridémie moyenne. T-190→A a été associé avec une diminution de la transcription du gène et un possible impact sur l'activité de la LPL et la triglycéridémie.	101-103
Apolipoprotéine C-III (Apo C-III)	Apolipoprotéine présente à la surface de certaines lipoprotéines et ayant un rôle inhibiteur sur l'activité hydrolytique de la LPL (inhibition non-compétitive).	Les polymorphismes apo CIII-Sst, C-482→T et T-455→C ont été associés avec l'expression de différentes formes d'hypertriglycéridémie, ainsi que du syndrome métabolique. A23T a été associé avec l'expression d'une hypotriglycéridémie et une diminution de l'anabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides.	98, 104, 105
Apolipoprotéine A-V (Apo A-V)	Apolipoprotéine de surface lipoprotéique participant à l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycéride, en favorisant l'interaction avec la LPL et la liaison à certain type de récepteurs d'épuration.	T-1131→C et S19W sont associés avec une augmentation de la lipémie postprandiale, ainsi qu'avec une hypertriglycéridémie à jeun. Ils semblent associés à plusieurs sous-types d'hyperTG primaires.	96, 104, 106, 107
Lipase hépatique (LH)	Enzyme lipolytique synthétisée par les hépatocytes et liée à l'endothélium hépatique. Elle hydrolyse autant le contenu en phospholipides qu'en triglycérides des lipoprotéines et jouerait un rôle dans la clairance des résidus de lipoprotéines.	C-480→T est associé avec une diminution de l'activité de la LH plasmatique, la présence de particules LDL petites et denses et une augmentation du contenu des particules VLDL, LDL et HDL en triglycérides. T202T a été associé avec un plus grand risque de développer une deuxième MCA chez des patients ayant déjà des antécédents cardiaques.	108-110

**Tableau III** : Rôles et risques associés aux polymorphismes identifiés dans les gènes codant pour la lipoprotéine lipase, les apolipoprotéines E, C-II, C-III, A-V et la lipase hépatique.

## **Chapitre III : La lipoprotéine lipase et l'expression de l'hypertriglycéridémie primaire**

Parmi les gènes ayant fait l'objet de recherches pour identifier des bases moléculaires de l'hyperTG, celui codant pour la LPL a suscité beaucoup d'intérêt. La majorité des variants géniques identifiés au niveau du gène *LPL* seraient des allèles de susceptibilité à l'hyperTG très importants. Leur association avec l'hyperTG et le risque coronarien a été répliquée dans diverses populations partout à travers le monde. Il a de plus été estimé que près de 20% des patients exprimant une hyperTG seraient porteurs d'un des polymorphismes fréquemment observés dans le gène codant pour la LPL [116]. Une déficience génétique en LPL est donc un facteur de risque hypertriglycéridémiant fréquent dont il est primordial de tenir compte lors de la recherche de nouvelles bases moléculaires associées à l'hyperTG.

### ***3.1 Caractéristiques de la lipoprotéine lipase***

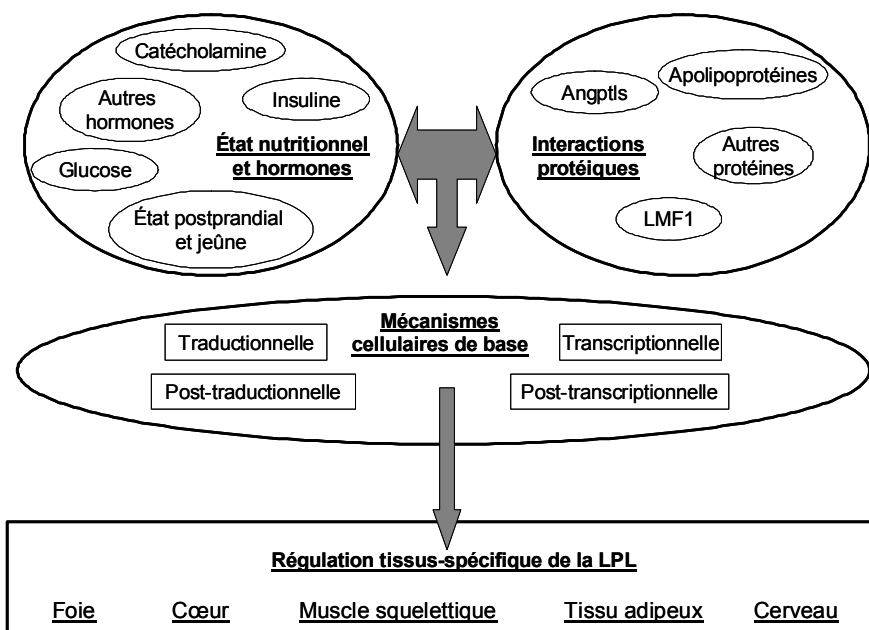
La LPL est une glycoprotéine de 448 acides aminés qui est localisée au niveau de l'endothélium vasculaire. Elle est responsable de l'hydrolyse spécifique des TG contenus dans les lipoprotéines plasmatiques. En plus de son rôle enzymatique, elle semblerait promouvoir l'échange de lipides entre les différents types de lipoprotéines, en plus de permettre l'ancrage des lipoprotéines au niveau de l'endothélium et ainsi faciliter leur captation [117-119]. La LPL fait partie de la famille des lipases extracellulaires, au même titre que les lipases hépatique et endothéliale [120]. Elle est synthétisée au niveau des cellules du parenchyme (myocytes et adipocytes) et est déplacée par la suite vers la lumière des capillaires, où le processus lipolytique des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL) survient [121]. Cette enzyme est active sous forme d'homodimère, où deux sous-unités glyquées de 55 kDa sont reliées par des interactions non covalentes afin de former un homodimère de type « tête-à-queue » [122]. La partie N-terminal de la LPL contient une triade catalytique (Ser132, Asp156 et His241) responsable de la lipolyse des lipoprotéines riches en TG [123, 124]. La partie C-terminal, quant à elle, serait requise pour l'interaction avec les substrats lipoprotéiques et l'endothélium. L'activité enzymatique de la LPL est dépendante de son cofacteur, l'apo C-II, qui est présente à la surface des lipoprotéines riches en TG [125]. De plus, comme plusieurs

lipases nouvellement synthétisées, la LPL requiert une certaine maturation au niveau du réticulum endoplasmique afin de procéder à son activation. Dans le cas de la LPL, cette fonction serait sous le contrôle du facteur de maturation des lipases 1 (LMF1) [126]. La perturbation de l'expression de la LPL, de sa maturation, de sa dimérisation ou de son activité catalytique engendrerait donc des perturbations importantes du métabolisme lipidique lipoprotéique.

Toutes les activités physiologiques distinctes de la LPL permettent de réguler l'apport en acide gras aux différents tissus. La LPL est exprimée par différents types cellulaires, incluant notamment les adipocytes, les myocytes, les macrophages et les cellules mammaires responsables de la lactation [121]. Toutefois, l'expression de la LPL n'est pas constitutive. En effet, plusieurs variables (alimentation, hormones, médicaments, facteurs génétiques, troubles métaboliques, etc.) modulent à la fois son activité et son expression, et par le fait même l'apport tissulaire en acide gras. Par exemple, l'apo C-II, l'apo A-V, l'insuline et la protéine stimulatrice de l'acylation (ASP) tendent tous à potentialiser l'activité de la LPL, tandis que l'apo C-III, l'ANGPTL3 (*angiopoietin-like protein 3*), l'ANGPTL4 (*angiopoietin-like protein 4*) et le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) diminuent ses fonctions [127]. Par ailleurs, lors d'un état postprandial, l'expression de la LPL est augmentée au niveau des tissus adipeux et elle est diminuée au niveau des cellules musculaires et cardiaques, permettant ainsi l'élaboration de réserves adipocytaires d'énergie. En état de jeûne, la situation inverse est observée afin de favoriser l'utilisation des réserves d'énergie lipidique [121, 128]. L'expression de la LPL est aussi influencée par diverses conditions métaboliques. Les niveaux plasmatiques élevés en glucose et en acide gras observés chez des patients diabétiques induiraient notamment l'expression de la LPL par les macrophages (possiblement par l'activation de certains récepteurs nucléaires), augmentant du fait même le risque coronarien individuel [129]. On remarque aussi que l'expression de la LPL peut être spécifique à certains tissus, en fonction de stimuli particuliers. Au niveau des adipocytes et des macrophages, l'expression de la LPL est augmentée par des agonistes du PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ), tandis que l'expression hépatique peut être stimulée par des agonistes des récepteurs nucléaires LXR $\alpha$  (*Liver X receptor*) ou PPAR $\alpha$  [130]. Le contrôle de l'expression de la LPL, particulièrement celui qui est tissu-spécifique, est un processus complexe faisant intervenir une multitude d'acteurs

clefs (figure 4). La perturbation d'un ou de plusieurs de ces mécanismes de régulation peut engendrer des changements importants au niveau de l'expression ou de l'activité de la LPL et ainsi provoquer des perturbations métaboliques.

Les variations dans les niveaux d'expression et d'activité de la LPL sont directement reliées au développement de dyslipidémies, particulièrement l'hyperTG, et peuvent être associées à l'expression du DT2, de l'HTA et de la MCV. L'expression de l'hyperTG engendrée par une déficience génétique en LPL serait d'ailleurs un médiateur important dans l'expression de ces différentes pathologies [62]. La déficience génétique en LPL est incontestablement l'une des étiologies principales d'hyperTG chez l'humain et contribuerait possiblement à l'augmentation de la prévalence de MCV dans certaines populations [62, 131].



**Figure 4** : Représentation schématisée du mécanisme complexe de régulation tissu-spécifique de la lipoprotéine lipase.

La lipoprotéine lipase (LPL) est régulée d'une manière tissu-spécifique au niveau traductionnelle, post-traductionnelle, transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Plusieurs protéines peuvent influencer l'expression et l'activité de la LPL. L'état nutritionnel et hormonal influencent directement ou indirectement l'expression tissu-spécifique de la LPL. La régulation tissu-spécifique de la LPL en réponse à la demande énergétique et aux changements hormonaux implique donc un mécanisme complexe comprenant plusieurs acteurs clés.

Inspiré de : Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E271-88. [131]

### ***3.2 La lipoprotéine lipase et l'hypertriglycéridémie primaire***

Le gène de la LPL, situé sur le chromosome humain 8p22, est très polymorphe [132]. En effet, plus de 400 polymorphismes ont été identifiés au niveau du locus du gène humain de la LPL, selon l'*Ensembl Genome Browser* (version 59; août 2010). Toutefois, seulement la moitié de ces polymorphismes a été associée avec l'expression d'une forme primaire d'hyperTG chez l'humain [131, 133]. Dans la population québécoise toutefois, moins d'une dizaine de polymorphismes ayant une influence sur l'activité ou l'expression de la LPL ont été identifiés. Les principaux polymorphismes associés avec l'expression d'hyperTG qui ont été retrouvés dans cette population sont les mutations dites nulles G188E, P207L et D250N, ainsi que les mutations dites défectives N291S et D9N [134-136]. Les mutations dites nulles sont associées à une perte d'activité complète de la protéine et conduisent ainsi à une diminution de 50% (déficit partiel) et 100% (déficit total) de l'activité enzymatique de la LPL chez des porteurs hétérozygotes et homozygotes, respectivement. Les mutations dites défectives, quant à elles, sont associées à une perte partielle de l'activité de la protéine et se soldent donc par une diminution d'environ 25% et 50% de l'activité de l'enzyme à l'état hétérozygote et homozygote, respectivement. Les porteurs de mutations dites défectives, ainsi que ceux hétérozygotes pour une mutation dite nulle, ont généralement un déficit partiel en LPL associé à l'expression de dyslipidémie mixte et à un risque athérogène élevé [137]. Les porteurs homozygotes pour des mutations dites nulles, quant à eux, expriment un déficit total en LPL associé à un état lipémique et à ses complications cliniques concomitantes [137].

Chez l'humain, le déficit total en LPL est l'étiologie principalement responsable de l'expression de l'hyperchylomicronémie familiale (dyslipoprotéïnémie de type I), une maladie autosomique récessive rare caractérisée par un état lipémique et un risque accru de pancréatite [137]. La prévalence mondiale du déficit totale en LPL est estimée à environ 1/1 000 000 [82]. Au Québec, l'hyperchylomicronémie familiale est cependant plus fréquente qu'ailleurs dans le monde, particulièrement chez les sujets d'origine canadienne-française. Chez cette population, elle atteindrait une prévalence de plus de 1/5000 selon les régions [138]. Par ailleurs, environ 80% des cas de dyslipoprotéïnémie de type I chez des patients vivant dans la région du

SLSJ serait expliqués par la mutation P207L localisée au niveau de l'exon 5 du gène *LPL* [132]. Le déficit total en LPL n'est toutefois pas la seule base moléculaire associée à l'expression d'un type I. Un déficit en apo C-II, en apo A-V, en LMF1 ou en GPIHBP1, ainsi que la présence d'un inhibiteur circulant de la LPL (tel que l'apo C-III) sont d'autres exemples d'étiologies primaires associées avec ce rare type de dyslipoprotéinémies [13, 126, 139, 140]. Chez les sujets qui en sont atteints, la synthèse des CM s'effectue normalement. Leur catabolisme est toutefois considérablement ralenti causant ainsi une accumulation excessive de CM dans la circulation sanguine. Dans de pareilles circonstances, il est possible de retrouver une grande concentration de CM dans le plasma même après un jeûne de 12 heures. Observée cliniquement pour la première fois en 1932 par Bürger et Grütz, l'hyperchylomicronémie familiale se manifeste généralement à un très jeune âge par une splénomégalie, une hépatomégalie, une xanthomatose éruptive, des douleurs abdominales, des atteintes pancréatiques, ainsi qu'une lipémie rétinienne [137, 139, 141]. Par contre, l'expression clinique est non spécifique, particulièrement chez les jeunes patients [142]. En plus d'être associée avec un état lipémique, cette forme d'hyperTG primaire est aussi associée avec une perturbation globale du bilan lipidique, soit : une diminution des concentrations plasmatiques c-HDL, de c-LDL, et d'apo B-100 [82].

Pour le moment, il n'existe pas encore de traitement efficace contre cette dyslipidémie primaire. S'il est vrai qu'aucun traitement ne permette encore de normaliser de façon systématique la triglycéridémie dans l'hyperchylomicronémie familiale et d'en prévenir les complications, il y a toutefois quelques approches pharmacologiques présentant un certain intérêt. Quelques traitements sont en cours d'évaluation clinique chez l'homme, tels qu'une thérapie génique innovatrice et l'utilisation d'antioxydants à forte dose [143-145]. Toutefois, l'intervention thérapeutique demeure essentiellement diététique : restreindre l'apport en graisse alimentaire et compenser la différence calorique par des acides gras à chaîne moyenne hydrosoluble (6 à 12 carbones), qui passent directement au foie sans l'intermédiaire des CM. Par ailleurs, une diète hebdomadaire riche en oméga-3 et en acides gras à chaîne moyenne aurait permis de réduire rapidement la triglycéridémie moyenne chez 32 patients hyperchylomicronémiques [146]. Cependant, cette approche n'empêcherait pas, à plus long terme, la survenue de pancréatites à

répétition. La mise au point d'un traitement efficace et novateur pour l'hyperchylomicronémie familiale est donc essentielle pour espérer améliorer la qualité de vie de ces patients.

On estime qu'environ 5% des descendants des individus originaires des régions de Charlevoix et du SLSJ seraient porteurs hétérozygotes d'un allèle muté (P207L) dans le gène de la LPL et donc atteints d'un déficit partiel en LPL [134]. Toutefois, la prévalence d'individus atteints d'un déficit partiel en LPL dans ces régions est beaucoup plus élevée que 5%. En effet, si on considère la proportion non négligeable d'individus porteurs hétérozygotes pour la mutation nulle G188E et ceux hétérozygotes et homozygotes pour les mutations défectives D9N et N291S, le taux de porteurs de mutations délétères dans le gène de la LPL dans les régions de Charlevoix et du SLSJ avoisine probablement 10 à 15% [98, 99, 132, 147, 148]. Comparativement à ce qui est observé lors d'un déficit total en LPL, le métabolisme des CM s'effectuerait correctement en présence d'un déficit partiel. Ce dernier serait plutôt associé à une perturbation du métabolisme des VLDL. En effet, différentes équipes ont remarqué une augmentation de la teneur en TG et en cholestérol au niveau des particules VLDL, la présence de particules LDL petites et denses, de même qu'une diminution de la concentration en c-HDL, ainsi que du nombre de particules HDL chez des sujets hétérozygotes pour la mutation nulle P207L [148-150]. Le profil métabolique des patients atteints d'un déficit partiel en LPL serait donc plutôt caractérisé par une forme primaire d'hyperTG associée à un risque athérogénique accru, surtout en présence concomitante d'un tour de taille élevé (>50<sup>e</sup> percentile) et d'une hyperinsulinémie [137]. Le déficit partiel en LPL, qui est fréquemment observé dans certaines populations, pourrait ainsi expliquer non seulement une grande proportion des cas d'hyperTG observés en clinique (particulièrement des cas d'hyperTG de type III et IV), mais aussi le profil de risque athérogénique souvent associé à ces hyperTG. Toutefois, la triglycéridémie à jeun est fréquemment normale chez les sujets atteints d'un déficit partiel en LPL durant leurs quatre premières décennies de vie. L'expression de l'hyperTG est très variable chez ces patients, notamment en fonction des autres facteurs génétiques et secondaires concomitants.



Alors que près de la moitié des polymorphismes retrouvés dans le gène *LPL* seraient associés à une augmentation du risque coronarien, seulement quelques-uns auraient plutôt un effet cardioprotecteur. Deux polymorphismes dont la MAF est d'environ 10% (S447X et g.-93T>G) ont notamment été associés à une diminution du risque d'exprimer une MCA [136, 151]. La présence de la mutation S447X, produisant une protéine tronquée au niveau du 447<sup>e</sup> acide aminé, serait associée à un niveau plus élevé de l'activité de la LPL, une diminution de la triglycéridémie moyenne, une augmentation de la concentration plasmatique en c-HDL, une diminution de la pression artérielle et une possible diminution du risque coronarien [97, 152]. Par ailleurs, en raison de son association avec l'amélioration du bilan lipidique et de la diminution de la mortalité cardiovasculaire, le variant de la LPL comprenant le polymorphisme S447X a été sélectionné comme transgène dans une thérapie génique novatrice pour le traitement de l'hyperchylomicronémie familiale [144, 145]. De plus, une transition commune dans le promoteur du gène de la LPL, g.-93T>G, a aussi été associée avec une diminution de la triglycéridémie moyenne, en lien avec une augmentation de l'expression du gène [153]. L'identification de facteurs génétiques protecteurs est aussi une portion importante dans l'évaluation du risque cardiovasculaire individuel. Elle permet notamment de mieux comprendre les mécanismes moléculaires pouvant expliquer l'association entre le génotype et le phénotype et de mieux documenter le risque cardiovasculaire individuel.

La LPL joue un rôle central et primordial dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique. Les différentes percées scientifiques ont permis de mieux comprendre ses fonctions, mais aussi l'impact des différentes variations géniques identifiées dans sa séquence codante sur le risque d'hyperTG et de MCV. Cependant, la prédisposition génétique à l'hyperTG comprend une multitude de variants génétiques autres que ceux retrouvés au niveau du locus du gène *LPL*. Communs ou rares, ces variants ont un effet allant de faible à modéré sur l'expression du phénotype. En plus de ces nombreux variants géniques, plusieurs facteurs secondaires influencent aussi l'expression du phénotype et ainsi augmente son hétérogénéité. Il demeure ainsi important d'identifier de nouveaux variants pouvant influencer l'expression de l'hyperTG afin d'améliorer la prédiction du risque individuel, en plus de favoriser le développement de nouvelles approches pharmacologiques.

## **Chapitre IV : GPIHBP1 : un nouveau modulateur de la triglycéridémie**

Visant à cibler de nouvelles bases moléculaires de l'hyperTG chez l'humain, des travaux effectués sur des modèles animaux ont permis d'identifier une nouvelle protéine susceptible d'avoir un rôle important dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique : GPIHBP1 [16]. Cette protéine, qui est impliquée à plusieurs niveaux dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG dépendant de la LPL, serait notamment associée à l'expression d'hyperTG rare et sévère, en plus de l'expression éventuelle d'hyperTG modérée plus fréquente dans la population en général [13]. Une meilleure compréhension des fonctions de GPIHBP1, ainsi que des différents mécanismes régulant son expression, permettra éventuellement de mieux comprendre son implication dans l'étiologie de différentes formes d'hyperTG observées chez l'humain.

### ***4.1 La découverte de GPIHBP1 : preuves expérimentales de son implication dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique***

Initialement identifiée par Ioka et ses collaborateurs en 2003, la protéine GPIHBP1 semblait pouvoir créer des liens de hautes affinités avec les particules HDL (Kd=2-3 g/mL) [154]. Il avait alors été suggéré que GPIHBP1 aurait une importance dans la lipolyse sélective de lipides transportés par les HDL, mais n'aurait toutefois aucun rôle à jouer dans le transport à rebours du cholestérol [154]. Cependant, suite aux découvertes plus récentes, cette protéine membranaire émergerait plutôt comme un acteur clef dans le processus métabolique des lipoprotéines riches en TG [16, 84]. Tout d'abord, une accumulation excessive de CM dans le plasma (TG > 5000 mg/dl) a été observée chez des souris déficientes pour le gène *GPIHBP1* (souris *Gpihbp1* *-/-*) et ce, malgré l'administration d'une diète faible en gras [155]. De plus, cette protéine de la famille Ly6 (*lymphocyte antigen 6*) est exprimée de manière significative principalement au niveau des cellules endothéliales microvasculaires du cœur, des adipocytes et des muscles, c'est-à-dire précisément là où le processus lipolytique des lipoprotéines riches en TG survient [155]. Il a aussi été observé que la transfection d'un vecteur d'expression pour la protéine GPIHBP1 conférait aux cellules l'habileté à lier à la fois la LPL et les CM [155]. GPIHBP1 serait donc

impliquée dans le processus de reconnaissance entre la LPL et les lipoprotéines riches en TG, un processus clef de leur catabolisme.

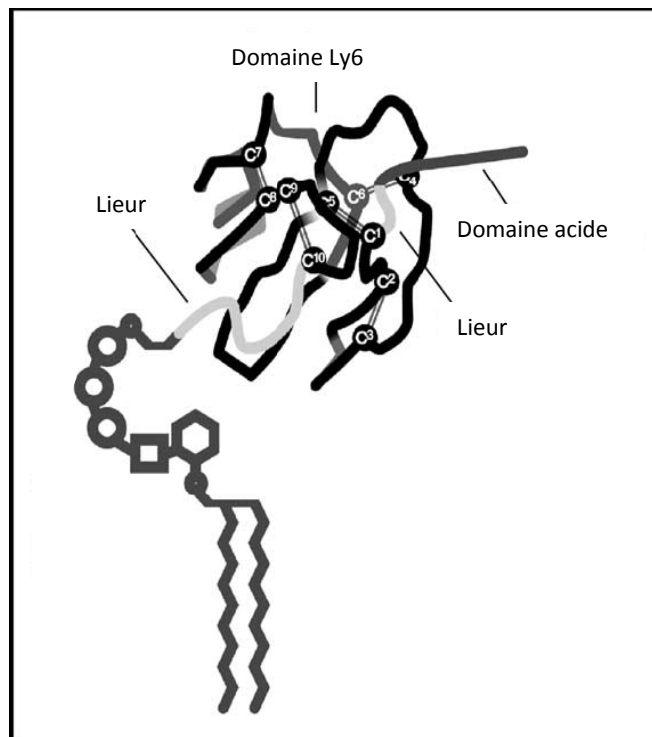
Tout comme l'expression de la LPL, celle de GPIHBP1 serait régulée par les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et l'état nutritionnel. En effet, l'activation des PPAR $\gamma$ , régulant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme et l'adipogenèse, augmente le niveau de transcription du gène *GPIHBP1* [17]. D'ailleurs, différents sites de liaison présumés pour les PPAR $\gamma$  (séquence PPRE, *peroxysome proliferator response element*) ont été identifiés en amont de la séquence codante du gène murin. La présence de tels sites PPRE au niveau du promoteur du gène humain demeure toutefois encore incertaine. De plus, il a été observé que les quantités d'ARNm de la protéine GPIHBP1 tendent à augmenter au niveau des myocytes et des adipocytes durant un état de jeûne prolongé chez la souris, et à retrouver un niveau basal suite à l'administration d'une diète riche en glucides [17]. Cependant, l'état de jeûne n'a pas le même impact sur l'expression de la LPL. Comme expliqué précédemment, un jeûne prolongé tend à diminuer le niveau des transcrits de LPL dans le tissu adipeux blanc, mais à les augmenter au niveau des myocytes et des tissus adipeux bruns. Cette différence du contrôle de l'expression de la LPL et de GPIHBP1 au niveau du tissu adipeux ne trouve pas d'explication satisfaisante pour le moment. L'une des possibilités serait que cette augmentation de l'expression de GPIHBP1 servirait à une tout autre fonction que celle de la lipolyse des CM et des VLDL. Toutes ces observations supportent donc fortement le rôle biologique de la protéine GPIHBP1 dans la lipolyse des lipoprotéines riches en TG. Toutefois, il importe d'étudier encore plus longuement cette protéine afin d'élucider son mode d'action et ses autres fonctions possibles.

#### ***4.2 GPIHBP1 : une plateforme endothéliale pour la lipolyse***

Pour exercer son action lipolytique, la LPL doit être fixée sur l'endothélium vasculaire. La capacité de la LPL à se lier aux lipoprotéines et à la surface des capillaires sanguins serait assurée par sa partie C-terminal qui comporte un domaine de liaison à l'héparine chargé positivement [156]. Selon plusieurs groupes de recherche, ce domaine pourrait être responsable de la fixation de la LPL à la surface des capillaires par une interaction ionique avec la molécule de l'endothélium

capillaire HSPG (*heparan sulfate proteoglycans*), qui possède un domaine chargé négativement [157]. Une administration intraveineuse d'héparine permet de déstabiliser cette interaction et de recueillir la LPL dans le plasma [156, 157]. Ce procédé impliquerait un déplacement de la LPL par l'héparine pour ses sites de liaison *in vivo*. Cette technique est d'ailleurs utilisée afin de quantifier l'activité et la masse de LPL [158]. La glycoprotéine HSPG n'est toutefois pas la seule protéine membranaire impliquée dans l'ancrage des CM, des VLDL et de la LPL à la surface de l'endothélium vasculaire. Il a été observé, à plusieurs reprises, que malgré le retrait des HSPG sur la surface cellulaire d'adipocytes en culture, des molécules de LPL s'y trouvaient toujours liées [159, 160]. Afin d'expliquer ces résultats, d'autres points d'ancrage possibles pour la LPL ont été recherchés sur la surface endothéliale. C'est dans cette vision que l'association entre la protéine GPIHBP1 et la fixation de la LPL au niveau de l'endothélium vasculaire a été examinée.

L'implication de GPIHBP1 dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG a préalablement été documentée par Beigneux et ses collaborateurs [16, 161]. Selon eux, cette protéine de 228 acides aminés joue un rôle important dans le processus de lipolyse, grâce à sa capacité de liaison de la LPL et des lipoprotéines. Comme toutes les protéines de la famille Ly6, GPIHBP1 contient un motif Ly6 riche en cystéine (acides aminés 65-136), dont l'espacement entre 10 résidus cystéines et un site de N-glycosylation sur le résidu Asn-76 sont grandement conservés dans l'évolution [154]. Elle comprend aussi un domaine N-terminal (acide aminé 25-50) riche en acides aminés acides (aspartate et glutamate) qui se situe près du peptide signal et en amont du domaine conservé Ly6 (figure 5). Ce domaine chargé positivement serait responsable de l'interaction entre GPIHBP1 et le domaine chargé négativement de la LPL [162]. Comme c'est le cas pour la liaison entre la LPL et HSPG, l'héparine permet une inhibition de l'interaction entre GPIHBP1 et la LPL [163]. Une incubation avec la phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol (PIPLC) interfère aussi dans le processus de reconnaissance moléculaire, par le clivage de l'ancrage GPI qui permet à la protéine GPIHBP1 d'être accrochée à la surface endothéliale capillaire [155].



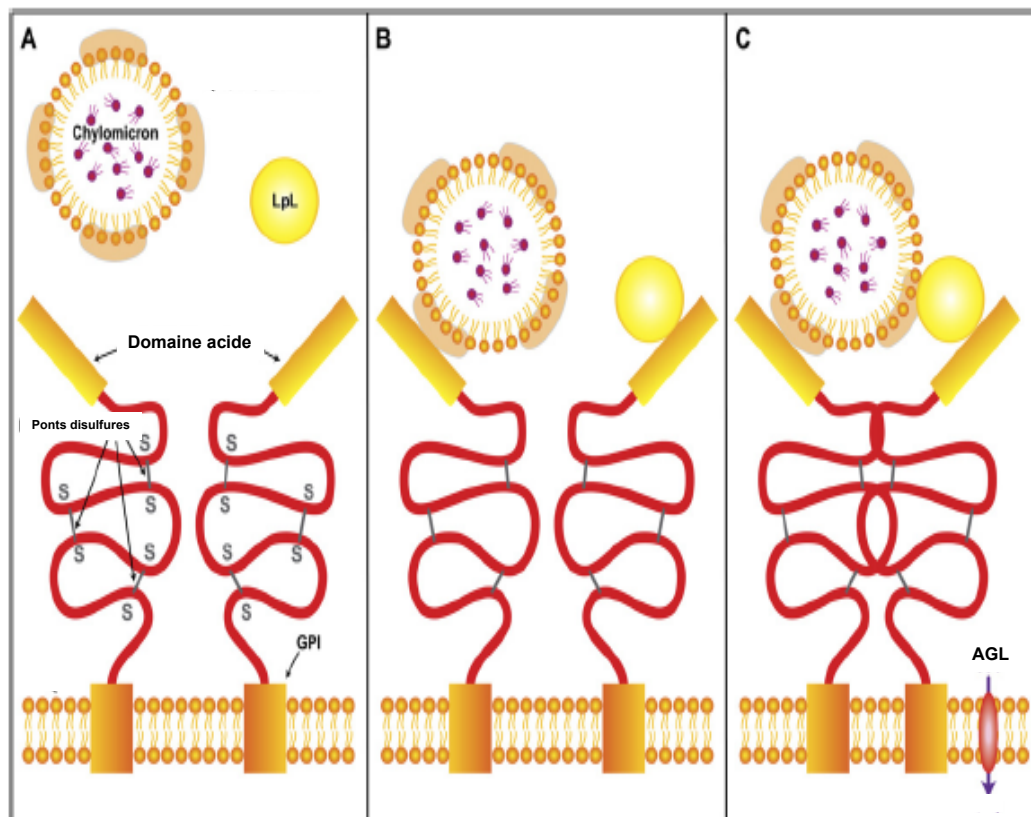
**Figure 5 :** Structure tertiaire de la protéine GPIHBP1.

La protéine GPIHBP1 est constituée de deux domaines protéiques reliés par un lieur de 16 acides aminés. En N-terminal, tout près du peptide signal, se trouve un domaine riche en acides aminés acides, conférant par conséquent une charge nette positive à cette portion de la protéine. En aval de du domaine acide, on retrouve le domaine Ly-6 riche en résidus cystéines, dont l'espacement entre 10 résidus cystéines est conservé dans l'évolution. Ces domaines semblent avoir un rôle important dans l'interaction entre GPIHBP1 et la LPL.

Modifié de : Beigneux AP, Weinstein MM, Davies BS, *et al.* GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 211-6. [161]

L'interaction entre GPIHBP1 et la LPL est complexe et nécessite à la fois les domaines acide et Ly6. Certains spécialistes ont émis l'hypothèse que le domaine acide fonctionnerait comme un « aimant » pour les protéines possédant un domaine de liaison à l'héparine, tandis que le domaine Ly6 constituerait un domaine crucial impliqué dans la liaison du ligand [162]. GPIHBP1 se comporterait donc comme une plateforme permettant une certaine proximité entre la LPL et la particule lipoprotéique, favorisant ainsi l'activité catalytique de la lipase (figure 6). Il n'est toutefois pas encore certain si une molécule de GPIHBP1 peut lier simultanément un CM et la LPL. Si ce n'est pas le cas, deux GPIHBP1 doivent être très près l'une de l'autre sur la surface endothéliale afin d'observer l'effet stimulateur de la lipolyse. Par contre, il est aussi possible que GPIHBP1 puisse former un homodimère afin

d'être capable de lier plus d'un ligand à la fois [164]. La formation de dimères est d'ailleurs très courante dans la famille Ly6, notamment pour le récepteur uPAR (« *urokinase-type plasminogen activator receptor* ») [165]. Il est aussi possible que les protéines GPIHBP1 et HSPG puissent jouer un rôle synergique permettant une lipolyse accrue des CM par la LPL [164]. Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'interaction entre GPIHBP1 et la LPL est à prévoir dans le futur et surtout primordiale pour mieux comprendre l'implication de la protéine GPIHBP1 dans l'expression clinique de certaines perturbations métaboliques.



**Figure 6 :** Plateforme endothéliale pour l'hydrolyse des chylomicrons par la lipoprotéine lipase.  
 A) GPIHBP1 contient un domaine GPI permettant de s'ancrer à la surface cellulaire endothéliale, ainsi qu'un domaine N-terminal acide permettant la liaison avec la lipoprotéine lipase (LPL) et les chylomicrons.  
 B) Le domaine acide de GPIHBP1 peut lier les chylomicrons grâce à une interaction avec le domaine chargé positivement de la lipoprotéine et la LPL grâce à un domaine de liaison à l'héparine chargé positivement.  
 C) La lipolyse catalysée par la LPL impliquerait possiblement l'homodimérisation de deux molécules GPIHBP1. Les acides gras libres (AGL) libérés sont captés par les cellules avoisinantes.

Modifié de : Ory DS. Chylomicrons and lipoprotein lipase at the endothelial surface: bound and GAG-ged? *Cell Metab* 2007; 5: 229-31. [164]

La principale preuve venant appuyer le rôle de GPIHBP1 dans la liaison de la LPL *in vivo* a été apportée par Weinstein et ses collaborateurs. En effet, cette équipe a observé une cinétique différentielle de l'apparition de la LPL dans le plasma suite à l'administration d'héparine entre des souris *Gpihbp1* <sup>-/-</sup> et des souris normales [163]. L'apparition de la LPL dans le plasma serait retardée chez les souris *Gpihbp1* <sup>-/-</sup>, possiblement en raison de l'absence d'un point d'ancrage important pour la LPL sur la surface endothéliale. Cette observation porte à croire qu'il existe minimalement deux groupes distincts de LPL pouvant être libérés par une administration d'héparine. Weinstein et ses collaborateurs ont spéculé qu'il y aurait un groupe intravasculaire de LPL lié à la surface endothéliale par GPIHBP1 et un groupe extravasculaire lié à la surface cellulaire par la glycoprotéine HSPG. Le groupe intravasculaire de LPL serait celui relâché dans le plasma rapidement suite à l'administration intraveineuse d'héparine, tandis que celui extravasculaire apparaîtrait plus tardivement. Si la protéine GPIHBP1 est réellement responsable de la liaison du groupe intravasculaire, il est donc normal d'observer un délai dans l'apparition de la LPL plasmatique suite à l'administration d'héparine chez les souris *Gpihbp1* <sup>-/-</sup>. De plus, ce même groupe de recherche a observé une absence d'augmentation de la LPL plasmatique chez des souris déficientes en GPIHBP1, suite à l'injection intraveineuse d'Intralipid [163]. Généralement, ce type d'émulsion de molécules de TG de gros diamètre (>200 nm de diamètre) permet le détachement de la LPL intravasculaire uniquement chez des souris normales. Cette observation vient donc appuyer davantage l'hypothèse que les souris déficientes en GPIHBP1 semblent n'avoir qu'un groupe extravasculaire de LPL en raison de l'absence d'un point d'ancrage intravasculaire important pour la LPL. Cette hypothèse n'a cependant pas encore été vérifiée chez l'humain. Franssen et ses collaborateurs ont toutefois observé un très faible niveau de LPL post-héparine chez deux patients déficient génétiquement en GPIHBP1, même plusieurs minutes après l'administration d'héparine [166]. Cette différence entre le modèle murin et celui humain pourrait notamment s'expliquer par la différence entre la dose d'héparine administrée : environ 2000 IU/kg chez la souris versus 50 IU/kg chez l'humain. Toutefois, il semble manifeste qu'une déficience génétique en GPIHBP1 serait associée avec un très faible niveau de LPL post-héparine, que ce soit chez l'humain ou la souris.

### ***4.3 GPIHBP1 : un stabilisateur de la lipoprotéine lipase***

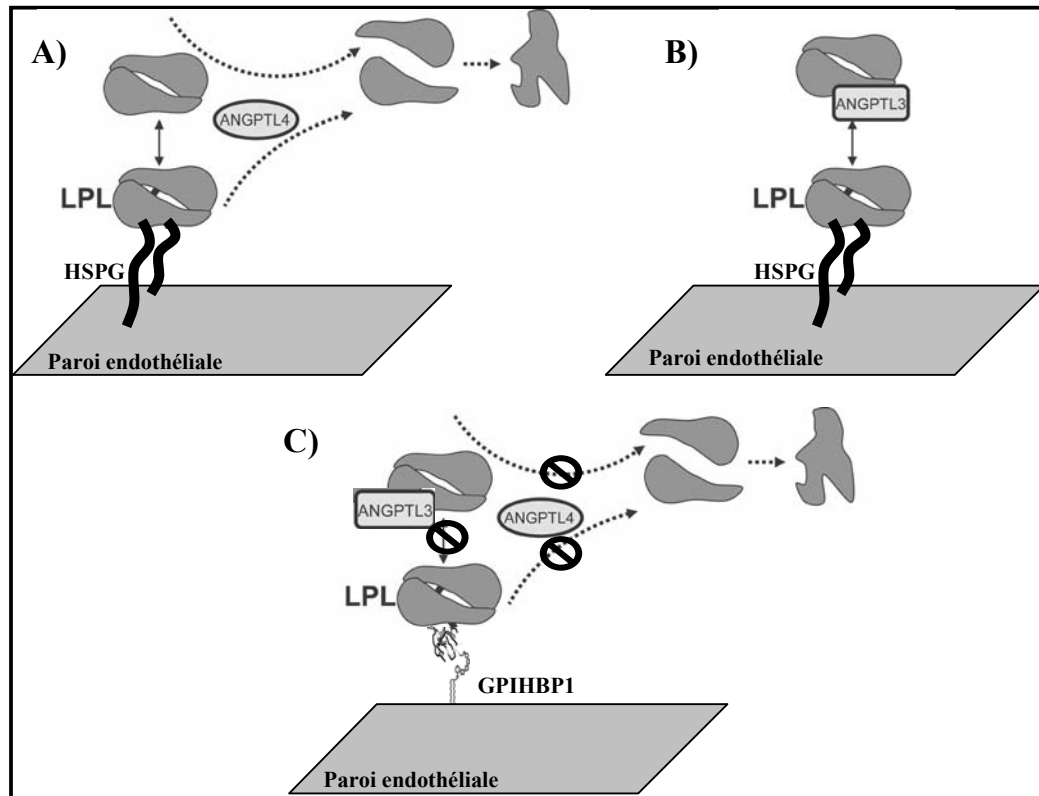
Récemment, il a été démontré que le phénotype d'hyperTG observé chez les souris *Gpihbp1* *-/-* serait renversé par l'administration d'anticorps anti-*angiopoietin-like protein 3* (anti-ANGPTL3) et *angiopoietin-like protein 4* (anti-ANGPTL4) [18]. ANGPTL3 et ANGPTL4 sont deux protéines membres de la famille de l'angiopoïétine reconnues pour moduler le métabolisme lipoprotéique, notamment grâce à leur action inhibitrice sur la LPL [167-169]. ANGPTL4 accélère la dissociation irréversible des dimères actifs de LPL en monomères inactifs, tandis qu'ANGPTL3 inhibe plutôt la LPL de manière réversible (figure 7) [170]. Leur action inhibitrice impliquerait, notamment pour ANGPTL3, une augmentation du clivage et de l'inactivation de la LPL par des proprotéines convertases [171]. Toutefois, le mécanisme exact par lequel elles opèrent n'a pas encore été bien défini.

Tout comme l'héparine, GPIHBP1 stabilise la LPL, sans toutefois pouvoir l'activer. La stabilisation de la LPL apportée par GPIHBP1 s'avère beaucoup plus efficace pour contrer l'inhibition de la LPL par ANGPTL4 et ANGPTL3 que l'est celle de l'héparine ou des HSPG (figure 7) [18]. En effet, ces deux ANGPTL effectueraient leur fonction inhibitrice sur la LPL même si cette dernière est stabilisée par l'héparine. Ce n'est toutefois pas le cas si la LPL est stabilisée par GPIHBP1. *In vitro*, GPIHBP1 réduirait de 20 fois l'inhibition de la LPL par ANGPTL4 et de 40 fois celle induite par ANGPTL3. Il a d'ailleurs été observé que les niveaux plasmatiques de TG étaient beaucoup plus faibles chez des souris déficientes à la fois en GPIHBP1 et en l'une ou l'autre des deux ANGPTL [18].

Considérant l'association entre GPIHBP1 et l'inhibition de la LPL par ces deux protéines plasmatiques, Sonnenburg et ses collaborateurs ont supposé que l'hyperTG observée chez les souris *Gpihbp1* *-/-* pouvait s'expliquer par une recrudescence de l'inhibition de la LPL par ANGPTL3 et ANGPTL4. C'est ainsi qu'ils ont remarqué qu'en inhibant ces deux protéines plasmatiques par l'administration intraveineuse d'anticorps neutralisants, il était possible de diminuer la triglycéridémie moyenne chez ce modèle murin. L'administration d'anticorps anti-ANGPTL s'avérerait d'ailleurs être un futur traitement efficace contre certains types d'hyperTG. Ainsi, il semble que GPIHBP1 n'ait pas seulement un rôle à jouer au niveau de l'ancrage de



la LPL aux parois des capillaires, mais également dans la stabilisation et la prévention de l'inhibition de la LPL par des inhibiteurs circulants.



**Figure 7 :** Représentation schématique de l'interaction entre la lipoprotéine lipase, les HSPG, l'ANGPTL3, l'ANGPTL4 et la protéine GPIHBP1.

A) ANGPTL4 catalyse la dissociation irréversible des dimères actifs de la lipoprotéine lipase (LPL) en monomères inactifs lorsque cette dernière est associée avec une molécule d'HSPG à la surface endothéliale.

B) ANGPTL3 inhibe la LPL, sans toutefois influencer significativement son taux d'inactivation lors que cette dernière est associée avec une molécule d'HSPG à la surface endothéliale.

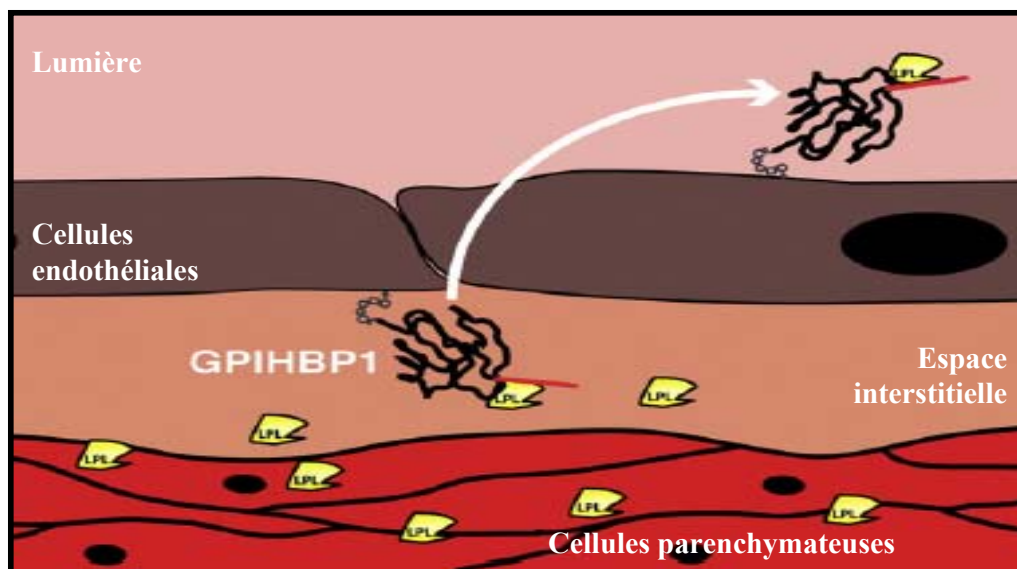
C) Lorsque la LPL est ancrée à la surface endothéliale par une molécule GPIHBP1, cette dernière stabilise la LPL et empêche l'action inhibitrice des deux ANGPTL.

Inspiré de : Shan L, Yu XC, Liu Z, *et al.* The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2009; 284: 1419-24. [170]

#### ***4.4 GPIHBP1 : une navette transendothéliale***

La lipolyse des lipoprotéines riches en TG par la LPL à la surface apicale de l'endothélium vasculaire est une étape clef du métabolisme lipidique-lipoprotéique permettant le stockage et l'apport énergétique en lipides. Cependant, la LPL n'est pas exprimée par les cellules endothéliales, mais plutôt par les myocytes et les adipocytes (c'est-à-dire par les cellules parenchymateuses). Il est donc nécessaire que la LPL traverse l'espace interstitiel et transendothélial afin d'atteindre la lumière vasculaire pour y exercer son rôle lipolytique. L'un des modèles imaginés dans le passé, impliquant le récepteur des VLDL, n'a pas été retenu par la majorité de la communauté scientifique, notamment en raison de l'absence d'hyperTG significative chez les souris déficientes pour ce récepteur cellulaire [172, 173]. Ce n'est qu'en 2010 qu'une équipe de chercheurs a réussi à émettre une hypothèse plausible pour ce processus de transport transendothélial, impliquant la protéine GPIHBP1 [19].

Grâce à l'utilisation d'anticorps chez un modèle murin, Davies et collaborateurs ont en effet pu démontrer que la LPL était cotransportée avec GPIHBP1 à travers la cellule endothéliale, un processus dépendant de la capacité de GPIHBP1 à lier la LPL, et que cette dernière restait emprisonnée à l'intérieur de l'espace interstitiel en cas d'une déficience génétique en GPIHBP1 [19]. Ainsi, la protéine GPIHBP1 agirait comme une navette transendothéliale par laquelle la LPL voyagerait de l'espace interstitiel entre les cellules parenchymateuses adipocytaires et musculaires jusqu'à la surface luminale des capillaires sanguins (figure 8) [173]. Cet important rôle joué par GPIHBP1 expliquerait d'ailleurs pourquoi on observe une diminution de la présence de la LPL au niveau de l'endothélium vasculaire chez les patients génétiquement déficients en GPIHBP1 [13]. Toutefois, il est impossible pour l'instant d'affirmer avec certitude si GPIHBP1 est la seule protéine à intervenir dans ce processus. Il a déjà été démontré que d'autres molécules, telles que les cavéoles et les HSPG, pourraient aussi jouer un rôle important dans ce processus de translocation [172, 174].



**Figure 8 :** Translocation transendothéliale de la lipoprotéine lipase.

La lipoprotéine lipase (LPL) est produite par les cellules parenchymateuses et sécrétée dans l'espace interstitiel. Après sa liaison à la protéine GPIHBP1, le complexe est transporté de la surface basolatérale, à travers la cellule endothéliale, jusqu'à la surface apicale. La LPL se retrouve donc au niveau de la lumière des capillaires, où elle catalysera l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les lipoprotéines.

Modifié de : Fisher EA. GPIHBP1: Lipoprotein Lipase's Ticket to Ride. *Cell Metab* 2010; 12: 1-2. [173]

#### 4.5 Le gène *GPIHBP1* et l'hypertriglycéridémie primaire

Plusieurs observations supportent l'idée qu'une déficience génétique en GPIHBP1 serait une cause plausible d'hyperTG chez l'humain. Tout d'abord, il a été observé que tout comme les souris déficientes génétiquement en LPL, celles déficientes en GPIHBP1 expriment une hyperchylomicronémie sévère, malgré l'adoption d'une diète faible en gras. Cette hyperchylomicronémie est caractérisée par un plasma laiteux, une concentration plasmatique en TG aussi élevée que 3000 mg/dl (34 mmol/L), de même qu'une augmentation de la cholestérolémie, de la taille des lipoprotéines et des niveaux plasmatiques en apo B-48 [16]. Comparativement à la déficience en LPL, celle en GPIHBP1 n'entraîne toutefois pas la mort des ratons. Ainsi, la déficience totale en GPIHBP1 pourrait ne pas induire une hyperchylomicronémie aussi sévère que celle induite par une déficience totale en LPL chez le raton [16, 154]. Cette déclaration s'appuie d'ailleurs sur l'observation qu'une déficience en GPIHBP1 n'éliminerait pas complètement la lipolyse des lipoprotéines par la LPL, possiblement en raison de la présence d'autres sites de

liaison pour la LPL sur la surface endothéliale, tels les HSPG [16]. Par contre, il n'est pas encore certain si l'efficacité de l'activité catalytique est comparable entre les divers sites de liaison possibles. En effet, il semble que la protéine GPIHBP1 contribuerait à une hydrolyse des TG par la LPL qui est beaucoup plus efficace que celle pouvant être induite par la glycoprotéine membranaire HSPG.

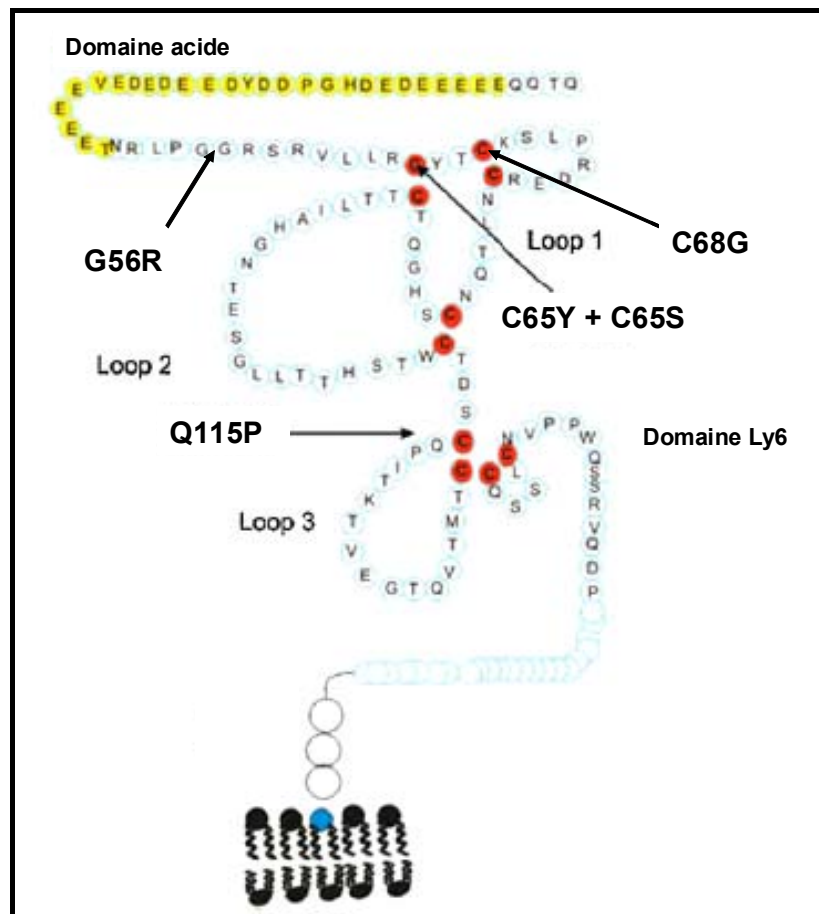
En référence à ces différentes observations chez le modèle murin, quelques recherches ont été effectuées chez l'humain afin de vérifier si une déficience partielle ou totale en GPIHBP1 pouvait induire une hyperchylomicronémie telle qu'observée chez les humains déficients en LPL. Suite à un séquençage des quatre exons du gène *GPIHBP1* chez 160 patients adultes avec une hyperchylomicronémie à jeun idiopathique, une mutation ponctuelle a été identifiée : le polymorphisme G56R (figure 9) [15]. Un frère et sa sœur se sont avérés homozygotes pour cette mutation. Ces deux patients exprimaient un phénotype très semblable à celui observé chez les souris déficientes en GPIHBP1 [16]. On peut donc penser que le caractère homozygote pour G56R conduit à une déficience totale pour GPIHBP1, et par conséquent à l'expression d'une hyperchylomicronémie. De plus, le caractère hétérozygote pour ce polymorphisme serait associé avec l'expression d'une hyperTG modérée, très semblable à la dysbêtalipoprotéïnémie familiale, chez un jeune patient homozygote pour l'isoforme apo E2 [15]. En postulant que le caractère hétérozygote pour ce polymorphisme mène à une déficience partielle de cette protéine, GPIHBP1 serait, tout comme la LPL, associée à l'expression d'hyperTG modérée. Toutefois, dans le cas présent, l'association ne se fonde que sur l'observation d'un cas isolé. Il implique donc d'approfondir la recherche dans cette direction afin de réellement étudier l'implication de GPIHBP1 dans l'expression d'hyperTG modérée.

Afin de vérifier quel était l'impact du polymorphisme G56R sur les fonctions de la protéine GPIHBP1, Gin et ses collaborateurs ont fait quelques tests *in vitro* avec un modèle cellulaire exprimant la protéine mutée. Selon eux, la substitution G56R n'influencerait pas l'habileté de la protéine GPIHBP1 à atteindre la surface cellulaire, ni sa capacité de liaison à la LPL ou aux CM [175]. Ainsi, il n'est pas certain que ces cas d'hyperchylomicronémie familiale recensés soient incontestablement provoqués par le statut homozygote pour la mutation G56R. Il est toutefois possible que cette mutation, située au niveau du lieu de 15 acides aminés

(51<sup>e</sup> au 64<sup>e</sup> acide aminé) entre le domaine acide et le motif Ly6, puisse circonvenir à la bonne maturation ou bien à une tout autre propriété de la protéine GPIHBP1. Il serait ainsi intéressant de vérifier si cette mutation influence le rôle stabilisateur de la LPL par GPIHBP1, et du fait même, l'inhibition d'ANGPTL4 sur la LPL.

Parallèlement au polymorphisme G56R, quatre autres mutations ont été identifiées dans la section codante du gène *GPIHBP1* et associées avec une perturbation de l'activité de GPIHBP1 [166]. Selon les différents tests *in vitro*, les mutations C65S, C65Y, C68G et Q115P, situées au niveau du domaine Ly6, inhibent l'interaction entre GPIHBP1 et la LPL, et par conséquent sont associées à l'expression d'une forme sévère d'hyperTG (figure 9) [13, 14, 166]. Les mutations impliquant les résidus cystéines empêcheraient la formation de ponts disulfures impliqués dans le repliement de la protéine GPIHBP1 mature, perturbant la conformation normale de la protéine et provoquant une altération de ses propriétés intrinsèques. L'identification récente de ces polymorphismes soutient donc l'idée que le gène *GPIHBP1* serait un modulateur significatif de l'expression de l'hyperTG chez l'humain.

Jusqu'à présent, les cinq polymorphismes décrits précédemment sont les premiers observés dans la séquence codante du gène *GPIHBP1* à être associés à l'expression d'une forme d'hyperTG chez l'humain. À la lumière des récentes observations, il semble fort probable qu'une déficience totale ou partielle en GPIHBP1 soit une cause d'hyperchylomicronémie familiale, ou d'une autre forme plus complexe d'hyperTG, tout comme l'est une déficience partielle en LPL [176]. Il faut aussi garder en tête que la déficience partielle en LPL n'est pas nécessairement associée avec une hyperTG à jeun chez l'humain. Somme toute, bien qu'une déficience en GPIHBP1 ne semble pas être l'étiologie la plus commune d'hyperTG, elle n'est pas pour autant négligeable. Il serait possible que des variants plus fréquents dans certaines populations soient associés avec un risque modéré d'hyperTG et puissent être des modulateurs importants de la triglycéridémie.



**Figure 9 :** Séquence primaire de la protéine GPIHBP1 et identification des cinq polymorphismes associés à l'expression d'hypertriglycéridémie extrême chez l'humain (C56R, C65Y, C65S, C68G, Q115P).

Le polymorphisme G56R, situé au niveau du lieu entre le domaine acide et celui Ly6 ne semble pas influencer sur la conformation de la protéine. Le polymorphisme Q115P adjacent au septième résidu cystéine, et les polymorphismes C65Y, C65S et C68G situés respectivement au premier et deuxième résidu cystéine semblent perturber le bon repliement de la protéine.

Modifié de : Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, *et al.* The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: New players, new insight. *Atherosclerosis*; 211: 1-8. [176]

Ainsi, il sera intéressant dans le futur de mieux caractériser l'impact de la protéine GPIHBP1 dans l'expression clinique de l'hyperTG [80]. Plus spécifiquement, l'identification de nouveaux polymorphismes dans le locus du gène *GPIHBP1* associés avec l'expression d'hyperTG permettrait de mieux cibler l'implication de cette protéine dans l'étiologie des différents sous-types d'hyperTG et d'identifier avec plus de précision les gens à risque.

## Chapitre V : Article

### *5.1 Avant-propos*

L'hyperTG est une dyslipidémie fréquente, considérée comme un trait complexe, et pouvant avoir des répercussions importantes sur la santé cardiovasculaire. Après la lecture des sections précédentes, on peut comprendre que l'identification de marqueurs spécifiques de l'expression clinique de l'hyperTG est souhaitable afin de mieux identifier les gens à risque et ainsi favoriser des approches préventives plutôt que curatives. Cette présente étude visant l'identification de polymorphismes fréquents dans le promoteur du gène *GPIIIBP1* associé avec l'expression d'hyperTG dans une population canadienne-française est directement liée à ce besoin.

Ma contribution à cette étude se déploie sur toutes les différentes strates de la mise sur pied de la recherche : du design de l'étude jusqu'à l'écriture et la soumission de cet article. En effet, j'ai personnellement contribué à l'élaboration du design de l'étude, j'ai effectué les différentes étapes de laboratoire (extraction des acides nucléiques, séquençage, génotypage, etc.), l'analyse et l'interprétation des données, ainsi que l'écriture de ce manuscrit. La contribution des autres auteurs se décrit comme suit : Dr Daniel Gaudet a conçu le design de l'étude et révisé ce manuscrit, Dre Diane Brisson a conçu le design de l'étude, participé à l'analyse et à l'interprétation des données, en plus de réviser ce manuscrit. L'accord écrit de tous les co-auteurs pour que cet article soit inclus dans le présent mémoire a été obtenu.

Cet article a récemment été soumis pour publication dans la revue *BMC Medical Genetics*. Le manuscrit présenté ici a subi quelques modifications mineures par rapport à la version soumise afin de respecter les normes de rédaction du mémoire émises par la FESP et d'assurer une certaine uniformité dans la présentation.

**A common polymorphism in the *GPIIb/IIIa* gene promoter is associated with hypertriglyceridemia in a French-Canadian population**

Guay SP, Gaudet D, Brisson D

*Department of Medicine, Université de Montréal, ECOGENE-21 and Lipid Clinic, Chicoutimi Hospital, Saguenay, QC, Canada*

**Correspondence to:** D. Brisson Ph.D., CCRP  
ECOGENE-21, Université de Montréal  
Chicoutimi Hospital  
225 St-Vallier Street  
Chicoutimi (Québec)  
Canada G7H 7P2

Telephone: (418) 541-1077  
Fax: (418) 541-1116

**Word count:** Abstract = 282 words; Main text = 2 543 words

**Number of Tables/Figures:** 4/4



## 5.2 Résumé

### Mise en contexte

Différents sous-types d'hypertriglycéridémie (hyperTG) ont été décrits dans la littérature. Ces derniers diffèrent en fonction de leur prévalence, de leur étiologie et de leur expression clinique. Les habitudes de vie et les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'épidémie actuelle d'hyperTG. Malgré que plusieurs variants géniques aient été associés avec l'hyperTG, une base moléculaire n'a été reportée que dans 10% des cas seulement. En raison de son rôle clef dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (TG) et de son association avec l'hyperchylomicronémie, le gène *glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1* (*GPIHBP1*) est un candidat pour l'hyperTG. L'objectif de cette étude est d'analyser si des polymorphismes fréquents dans le gène *GPIHBP1* sont associés avec l'hyperTG.

### Méthodes

Le polymorphisme *GPIHBP1* g.-469G>A (rs72691625) a été identifié par séquençage dans un sous-échantillon de 44 patients. Il a par la suite été génotypé (*5' nuclease TaqMan assay*) dans un échantillon de 541 canadiens-français à risque de maladies cardiovasculaires. Les patients atteints d'hyperchylomicronémie familiale ont été exclus. Des modèles multivariés contrôlant pour l'âge, le genre, les variables anthropométriques, ainsi que d'autres facteurs confondants de l'hyperTG ont été construits afin de calculer le risque relatif approché (OR) d'exprimer une hyperTG, associée au génotype *GPIHBP1*.

### Résultats

Les hétérozygotes (OR=1,67; p=0,025) et les homozygotes (OR=5,70; p=0,004) ont un risque accru d'exprimer une hyperTG (niveau plasmatique à jeun  $\geq 2$  mmol/L), comparativement aux non-porteurs. Globalement, le polymorphisme *GPIHBP1* g.-469G>A est présent chez 38,8% des patients hyperTG et 30,0% des patients normoTG participant à l'étude. La présence simultanée du polymorphisme g.-469G>A et d'un variant fréquent dans le gène codant pour la lipoprotéine lipase a un effet additif supplémentaire sur le risque d'hyperTG (OR = 7,30; p<0,001), suggérant l'importance des interactions gène-gène dans l'expression de l'hyperTG.

### Conclusions

Le polymorphisme g.-469G>A dans le promoteur du gène *GPIHBP1* est associé avec une augmentation significative du risque d'exprimer une hyperTG (TG  $\geq 2$  mmol/L) et pourrait contribuer au profil cardiométabolique délétère des patients à risque de maladies cardiovasculaires.

### Mots clefs

Hypertriglycéridémie, polymorphisme, *GPIHBP1*, lipoprotéine lipase, interaction gène-gène

### 5.3 Abstract

#### **Background**

Several subtypes of hypertriglyceridemia (hyperTG) have been described. They differ by their prevalence, etiology and clinical expression. Life habits and environmental factors play an essential role in the hyperTG epidemic. Although several gene factors have been also associated with hyperTG, its biological (genetic) component has been reported in less than 10% of cases only. Given its key role in the lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and its association with chylomicronemia, glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (*GPIHBP1*) is a candidate for hyperTG. The aim of this study was to determine if common *GPIHBP1* gene variants are associated with hyperTG.

#### **Methods**

The presence of the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism (rs72691625) was identified by sequencing in a subsample of 44 patients. It was screened by 5' nuclease TaqMan assay in a sample of 541 French Canadians at risk of cardiovascular disease. Patients with the familial hyperchylomicronemia syndrome were excluded. Multivariate models controlling for age, gender, anthropometrics and other hyperTG confounding factors were built to calculate the odds ratio (OR) of exhibiting hyperTG according to the *GPIHBP1* genotype.

#### **Results**

*GPIHBP1* g.-469G>A heterozygotes (OR: 1.67; p=0,025) and homozygous (OR: 5.70; p=0.004) were at increased risk of hyperTG (fasting plasma values  $\geq 2.0$  mmol/L) compared to non-carriers. Overall, the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism was carried by 38.8% of hyperTG individuals and 30.0% of normoTG participants in this study. The simultaneous presence of the g.-469G>A polymorphism and frequent loss-of-function LPL gene variant has an incremental additive effect on the risk of hyperTG (OR: 7.30; p<0.001), suggesting the importance of gene-gene interactions in the expression of hyperTG.

#### **Conclusions**

The g.-469G>A polymorphism in the *GPIHBP1* gene promoter is associated with an increased risk of hyperTG (TG  $\geq 2$ mmol/L) and may contribute to the deleterious cardiometabolic profile of patients at risk of cardiovascular disease.

#### **Key words**

hypertriglyceridemia, polymorphism, *GPIHBP1*, lipoprotein lipase, gene-to-gene interaction

#### ***5.4 Introduction/Background***

Hypertriglyceridemia (hyperTG) is a common clinical trait that maybe considered to be an independent risk factor for coronary artery disease (CAD) [1]. HyperTG refers to a fasting plasma triglyceride (TG) measurement higher than 1.7 - 2mmol/L. Several subtypes of hyperTG have been described; they differ by their prevalence, etiology and clinical expression [19]. In Canada and the United States, the prevalence of hyperTG varies from 20 to 35% depending on the threshold value used, ethnicity and gender [3-5].

HyperTG could be either due to an increased production of TG-rich lipoprotein particles, chylomicrons (CM) and very low-density lipoproteins (VLDL), or a delay in their hydrolysis process. The causes can be primary (genetic) or secondary (life habits, other diseases, etc.) or a combination of both [6]. Mutations within the lipoprotein lipase (*LPL*) gene are responsible for the most frequent form of primary hyperTG [7]. *LPL* has a crucial role in lipid metabolism and transport by catalyzing the rate-limiting step in the hydrolysis of TG [7, 8]. Complete deficiency in *LPL* is associated with defects in the clearance of CM, leading to a severe hyperTG ( $TG \geq 10$  mmol/L) even in the fasting state, while partial deficiency leads to a moderate hyperTG ( $2 \text{ mmol/L} \leq TG < 10 \text{ mmol/L}$ ) [9, 10]. Several other gene factors have been associated with hyperTG [11-16]. However, nearly 90% of cases of primary hyperTG remain incompletely characterized at the molecular genetic level [14]. This suggests that other genes and variants may significantly influence triglyceridemia.

Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) is a protein located within the apical and basolateral surface of capillaries of heart, skeletal muscle and adipose tissue. Given its key role in the lipolysis of TG-rich lipoproteins, *GPIHBP1* gene appears as an excellent candidate for search of new hyperTG molecular bases [17]. It has been suggested that GPIHBP1: 1) functions as a platform for *LPL* and its substrates; 2) increases the efficiency of substrate hydrolysis; 3) is required for *LPL* transcytosis from the basolateral to apical capillary endothelial surface; 4) stabilizes *LPL* in certain metabolic contexts; and 5) plays a role in cellular cholesterol transport [17-21]. Some rare polymorphisms (minor allele frequency <0.01%) have been recently identified in

the *GPIHBP1* gene (8q24.3). These polymorphisms (G56R, C65Y, C65S, C68G and Q115P) have been associated with severe hyperTG and familial hyperchylomicronemia syndrome (OMIM: 238600) [22-25]. However, no common polymorphism (allelic frequency > 5%) in this gene has yet been associated with hyperTG. The aim of this study was thus to determine if frequent *GPIHBP1* gene variants are associated with the expression of hyperTG.

## ***5.5 Materials and methods***

### *Sample and clinical data*

This study comprised a sample of 541 untreated French-Canadian subjects (287 men and 254 women [55.1% postmenopausal women]) from the Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ) region (Quebec, Canada). All subjects were followed at the Chicoutimi Hospital Lipid Clinic and agreed to participate in studies on genetic determinants of CAD and type 2 diabetes (T2D). The criteria used to define hyperTG subtypes included biochemical and lipoprotein characterization and were based on, the etiology of hyperTG as well as clinical and biological criteria (Table IV) [2]. Subjects with familial hyperchylomicronemia (OMIM: 238600) and hyperlipoproteinemia (OMIM: 144650), those with familial hypercholesterolemia (OMIM: 143890), as well as those taking drugs known to affect blood lipid levels or having chronic alcohol consumption were excluded. T2D was defined according to the World Health Organization criteria as a 2-hour glucose concentration > 11.1 mmol/l following a 75g oral glucose load [26]. The presence of CAD was determined based on clinical history of retrosternal pain, electrocardiogram and clinically documented myocardial infarction or angiographic evidence of coronary lesions, as described previously [27, 28]. Waist circumference was determined according to procedures of the Airlie Conference [29]. Subjects gave their informed consent to participate in this study and were assigned a code systematically denormalizing all clinical data [30]. This project received the approval of the Chicoutimi Hospital Ethics Committee.

---

**Severe hypertriglyceridemia (TG  $\geq$  10 mmol/L)**


---

Familial hyperchylomicronemia syndrome <sup>a</sup> :	-Lactescent plasma with large, creamy supernatant layer -Presence of chylomicrons -LPL deficiency (LPL activity < 5%)
Hyperlipoproteinemia <sup>b</sup> :	-Lactescent plasma usually with a white collar (according to chylomicronemia) -Presence of chylomicrons -Presence of pre- $\beta$ -VLDL on lipoprotein electrophoresis -Total apo B $\geq$ 1.2 g/L or measured LDL-C > 3.5 mmol/L

---

**Moderate hypertriglyceridemia (2  $\leq$  TG < 10 mmol/L)**


---

Familial combined hyperlipoproteinemia <sup>c</sup> or Carbohydrate-inducible hyperlipidemia <sup>d</sup> and Familial hypertriglyceridemia <sup>e</sup> :	-Increased LDL-C (familial combined hyperlipoproteinemia $\geq$ 3.4 mmol/L) or normal LDL-C (carbohydrate-inducible hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia < 3.4 mmol/L) -Presence of pre- $\beta$ -VLDL on lipoprotein electrophoresis -Not meeting criteria of other hypertriglyceridemia subtypes
Dysbetalipoproteinemia <sup>f</sup> :	At least 3 among the following: -VLDL-C / TG ratio > 0.5 -Apo E2/2 homozygous -Presence of $\beta$ -VLDL on lipoprotein electrophoresis -Presence of palmar or tuberous xanthomas.

---

**Tableau IV :** Clinical criteria used for hypertriglyceridemia subtype diagnosis.

TG, triglyceride; LPL, lipoprotein lipase; VLDL, very low-density lipoprotein; apo, apolipoprotein; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol. <sup>a</sup>OMIM: 238600; <sup>b</sup>OMIM: 144650; <sup>c</sup>OMIM: 144250; <sup>d</sup>OMIM: 144600; <sup>e</sup>OMIM: 145750; <sup>f</sup>OMIM: 107741

### *Biochemical analyses*

Blood samples were obtained after a 12 hour overnight fast from the antecubital vein into vacutainer tubes containing EDTA. Cholesterol, TG and glucose plasma levels were enzymatically measured on a Multiparity Analyser CX7 (Beckman). VLDL particles ( $d < 1.006$  g/ml) were isolated after ultracentrifugation, and the high-density lipoprotein (HDL) subfraction was obtained after precipitation of low-density lipoprotein (LDL) ( $d > 1.006$  g/ml) in the infranantant with dextran sulphate and magnesium chloride ( $MgCl_2$ ). Plasma glycerol concentrations were measured with an analyzer Technicon RA-500 (Bayer Corporation), and enzymatic reagents were obtained from Randox (Randox Laboratories). Non-esterified fatty acids (NEFA) levels were measured by enzymatic assay. Apolipoprotein B (apo B) levels were determined using nephelometry.

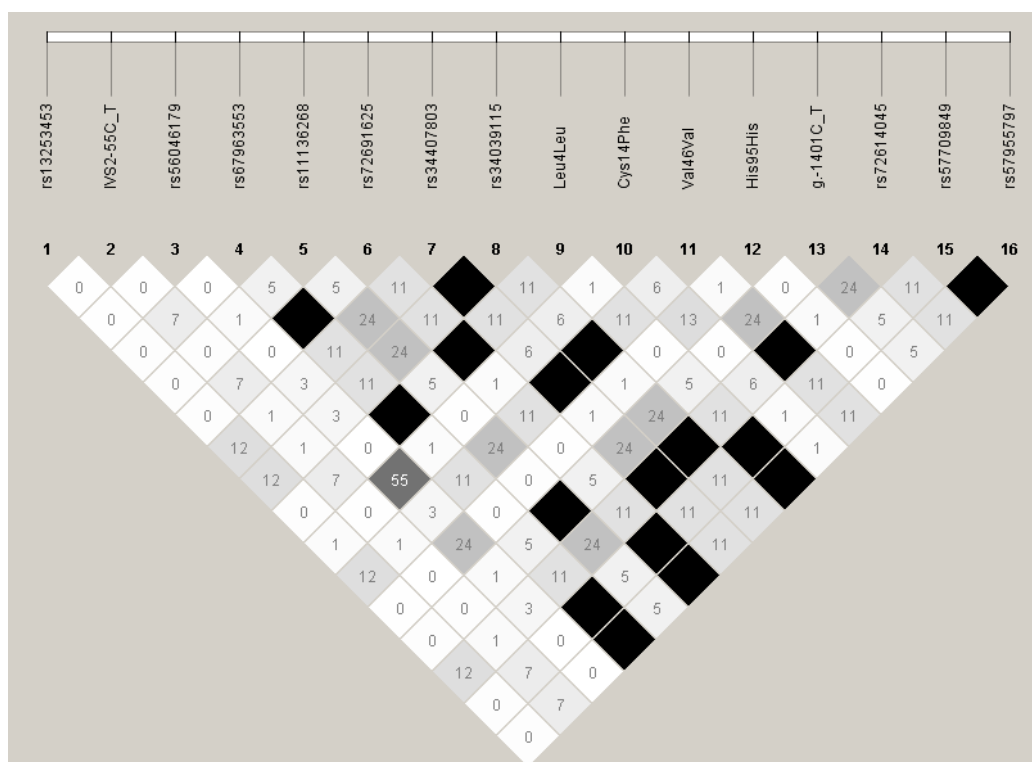
### *Sequencing and genotyping*

Genomic DNA was prepared from blood leukocytes of 44 patients randomly selected for sequencing analysis on the basis of having normal ( $n=12$ ;  $TG < 2$ mmol/L) or high triglyceridemia ( $n=32$ ;  $TG \geq 2$ mmol/L). The four exons of *GPIHBP1*, along with  $\approx 75$  pb of introns on either sides, and approximately 2000 pb of the promoter region were amplified with primers described in Table V. The samples were run on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, CA). Data were analyzed with CodonCode Aligner (CodonCode Corporation Dedham, MA). Sixteen different polymorphisms were identified in the *GPIHBP1* gene, but only thirteen seemed to be common (minor allele frequency  $> 5\%$ ) (Figure 10). Of these thirteen polymorphisms, three (rs72691625, rs34039115 and *GPIHBP1* g.-1401C>T) were chosen for exploratory analyses ( $n=121$  patients) because they were in complete linkage disequilibrium ( $r^2 = 100$ ) with other polymorphisms. According to the sequencing analysis, these polymorphisms represented 84% of the genetic variability of this locus. Only the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism (rs72691625) was chosen for further analysis for the reasons that it was in complete linkage disequilibrium with four other polymorphisms (rs67963553, rs61747644 (Leu4Leu), rs57709849 and rs57955797) and tended to be associate with elevation of TG in the exploratory analyses. Accordingly, the *GPIHBP1* g.-469G>A variant genotypes was determined by 5' nuclease TaqMan assay in the whole sample of 541 French

Canadians using the TaqMan<sup>®</sup> Genotyping MasterMix (call rate = 99,0%) and the allele discrimination mode of the 7500 software (v.2.0.1) for 7500 Fast Real-Time PCR systems (ABI, Foster City, CA). The presence of five loss-of-function *LPL* gene variants (P207L, G188E, D9N, N291S and D250N) were identified by a mismatch polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method, as described previously [31-34].

Region	Primer sequence	Product size (pb)
Promoter	F: 5'-GCATCAGGTATGAAGAGTTT-3' R: 5'-TTGCTGGGAAAGCCATCAGC-3'	747
Promoter	F: 5'-CAACCTCTGTTACAGGTGGCC-3' R: 5'-TGTCTGGGCTCCATAGTCACA-3'	695
Promoter	F: 5'-CGCAGCCTTAGCTTGAGGGC-3' R: 5'-GCTGCGGTAAGTGGGATGAAGG-3'	475
Exon 1	F: 5'-GGGACCAGTGTGAGGCCCAT-3' R: 5'-GCCAGCTTCCATCCATGCTGC-3'	345
Exon 2	F: 5'-TGCTTGCCCAGAGCAGGTGT-3' R: 5'-TGTTCCCTACTCTGGAAGGC-3'	384
Exon 3	F: 5'-CTAAACACACAGGCTCACGC-3' R: 5'-GTCTCTGAGGTGGCTCTGCAG-3'	398
Exon 4	F: 5'-AGAGCCCTGCAGAGCCACCT-3' R: 5'-TGGATCGCCCAAGACACTCC-3'	452

**Table V** : Amplification and sequencing primers used for *GPIHBPI*.  
F, forward primer; R, reverse primer.



**Figure 10** : Linkage disequilibrium relationships between polymorphisms in *GPIIIBP1* gene locus. Linkage disequilibrium (LD) relationships between sixteen common single nucleotide polymorphisms (SNPs; with minor allele frequency > 5%) identifier by sequencing of *GPIIIBP1* gene locus in 44 patients. The linkage disequilibrium (LD) test was generated by Haploview 3.32 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). The  $r^2$  parameter that quantifies intermarker LD is given (where  $r^2=0$  indicate no LD,  $r^2 = 100$  indicates complete LD). Black shows complete LD, grey shows moderate LD and white shows no or low LD.

### *Statistical analyses*

Categorical variables were compared using the Pearson  $\chi^2$ -statistic, whereas group differences for continuous variables were compared with an analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferonni post hoc test. Multivariate logistic regression models controlling for age, gender, anthropometrics and other hyperTG confounding factors were built in order to calculate the relative odds of exhibiting plasma TG concentrations above the upper standard limit of 2.0 mmol/L according to *GPIIIBP1* and *LPL* genotypes. The likelihood ratio statistic was used to compare regression models. Odds ratio (OR) are reported. The effects of discrete variables were evaluated dichotomously, according to their absence or presence in the subject. All statistical analyses were performed with the SPSS package (release 11.5.0, SPSS, Chicago, IL, USA).



## 5.6 Results

The *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism (rs72691625) was identified by sequencing the *GPIHBP1* region in a subsample of 44 patients randomly selected on the basis of having a normal or high triglyceridemia. The minor allele frequency of the *GPIHBP1* g.-469A polymorphism (19.2%) was calculated in a sample of 541 patients, and its distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). As shown in Table VI, the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism was associated with a significant ( $p<0.05$ ) increase in circulating total cholesterol, TG and apo B concentrations as well as with decreased plasma HDL-cholesterol level, after consideration for gender, age, waist circumference and the presence of T2D. The differences in lipid profile among *GPIHBP1* g.-469A carriers were mainly observed in TG and cholesterol VLDL particle content (Table VII).

Figure 11 shows that the estimated relative risk to exhibit hyperTG ( $\geq 2.0$  mmol/L) increases with the number of *GPIHBP1* g.-469A alleles, even after controlling for age, gender, waist circumference, the presence of a common hyperTG loss-of-function *LPL* gene variants, and of T2D. Subjects heterozygous and homozygous for this polymorphism respectively had a 1.67-fold ( $p=0.025$ ) and a 5.70-fold ( $p=0.004$ ) increased risk to exhibit plasma TG levels  $\geq 2.0$  mmol/L as compared to non-carriers. The same trend was observed after stratification for gender (data not shown). We also observed that the simultaneous presence of the g.-469G>A polymorphism and an hyperTG *LPL* gene variant had an incremental effect on the risk to show elevated TG levels (OR=7.30;  $p<0.001$ ) (Figure 12). However, the exclusive presence of the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism still remained associated with a significant risk of hyperTG (OR=1.79;  $p=0.014$ ). No synergetic effect on triglyceridemia was observed between *GPIHBP1* and *LPL* gene variants (not shown). Figure 13 shows that the simultaneous presence of hypertriglyceridemic polymorphisms *GPIHBP1* g.-469G>A and those in *LPL* gene seems to be associated with dysbetalipoproteinemia, (type III hyperTG; apo E resistance phenotype [OMIM:107741]), carbohydrate-inducible hyperlipidemia or familial hypertriglyceridemia (type IV hyperTG, respectively [OMIM:144600] and [OMIM:145750]), but not with familial combined hyperlipoproteinemia (type IIb hyperTG [OMIM: 144250]) ( $p<0.001$ ).

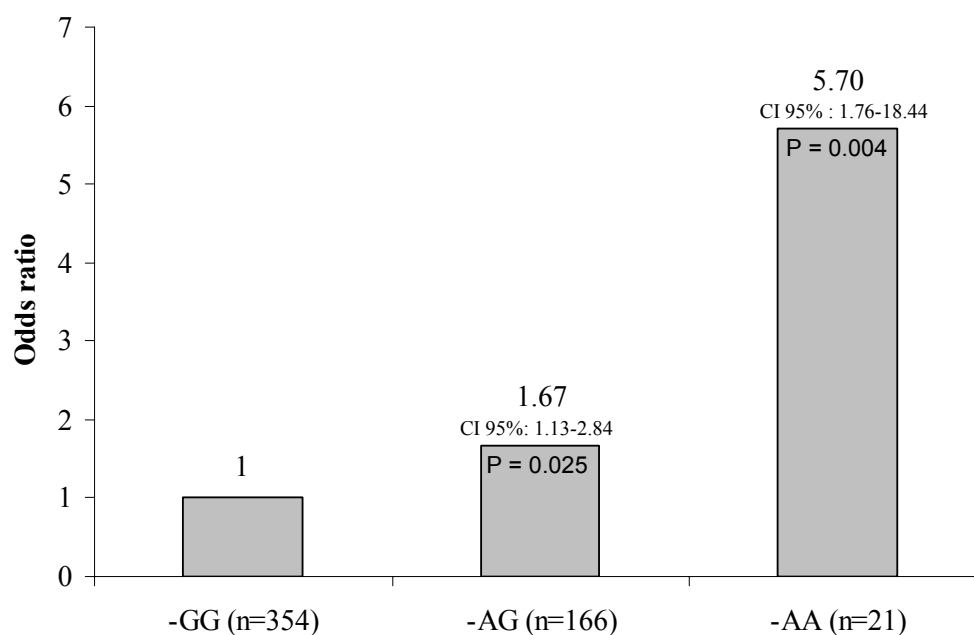
Characteristics	-GG (n=354)	-GA (n=166)	-AA (n=21)	P-value	Adjusted P-value <sup>c</sup>
Age (years) <sup>a</sup>	48.4±0.6	48.8±0.9	45.7±2.9	NS	
Men/Women	192/162	87/79	8/13	NS	
Type 2 diabetes (%)	20.1	21.1	28.6	NS	
CAD (%)	37.0	39.2	42.9	NS	
Presence of a loss-of-function <i>LPL</i> gene variant (%)	62 (17.5)	28 (16.9)	3 (14.3)	NS	
Waist circumference (cm) <sup>a</sup>	92.1±0.8	90.8±1.0	90.2±2.9	NS	NS
Total cholesterol (mmol/L) <sup>a,b</sup>	5.36±0.10	5.68±0.18	5.81±0.46	0.071	0.028
LDL-cholesterol (mmol/L) <sup>a,*</sup>	2.80±0.04	2.79±0.06	2.88±0.19	NS	NS
HDL-cholesterol (mmol/L) <sup>a,b</sup>	1.05±0.02	0.99±0.03	0.93±0.11	NS	0.016
Total triglycerides (mmol/L) <sup>a,b</sup>	2.15±0.18	2.43±0.25	3.01±0.86	0.149	0.029
Total apo B (g/L) <sup>a,**</sup>	0.98±0.02	1.05±0.02	1.03±0.08	0.056	0.017
Glycemia (mmol/L) <sup>a</sup>	5.71±0.09	5.56±0.10	5.75±0.50	NS	NS
NEFA (mmol/L) <sup>a,b</sup>	0.51±0.01	0.50±0.03	0.58±0.06	NS	NS
Glycerol (mmol/L) <sup>a,b</sup>	0.06±0.01	0.07±0.03	0.08±0.01	NS	NS

**Table VI** : Subjects' characteristics according to the *GPIIIBP1* g.-469G>A genotype.

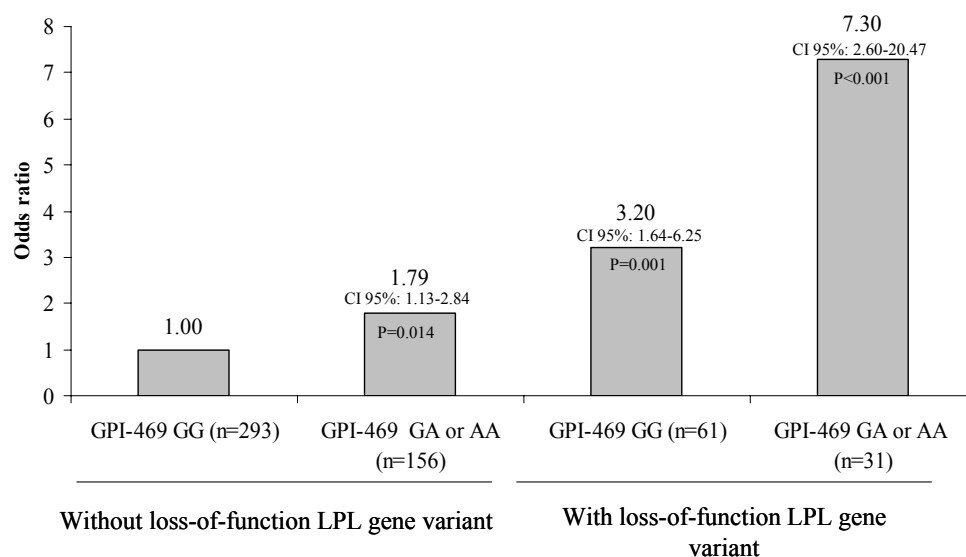
CAD, coronary artery disease; LPL, lipoprotein lipase; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; apo B, apolipoprotein B; NEFA, non-esterified fatty acids. <sup>a</sup>Mean±s.e. <sup>b</sup>Geometric mean and p-value after log<sub>10</sub>-transformation. <sup>c</sup>Adjusted for the following covariates: gender, age, waist circumference and presence of type 2 diabetes. \* n=504. \*\* n=512. NS = p≥0.15

	<b>-GG (n=288)</b>	<b>-GA (n=132)</b>	<b>-AA (n=18)</b>	<b>P-value</b>	<b>Adjusted P-value<sup>c</sup></b>
VLDL-triglyceride (mmol/L) <sup>a,b</sup>	1.07±0.11	1.27±0.23	1.54±0.55	NS	0.029
VLDL-cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	1.13±0.08	1.51±0.15	1.49±0.33	0.052	0.043
LDL-triglyceride (mmol/L) <sup>a,b</sup>	0.26±0.01	0.29±0.03	0.31±0.06	NS	NS
LDL-cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	2.60±0.04	2.64±0.06	2.51±0.13	NS	NS
HDL-triglyceride (mmol/L) <sup>a,b</sup>	0.30±0.01	0.31±0.01	0.34±0.03	NS	NS
HDL-cholesterol (mmol/L) <sup>a</sup>	1.10±0.02	1.08±0.03	1.00±0.10	NS	NS

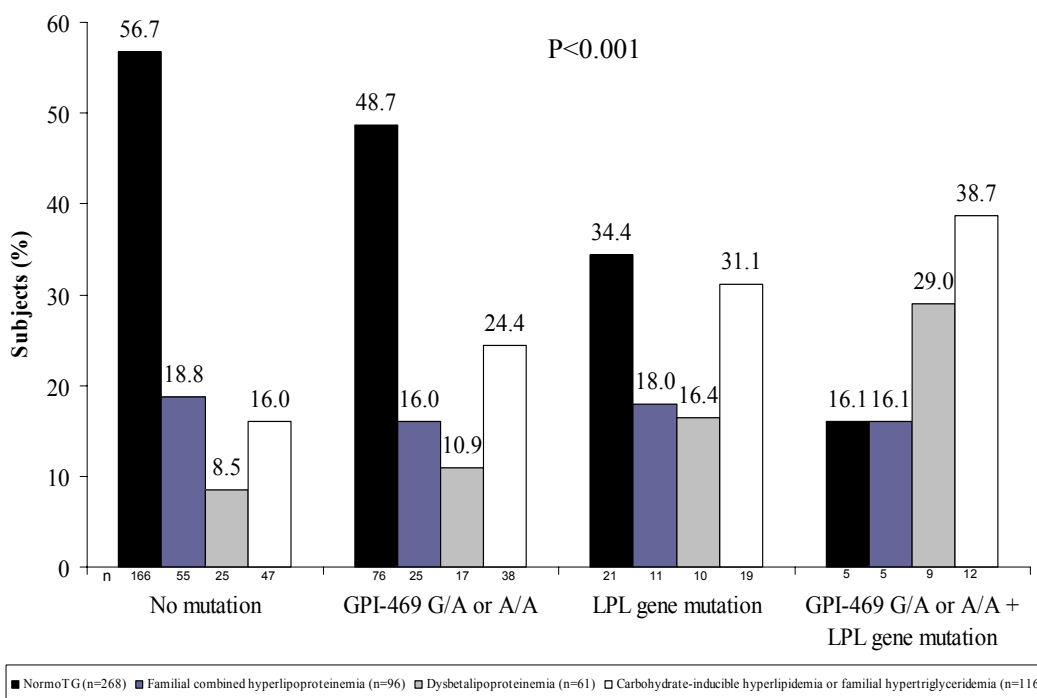
**Table VII :** Subject's lipid-lipoprotein profile according to the *GPIIIBP1* g. -469G>A genotype. VLDL, very low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. aMean±s.e. bGeometric mean and p-value after log10-transformation of triglycerides levels. cAdjusted for the following covariates : gender, age, waist circumference and presence of type 2 diabetes. NS=p≥0.1; Subjects with missing data (n=103) were excluded.



**Figure 11 :** Estimated relative risk (odds ratio) to exhibit elevated plasma TG levels (≥2.0 mmol/L) associated with the presence of the *GPIIIBP1* g.-469G>A genotype. Odds ratios were obtained from multivariate logistic regression analyses taking into account the effect of other TG metabolism confounders such as age, gender, waist circumference, the presence of a frequent hyperTG loss-of-function *LPL* gene variant (D9N, N291S, P207L, G188E, D250N) and of type 2 diabetes.



**Figure 12 :** Estimated relative risk (odds ratio) to exhibit elevated plasma TG levels ( $\geq 2.0$  mmol/L) associated with the presence of the *GPIIIBP1* g.-469G>A genotype and frequent hyperTG loss-of-function *LPL* genotypes (D9N, N291S, P207L, G188E, D250N). Odds ratio were obtained from multivariate logistic regression analyses taking into account the effect of other TG metabolism confounders such as age, gender, waist circumference and presence of type 2 diabetes.



**Figure 13 :** Distribution of hyperTG subtypes according to the presence of the *GPIIIBP1* g.-469G>A genotype and frequent hyperTG loss-of-function *LPL* genotypes (D9N, N291S, P207L, G188E, D250N).

## 5.7 Discussion

Several variants in genes associated with TG metabolism have been described. Some are frequent, and others are rare. While some of these variants dramatically increase plasma TG levels, leading to the expression of severe hyperTG, others have more modest effects, which could make them difficult to identify. This could partly explain why the causal mutation for nearly 90% of cases of primary hyperTG is still unknown although numerous genetic studies targeting TG metabolism genes were conducted [14].

In our study, we found a significant new association between a frequent polymorphism in the *GPIHBP1* gene promoter (g.-469G>A; rs72691625) and an increased risk to exhibit hyperTG (TG  $\geq$  2.0 mmol/L). This trend remained unchanged even after controlling for well-known TG modulators and was observed in both men and women. Some rare polymorphisms in the *GPIHBP1* gene have already been identified and were associated with rare and severe hyperTG [22-25]. However, to our knowledge, this is the first time that a common polymorphism (minor allele frequency > 5%) in the gene coding for GPIHBP1 is associated with the expression of a more frequent hyperTG.

The hydrolysis of lipoproteins-derived TG is an important step in energy metabolism, providing fuel to muscles and delivering lipids for storage in adipose tissue. This function is supported by the LPL, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of TG at the luminal surface of capillary endothelia of muscle or fat tissue [7-8]. LPL is synthesized and secreted by myocytes and adipocytes and need to pass through the endothelium to find its way into the lumen of capillaries [20]. GPIHBP1, a putative endothelial cell platform for lipolysis, plays a crucial role in the LPL-mediated processing of CM and VLDL hydrolysis [17, 21] It appears to be also required for LPL transcytosis from the basolateral to apical capillary endothelial surface [20]. Because of their key metabolic functions, complete deficiency in either LPL or GPIHBP1 leads to severe hyperTG associated with an accumulation of CM particles in plasma [8, 22]. A partial LPL deficiency, however, is associated with a moderate hyperTG due to a reduced VLDL catabolism [35, 36]. The *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism also seems to impair VLDL catabolism as suggested by the

increased levels of circulating VLDL cholesterol and TG content observed in g.-469A carriers. It is therefore tempting to hypothesize that this *GPIHBP1* gene promoter variant is associated with lower *GPIHBP1* transcriptional activity leading to a phenotype similar to partial LPL deficiency. According to its functions, *GPIHBP1* down regulation should be associated with reduced LPL concentration at the luminal surface of the endothelium, so that the concentration of VLDL particles is increased in circulation. The *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism is part of a haplotype that we identified by sequencing the *GPIHBP1* region. Consequently, associations observed could also depend on any of those four other polymorphisms (rs67963553, rs61747644, rs57709849 and rs57955797).

In a sequential metabolic cascade such as the TG-rich lipoprotein catabolic pathway, the combined effect of gene variations acting in the same direction should have a synergistic effect [15, 16]. However, the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism and frequent hyperTG loss-of-function *LPL* gene variants show an additive effect on the risk to exhibit hyperTG ( $TG \geq 2\text{mmol/L}$ ). These two proteins are involved in the same step of the metabolic process. This could explain why the combined effect of the *GPIHBP1* and *LPL* gene variants wasn't synergistic on the risk profile. Such observations are in accordance with the fact that LPL and GPIHBP1 are two proteins clearly linked in the catabolic cascade of TG-rich lipoproteins and suggesting the importance of gene-gene interactions in the expression of hyperTG [17-21].

Currently, all identified polymorphisms in the *GPIHBP1* gene have been associated with severe hyperTG and the familial hyperchylomicronemia syndrome (OMIM: 238600), characterized by the pathologic presence of CM after a 12-hour fasting period [22-25]. The *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism seems to be associated with dysbetalipoproteinemia (OMIM: 107741), carbohydrate-inducible hyperlipidemia (OMIM: 144600), familial hypertriglyceridemia (OMIM: 145750), but not with familial combined hyperlipoproteinemia (OMIM: 144250). These types of hyperTG are usually associated with moderate hyperTG, although severe hyperTG may sometimes be observed in these patients [37]. Dysbetalipoproteinemia is a highly atherogenic dyslipidemia characterized by the presence of fasting remnant VLDL particles in plasma, increased VLDL/TG ratio and expression of palmar, planar or tuberoeruptive xanthomas. It is mainly – but not exclusively – diagnosed

among individuals who are homozygous for the apolipoprotein e2 allele (apoE2/2). However, the majority of apoE2/2 subjects remain normolipidemic for decades, particularly in absence of an additional primary or secondary dyslipidemic factor [37]. The *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism could be one of these additional primary dyslipidemic factors inducing dysbetalipoproteinemia expression. The etiology and clinical expression of carbohydrate-inducible hyperlipidemia, familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipoproteinemia is more heterogeneous due to the association of various primary and secondary dyslipidemic factors [37]. Carbohydrate-inducible hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia are defined by an isolated elevation of VLDL particles, with or without a decrease of their catabolism, and are associated with hyperTG but normal cholesterol levels, whereas familial combined hyperlipoproteinemia is characterized by an increase of both TG-rich lipoproteins and LDL-cholesterol levels [2, 38]. According to our results, the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism doesn't seem to influence LDL-cholesterol levels, which can explain why it was not significantly associated with familial combined hyperlipoproteinemia.

The estimated relative risk (RR) of hyperTG associated with the *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism may appear modest when considered at the unit level, but a modest effect on the RR could translate into a significant population attributable risk for such a frequent gene polymorphism and contribute to a significant proportion of the variance of plasma TG concentrations in the general population [39]. All subjects in our sample were selected from a cohort originally created for the study of genetic determinants of T2D or CAD. Therefore, *GPIHBP1* g.-469G>A polymorphism allele frequency and association with dyslipoproteinemia should be validated first within other populations before postulating of its potential clinical impacts. However, the high hyperTG prevalence and fine phenotyping of hyperTG patients in our sample allowed to find an association suggesting that *GPIHBP1* is involved in TG-rich lipoproteins lipolysis. It could have been difficult to identify such association otherwise.

## **5.8 Conclusion**

The g.-469G>A polymorphism (rs72691625) is the first one in the *GPIHBP1* gene promoter to be associated with the expression of non-extreme hyperTG (TG  $\geq$  2 mmol/L), possibly due to perturbations of VLDL catabolism. It also may contribute to the deleterious cardiometabolic profile of patients at risk of cardiovascular disease. Our study provides strong evidence that *GPIHBP1* is a candidate gene to ascertain the molecular bases of frequent hyperTG observed in the general population.

### **List of abbreviations**

hyperTG, hypertriglyceridemia; CAD, coronary artery disease; TG, triglyceride; CM, chylomicron; VLDL, very low-density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase; GPIHBP1, glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1; SLSJ, Saguenay–Lac-Saint-Jean; T2D, type 2 diabetes; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NEFA, non-esterified fatty acids; apo B, apolipoprotein B; SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; RR, relative risk; LD, Linkage disequilibrium

## **5.9 Acknowledgment**

Authors are thankful to all participants and the staff of the ECOGENE-21 Clinical Research Center. During this research, Simon-Pierre Guay was the recipient of a master's award from the Canadian Institutes for Health and Research (CIHR), and from the “Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)”. Dr Daniel Gaudet holds the Canada Research Chair in preventive genetics and community genomics ([www.chairs.gc.ca](http://www.chairs.gc.ca)). This project was supported by ECOGENE-21, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR team in community genetics [grant #CTP-82941]).

## **5.10 Disclosure**

The authors have no conflict of interest to disclose.

### *Author's contributions*

Simon-Pierre Guay contributed to the study design, participated to the data collection, performed the data analysis/interpretation and wrote the manuscript. Daniel Gaudet conceived the study design and revised the manuscript. Diane Brisson conceived the study design, participated to the data analysis/interpretation and revised the manuscript.



### ***5.11 References***

1. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL: **Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor**. *Am J Cardiol* 1998, **81**(4A):7B-12B.
2. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS: **Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders**. *N Engl J Med* 1967, **276**(4):215-225 contd.
3. Lemieux I, Almeras N, Mauriege P, Blanchet C, Dewailly E, Bergeron J, Despres JP: **Prevalence of 'hypertriglyceridemic waist' in men who participated in the Quebec Health Survey: association with atherogenic and diabetogenic metabolic risk factors**. *Can J Cardiol* 2002, **18**(7):725-732.
4. Ford ES, Giles WH, Dietz WH: **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey**. *JAMA* 2002, **287**(3):356-359.
5. Liu J, Hanley AJ, Young TK, Harris SB, Zinman B: **Characteristics and prevalence of the metabolic syndrome among three ethnic groups in Canada**. *Int J Obes (Lond)* 2006, **30**(4):669-676.
6. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA: **Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment**. *CMAJ* 2007, **176**(8):1113-1120.
7. Brunzell JD, Deeb SS: **Familial lipoprotein lipase deficiency, apo CII deficiency and hepatic lipase deficiency**. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: McGraw-Hill; 2001:2789-2816.
8. Wang H, Eckel RH: **Lipoprotein lipase: from gene to obesity**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **297**(2):E271-288.
9. Gagne C, Brun LD, Julien P, Moorjani S, Lupien PJ: **Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population**. *CMAJ* 1989, **140**(4):405-411.

10. van Bockxmeer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke V, Taylor R: **Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids.** *Atherosclerosis* 2001, **157**(1):123-129.
11. Beil FU, Fojo SS, Brewer HB, Jr., Greten H, Beisiegel U: **Apolipoprotein C-II deficiency syndrome due to apo C-II Hamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism.** *Eur J Clin Invest* 1992, **22**(2):88-95.
12. Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, Kamari Y, Harats D, Rubin EM, Pennacchio LA, Cooper AD: **Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(12):2573-2579.
13. Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, Frost PH, Kane JP, Malloy MJ, Reue K *et al*: **Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia.** *Nat Genet* 2007, **39**(12):1483-1487.
14. Hegele RA: **Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism.** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(6):1161-1177.
15. Brisson D, St-Pierre J, Santure M, Hudson TJ, Despres JP, Vohl MC, Gaudet D: **Genetic epistasis in the VLDL catabolic pathway is associated with deleterious variations on triglyceridemia in obese subjects.** *Int J Obes (Lond)* 2007, **31**(8):1325-1333.
16. Garenc C, Couillard C, Laflamme N, Cadelis F, Gagne C, Couture P, Julien P, Bergeron J: **Effect of the APOC3 Sst I SNP on fasting triglyceride levels in men heterozygous for the LPL P207L deficiency.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**(10):1159-1165.
17. Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F, Bunting S, Walzem RL, Wong JS *et al*: **Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons.** *Cell Metab* 2007, **5**(4):279-291.

18. Sonnenburg WK, Yu D, Lee EC, Xiong W, Gololobov G, Key B, Gay J, Wilganowski N, Hu Y, Zhao S *et al*: **GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4**. *J Lipid Res* 2009, **50**(12):2421-2429.
19. Ioka RX, Kang MJ, Kamiyama S, Kim DH, Magoori K, Kamataki A, Ito Y, Takei YA, Sasaki M, Suzuki T *et al*: **Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1**. *J Biol Chem* 2003, **278**(9):7344-7349.
20. Davies BS, Beigneux AP, Barnes RH, 2nd, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, Nobumori C, Nyren R, Goldberg I, Olivecrona G *et al*: **GPIHBP1 Is Responsible for the Entry of Lipoprotein Lipase into Capillaries**. *Cell Metab*, **12**(1):42-52.
21. Weinstein MM, Yin L, Tu Y, Wang X, Wu X, Castellani LW, Walzem RL, Lusic AJ, Fong LG, Beigneux AP *et al*: **Chylomicronemia elicits atherosclerosis in mice—brief report**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **30**(1):20-23.
22. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, Walzem RL, Weinstein MM, Davies BS, Kuivenhoven JA *et al*: **Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**(6):956-962.
23. Wang J, Hegele RA: **Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPI-HBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650)**. *Lipids Health Dis* 2007, **6**:23.
24. Franssen R, Young SG, Peelman F, Hertecant J, Sierts JA, Schimmel AW, Bensadoun A, Kastelein JJ, Fong L, Dallinga-Thie GM *et al*: **Chylomicronemia with Low Postheparin Lipoprotein Lipase Levels in the Setting of GPIHBP1 Defects**. *Circ Cardiovasc Genet* 2010, **3**(2):169-78

25. Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, Makoveichuk E, Lindberg A, Hayden MR, Gin P, Davies BS, Weinstein MM, Fong LG *et al*: **Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia.** *J Lipid Res* 2010, **12**(1):42-52.
26. Alberti KG, Zimmet PZ: **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.** *Diabet Med* 1998, **15**(7):539-553.
27. Gaudet D, Vohl MC, Julien P, Tremblay G, Perron P, Gagne C, Bergeron J, Moorjani S, Despres JP: **Relative contribution of low-density lipoprotein receptor and lipoprotein lipase gene mutations to angiographically assessed coronary artery disease among French Canadians.** *Am J Cardiol* 1998, **82**(3):299-305.
28. Gaudet D, Vohl MC, Perron P, Tremblay G, Gagne C, Lesiege D, Bergeron J, Moorjani S, Despres JP: **Relationships of abdominal obesity and hyperinsulinemia to angiographically assessed coronary artery disease in men with known mutations in the LDL receptor gene.** *Circulation* 1998, **97**(9):871-877.
29. Standardization of anthropometric measurements. In: Lohman T, Roche A, Martorel R, eds. The Airlie (VA) Consensus Conference. Champaign, IL. *Human genetics* 1988; 39-80.
30. Gaudet D, Arsenault S, Belanger C, Hudson T, Perron P, Bernard M, Hamet P: **Procedure to protect confidentiality of familial data in community genetics and genomic research.** *Clin Genet* 1999, **55**(4):259-264.
31. 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**(7):541.

32. Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, Julien P, Deeb S, Kastelein JJ, Peritz L, Devlin R, Bruin T, Murthy MR *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**(3):728-734.
33. de Bruin TW, Mailly F, van Barlingen HH, Fisher R, Castro Cabezas M, Talmud P, Dallinga-Thie GM, Humphries SE: **Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia.** *Eur J Clin Invest* 1996, **26**(8):631-639.
34. Hixson JE, Vernier DT: **Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI.** *J Lipid Res* 1990, **31**(3):545-548.
35. Julien P, Gagne C, Murthy MR, Levesque G, Moorjani S, Cadelis F, Hayden MR, Lupien PJ: **Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-Canadian population.** *Hum Mutat* 1998, **Suppl 1**:S148-153.
36. Ruel IL, Gaudet D, Perron P, Bergeron J, Julien P, Lamarche B: **Characterization of LDL particle size among carriers of a defective or a null mutation in the lipoprotein lipase gene: the Quebec LIPD Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, **22**(7):1181-1186.
37. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA: **Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment.** *CMAJ* 2007, **176**(8):1113-1120.
38. Schreibman PH, Wilson DE, Arky RA: **Familial type IV hyperlipoproteinemia.** *N Engl J Med* 1969, **281**(18):981-985.
39. Hennekens CH, Burning JE: *Epidemiology in Medicine*. Boston: Little Brown and co.; 1987.

## ***Chapitre VI : Discussion générale et conclusion***

D'un point de vue clinique, la médecine cardiovasculaire poursuit deux objectifs principaux. Tout d'abord, elle vise à guérir, ou du moins, à atténuer les symptômes d'une MCV déjà diagnostiquée et, dans une meilleure perspective, à prévenir son expression clinique. La médecine préventive cardiovasculaire suscite beaucoup d'engouement dans la communauté scientifique. Cette division de la pratique clinique vise notamment à dépister des marqueurs génétiques dont les patients seraient porteurs pour retarder, et voir même empêcher, l'apparition d'une MCV chez ces patients à risques. L'adoption de saines habitudes de vie, autant chez des patients prédisposés ou non génétiquement au développement d'une MCV, occupe une place très importante dans l'algorithme de prévention. Cette vision préventive offre l'énorme avantage de réduire les coûts de santé en diminuant l'incidence ou la gravité de la maladie.

La génétique moderne permet, à l'heure actuelle, d'obtenir le code génétique complet d'un individu et d'évaluer ses prédispositions à certaines maladies, et ce, avec l'aide d'une simple petite goutte de sang. Certaines entreprises offrent d'ailleurs déjà des tests de prédisposition génétique à différentes MCV. Toutefois, ces tests ne font qu'une analyse partielle du profil de risque cardiovasculaire. Il faut comprendre que l'analyse complète du profil de risque individuel serait très complexe. Ce type d'analyse impliquerait notamment d'examiner des centaines de polymorphismes, voir même des milliers, tout en tenant compte des divers facteurs secondaires concomitants. On peut toutefois envisager que la consultation médicale de demain sera constituée d'un amalgame entre divers questionnaires et examens physiques, biochimiques et moléculaires permettant de prédire avec précision la susceptibilité à différentes MCV. Pour l'instant, toutefois, nous en sommes encore à identifier les principales causes moléculaires sous-jacentes à l'expression de différents facteurs de risque cardiovasculaire. Les différentes connaissances acquises permettront un jour d'intégrer vraisemblablement tous ces marqueurs génétiques associés dans un test génétique disponible en clinique pour déterminer avec précision le risque cardiovasculaire individuel primaire d'un patient.

Le présent mémoire s'inscrit dans cette vision d'identifier de nouveaux facteurs génétiques associés à l'expression de facteurs de risques cardiovasculaires. Plus précisément, nous avons comme objectif d'analyser l'impact de polymorphismes dans le gène codant pour la protéine GPIHBP1 sur l'expression de différents sous-types d'hyperTG. Tel qu'illustré dans les chapitres subséquents, l'hyperTG est une dyslipidémie fréquente et associée à l'expression de complications cardiovasculaires. Pour cette raison, l'hyperTG est considérée comme un facteur de risque de l'expression de MCV, plus particulièrement de MCA. En raison des différents rôles de la protéine GPIHBP1 dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique (plateforme pour la lipolyse, stabilisateur de la LPL, navette transendothéliale), il était justifié et pertinent d'utiliser le gène codant pour cette protéine comme candidat dans la recherche de nouvelles bases moléculaires pouvant être associées à l'expression de différentes formes d'hyperTG.

Afin d'atteindre notre objectif principal, nous avons utilisé un échantillon constitué de patients normo- et hypertriglycéridémiques de la région du SLSJ, tous suivis à la Clinique des maladies lipidiques du Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi. La population du SLSJ est une population dite à effet fondateur fournissant des avantages importants pour la recherche en épidémiologie génétique. Ce type de population représente un outil majeur autant pour l'identification de variants génétiques par des analyses d'association que pour des études cas-témoins et l'analyse des mécanismes physiopathologiques associant des variables génétiques à l'expression de la maladie. Dans une population qui provient d'un effet fondateur, la probabilité que les individus exprimant une condition clinique particulière, telle que l'hyperTG, soient porteurs d'allèles de susceptibilité génétiques hérités d'ancêtre commun est plus élevée. L'usage de ces grandes populations issues d'un effet fondateur a eu beaucoup de succès pour l'identification de gènes associés à l'expression de maladies mendéliennes [177, 178]. Leur emploi pour l'étude de maladies complexes, notamment l'hyperTG, est beaucoup plus récent, mais a déjà permis d'obtenir des résultats très prometteurs [179, 180]. L'utilisation de cette population a donc été un choix réfléchi et judicieux pour tester notre hypothèse de recherche.

L'hypothèse spécifique de la présente étude était que la présence de polymorphismes dans le locus du gène *GPIHBP1* pouvait avoir une influence sur l'expression de différents sous-types d'hyperTG. Un polymorphisme fréquent dans le promoteur du gène *GPIHBP1* (g.-469G>A, rs72691625) a ainsi été associé avec une augmentation significative du risque d'exprimer une hyperTG (TG  $\geq$  2mmol/L) dans un échantillon d'individus ayant des antécédents familiaux de dyslipidémie, de MCA ou de DT2, et donc considéré à risque de MCV. De plus, nous avons observé que ce risque serait exacerbé par la présence simultanée de polymorphismes dans le gène codant pour la LPL, qui ont déjà été reconnus pour prédisposer à l'hyperTG (D9N, G188E, P207L, D250N ou N291S). Cette observation suggère notamment l'importance des interactions gène-gène dans l'expression de l'hyperTG. Il a aussi été observé que le polymorphisme g.-469G>A perturberait le métabolisme des particules VLDL et prédisposerait particulièrement à l'hyper TG de type III (dysbétalipoprotéïnémie) et celle de type IV (hypertriglycémie familiale endogène). Toutefois, nous avons remarqué, suite au séquençage du gène *GPIHBP1*, que le polymorphisme g.-469G>A étaient en déséquilibre de liaison ( $r^2 = 100$ ) avec quatre autres polymorphismes situés au niveau du promoteur et de l'exon 1 (rs67963553, rs61747644 (Leu4Leu), rs57709849 et rs57955797). Ainsi, l'impact du polymorphisme g.-469G>A sur l'expression de l'hyperTG pourrait tout aussi bien être le résultat de l'un ou l'autre de ces polymorphismes. Il semble donc que *GPIHBP1* serait non seulement associé avec l'expression d'hyperTG sévère et rare, mais aussi avec celle d'hyperTG observée plus fréquemment en clinique.

À la lumière de ces observations, il est tentant de postuler qu'une déficience génétique partielle ou totale en *GPIHBP1* pourrait engendrer une perturbation de la lipolyse des lipoprotéines riches en TG (particulièrement des VLDL) par la LPL et ainsi contribuer à l'accumulation de TG dans le plasma. Toutefois, afin de consolider l'exactitude de cette hypothèse, il serait pertinent d'examiner l'impact du polymorphisme identifié sur l'expression et l'activité de la protéine *GPIHBP1*, notamment au niveau de biopsies de tissu adipeux ou d'endothélium vasculaire. Par exemple, il pourrait être intéressant de comparer l'expression de la protéine chez des patients porteurs ou non et d'analyser l'impact d'une telle perturbation de l'expression de *GPIHBP1* sur une potentielle perturbation de l'activité *in vivo* de la LPL ou de la présence de la LPL au niveau de l'endothélium capillaire.



Tout comme le gène codant pour la LPL, l'expression du gène *GPIHBP1* est régulée par de multiples facteurs, tels que l'état nutritionnel et les PPAR. La présence de sites de liaison pour les PPAR (PPRE) au niveau du promoteur du gène *GPIHBP1* murin a d'ailleurs permis d'appuyer l'implication de ce type de récepteur nucléaire dans la régulation de l'expression de *GPIHBP1* [17]. Toutefois, la présence de tels sites PPRE n'a pas encore été démontrée pour l'instant chez l'humain. Il serait donc pertinent : 1) d'investiguer la présence de tels sites chez le gène humain; 2) de vérifier si le polymorphisme g.-469G>A n'interférerait pas avec l'un de ces sites potentiels; 3) d'explorer si l'administration d'agonistes PPAR $\gamma$ , une classe d'hypoglycémisants reconnue, et même d'agonistes PPAR $\alpha$ , une classe d'agents hypolipidémisants, n'influencerait pas l'expression de la protéine *GPIHBP1* chez l'humain; et 4) d'examiner si le polymorphisme g.-469G>A n'affecterait pas cette expression et/ou l'efficacité du traitement hypotriglycéridémiant observée chez les patients recevant des agonistes des PPAR. Cette dernière possibilité de recherche est très intéressante, puisqu'il a déjà été observé que certains polymorphismes dans des gènes ayant des fonctions spécifiques dans le métabolisme lipidique-lipoprotéique (*APOE*, *PPARG*, *PPARA* et *FABP*) étaient associés avec une diminution ou une augmentation de la réponse pharmacologique à certains agents hypolipidémisants [147, 181, 182]. D'ailleurs, la pharmacogénomique, une discipline de la pharmacologie contemporaine cherchant à individualiser l'approche thérapeutique et à adapter les thérapies selon des critères génétiques, attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique.

Jusqu'à maintenant, aucune mutation fréquente dans le gène *GPIHBP1* n'avait encore été associée avec l'expression d'hyperTG chez l'humain. En effet, seulement cinq mutations rares avaient pour l'instant été associées avec l'expression d'hyperTG sévère, en lien avec une perturbation possible du rôle de plateforme de lipolyse de *GPIHBP1*. Toute porte à croire que *GPIHBP1* émerge comme un gène candidat intéressant pour la recherche de nouvelles bases moléculaires pouvant expliquer, non seulement des formes sévère et rare d'hyperTG, mais également certaines formes fréquentes d'hyperTG primaires modérées chez l'humain. Toutefois, il sera nécessaire de confirmer ces résultats dans d'autres populations afin d'évaluer leur validité externe. Aussi, il pourrait être intéressant de déterminer la prévalence du

polymorphisme dans un échantillon représentatif de la population québécoise, permettant ainsi de mieux caractériser son implication dans l'expression de l'hyperTG et de caractériser le risque d'expression de ce phénotype dans cette population.

Les modifications génétiques affectant la susceptibilité à l'hyperTG et à l'expression de MCV sont rarement associées à un désordre génétique impliquant un seul gène. Malgré que l'accumulation de variants géniques rares, ayant un impact important sur l'expression phénotypique, semble contribuer significativement à l'expression de certains traits complexes fréquents [113, 183, 184], la communauté scientifique parle majoritairement toutefois de la théorie « désordre commun, polymorphisme commun » [98, 185]. Cette vision suggère que la majorité de la variation attribuable aux populations dans la susceptibilité aux maladies les plus fréquentes serait causée par des modifications génétiques fréquentes, présentes dans de multiples gènes et ayant un impact faible à modéré sur l'expression du phénotype. Ainsi, le polymorphisme g.-469G>A identifié dans le locus du gène *GPIHBP1* pourrait être l'une des variations génétiques fréquentes, ayant un effet modeste sur le phénotype d'hyperTG, mais pouvant expliquer une proportion importante de la variance des concentrations plasmatiques de TG dans la population en général lorsque combiné avec d'autres variants fréquents, notamment ceux dans le gène codant pour la LPL.

L'hyperTG est un facteur de risque cardiovasculaire à part entière. Plusieurs études épidémiologiques ont établi que la triglycéridémie moyenne, liée particulièrement aux particules VLDL, était l'un des meilleurs critères permettant de discriminer les sujets présentant une MCV de ceux n'en présentant pas [37, 42, 44-47]. Par conséquent, en augmentant la susceptibilité à l'hyperTG, en lien à une perturbation du métabolisme des particules VLDL, le polymorphisme g.-469G>A identifié dans le gène *GPIHBP1* pourrait également influencer l'expression des MCV. La déficience totale en *GPIHBP1*, caractérisée par un état hyperchylomiconémique, a d'ailleurs récemment été associée avec l'expression d'athérosclérose spontanée chez un modèle murin [84]. Les études futures sur *GPIHBP1* devront mieux caractériser l'impact de ce polymorphisme dans le profil de risque cardiovasculaire.

Le nombre de publications rapportant des associations entre des gènes et l'expression de perturbations métaboliques et/ou de maladies est en continuelle augmentation depuis le début des années 2000. Avec plus de 34 000 articles publiés, le nombre annuel de publications dans ce domaine de l'épidémiologie génétique a plus que doublé depuis 2001 [186]. Cet engouement pour les études d'associations génétiques a incité divers groupes d'expert à s'interroger sur les différents biais pouvant venir influencer la validité interne et externe de ces études. Différents standards de qualité ont ainsi été établis pour les études d'association génétique [187]. Les plus récents, STREGA (Strengthening the Reporting of Genetic Association studies) ont été basé sur les déclarations de la STROBE (*Strengthening for Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) établi en 2007 [188].

Notre étude rapportant l'association de polymorphismes dans le gène *GPIHBP1* avec l'hyperTG respecte plusieurs de ces standards de qualité décrits par la STREGA : protocole détaillé, description de la technique d'échantillonnage, excellent phénotypage des patients, bonne explication des méthodes de séquençage et de génotypage (taux de succès du génotypage (call rate) supérieur à 99%) et respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Toutefois, notre étude comporte aussi certaines limitations notamment au niveau de la reproduction des résultats dans d'autres populations, ainsi qu'avec l'utilisation d'un échantillon recruté dans une clinique médicale. Par exemple, ce type d'échantillon n'assure pas nécessairement un échantillon représentatif de la population en général et peut, par le fait même, surestimer la fréquence allélique réelle de certains polymorphismes. Néanmoins, la sélection et l'identification des patients ont été faites selon des critères stricts et en utilisant différentes sources d'identification (bilan lipidique à jeun, ultracentrifugation, etc.). Cette méthode de phénotypage a notamment permis d'atténuer différents biais de sélection et d'information non différentiels. La connaissance et la divulgation des limitations inhérentes à notre étude augmentent la transparence, permettent d'apporter des conclusions plausibles et généralisables, tout en apportant de nouvelles hypothèses de recherche fiables.

Les différentes connaissances acquises au sujet de *GPIHBP1* aideront inévitablement au développement d'outils diagnostiques permettant de confirmer les dyslipidémies en identifiant le statut moléculaire associé au phénotype, favorisant

ainsi la prévention des conséquences cliniques associées, notamment l'expression de MCV. Elles permettront également de cibler plus efficacement les patients à risque d'exprimer certaines formes d'hyperTG et d'instaurer chez ces patients des approches préventives plutôt que curatives.

## Bibliographie

1. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, *et al.* The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003; 163: 427-36.
2. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, *et al.* Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33-50.
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-52.
4. Kraushaar LE, Kramer A. Are we losing the battle against cardiometabolic disease? The case for a paradigm shift in primary prevention. *BMC Public Health* 2009; 9: 64.
5. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119: e21-181.
6. Albrink MJ, Man EB. Serum triglycerides in coronary artery disease. *AMA Arch Intern Med* 1959; 103: 4-8.
7. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998; 81: 7B-12B.
8. Ferns G, Ketji V, Griffin B. Investigation and management of hypertriglyceridaemia. *J Clin Pathol* 2008; 61: 1174-83.
9. Lemieux I, Almeras N, Mauriege P, *et al.* Prevalence of 'hypertriglyceridemic waist' in men who participated in the Quebec Health Survey: association with atherogenic and diabetogenic metabolic risk factors. *Can J Cardiol* 2002; 18: 725-32.
10. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-9.
11. Liu J, Hanley AJ, Young TK, *et al.* Characteristics and prevalence of the metabolic syndrome among three ethnic groups in Canada. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 669-76.
12. Hegele RA. Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1161-77.
13. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, *et al.* Chylomicronemia with a mutant GPIIIBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 956-62.

14. Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, *et al.* Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *J Lipid Res* 2009; 51: 1535-45.
15. Wang J, Hegele RA. Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPI-HBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650). *Lipids Health Dis* 2007; 6: 23.
16. Beigneux AP, Davies BS, Gin P, *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 2007; 5: 279-91.
17. Davies BS, Waki H, Beigneux AP, *et al.* The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2496-504.
18. Sonnenburg WK, Yu D, Lee EC, *et al.* GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *J Lipid Res* 2009; 50: 2421-9.
19. Davies BS, Beigneux AP, Barnes RH, 2nd, *et al.* GPIHBP1 Is Responsible for the Entry of Lipoprotein Lipase into Capillaries. *Cell Metab*; 12: 42-52.
20. Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 267-87.
21. Gagné C., Gaudet D., *Les dyslipoprotéïnémies: l'approche clinique.* 3e édition, LIPIMED Communications. Canada. 2007. 305 pages
22. Mahley RR, Rall SC. 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 bases of inherited disease*, 8nd edition. New York : McGraw-Hill; 2001. pp. 2835-2862
23. Bensadoun A. Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 217-37.
24. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27.
25. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001; 108: 793-7.
26. Glickman RM, Glickman JN, Magun A, *et al.* Apolipoprotein synthesis in normal and abetalipoproteinemic intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1991; 101: 749-55.

27. Chen SH, Habib G, Yang CY, *et al.* Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 1987; 238: 363-6.
28. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Laplaud PM, *et al.* Structural properties of the microsomal triglyceride-transfer protein complex. *Biochemistry* 1991; 30: 4406-12.
29. Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E239-46.
30. Wang F, Feng XC, Li YM, *et al.* Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 395-401.
31. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 523-58.
32. Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998; 81: 13B-7B.
33. Betteridge DJ, Illingworth DR, and Shepherd J, eds. Lipoproteins in Health and Disease London, Arnold, 1999. 1302pp. ISBN 0-340-55269-7.
34. Groop L, Orho-Melander M. The dysmetabolic syndrome. *J Intern Med* 2001; 250: 105-20.
35. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 2003; 108: 1546-51.
36. Genest J, McPherson R, Frohlich J, *et al.* 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can J Cardiol* 2009; 25: 567-79.
37. Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol* 1992; 70: 3H-9H.
38. Brown DF, Kinch SH, Doyle JT. Serum triglycerides in health and in ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1965; 273: 947-52.
39. NIH Consensus conference. Triglyceride, high-density lipoprotein, and coronary heart disease. NIH Consensus Development Panel on Triglyceride, High-Density Lipoprotein, and Coronary Heart Disease. *JAMA* 1993; 269: 505-10.
40. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, *et al.* Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 1220-5.
41. Lamarche B, Despres JP, Moorjani S, *et al.* Triglycerides and HDL-cholesterol as risk factors for ischemic heart disease. Results from the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 1996; 119: 235-45.

42. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, *et al.* Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115: 450-8.
43. Valdivielso P, Sanchez-Chaparro MA, Calvo-Bonacho E, *et al.* Association of moderate and severe hypertriglyceridemia with obesity, diabetes mellitus and vascular disease in the Spanish working population: results of the ICARIA study. *Atherosclerosis* 2009; 207: 573-8.
44. Bansal S, Buring JE, Rifai N, *et al.* Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007; 298: 309-16.
45. Carlson LA, Bottiger LE. Ischaemic heart-disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. Stockholm prospective study. *Lancet* 1972; 1: 865-8.
46. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 213-9.
47. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, *et al.* Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007; 298: 299-308.
48. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
49. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-53.
50. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288: 2709-16.
51. Malik S, Wong ND, Franklin SS, *et al.* Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004; 110: 1245-50.
52. Pigna G, Napoli A, Zaccagna F, *et al.* The relationship between metabolic syndrome, its components, and the whole-body atherosclerotic disease burden as measured by computed tomography angiography. *Atherosclerosis* 2011. [Epub ahead of print]
53. Chuengsamarn S, Sangpanich A, Laoopugsin N. Prevalence and risk factors of peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients at HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn Medical Center. *J Med Assoc Thai*; 93 Suppl 2: S32-8.



54. Callaghan BC, Feldman E, Liu J, *et al.* Triglycerides and Amputation Risk in Patients With Diabetes: 10-Year follow-up in the DISTANCE study. *Diabetes Care* 2011. [Epub ahead of print]
55. Zhang Y, Hong J, Gu W, *et al.* Impact of the metabolic syndrome and its individual components on risk and severity of coronary heart disease. *Endocrine* 2009; 36: 233-8.
56. McPherson R, Frohlich J, Fodor G, *et al.* Canadian Cardiovascular Society position statement--recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006; 22: 913-27.
57. Lemieux I, Pascot A, Couillard C, *et al.* Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation* 2000; 102: 179-84.
58. Lemieux I, Poirier P, Bergeron J, *et al.* Hypertriglyceridemic waist: a useful screening phenotype in preventive cardiology? *Can J Cardiol* 2007; 23 Suppl B: 23B-31B.
59. Sam S, Haffner S, Davidson MH, *et al.* Hypertriglyceridemic waist phenotype predicts increased visceral fat in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1916-20.
60. Blackburn P, Lemieux I, Almeras N, *et al.* The hypertriglyceridemic waist phenotype versus the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation clinical criteria to identify high-risk men with an altered cardiometabolic risk profile. *Metabolism* 2009; 58: 1123-30.
61. Gomez-Huelgas R, Bernal-Lopez MR, Villalobos A, *et al.* Hypertriglyceridemic waist: an alternative to the metabolic syndrome? Results of the IMAP Study (multidisciplinary intervention in primary care). *Int J Obes (Lond)* 2010. [Epub ahead of print]
62. Xie C, Wang ZC, Liu XF, *et al.* The common biological basis for common complex diseases: evidence from lipoprotein lipase gene. *Eur J Hum Genet*; 18: 3-7.
63. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
64. Ding YL, Wang YH, Huang W, *et al.* Glucose intolerance and decreased early insulin response in mice with severe hypertriglyceridemia. *Exp Biol Med (Maywood)*; 235: 40-6.
65. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, *et al.* The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1: 785-9.

66. Ferreira LD, Pulawa LK, Jensen DR, *et al.* Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50: 1064-8.
67. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001; 24: 588-97.
68. Cruz WS, Kwon G, Marshall CA, *et al.* Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction. *J Biol Chem* 2001; 276: 12162-8.
69. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 2008; 371: 1513-8.
70. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-23.
71. Yang W, Huang J, Ge D, *et al.* Lipoprotein lipase gene is in linkage with blood pressure phenotypes in Chinese pedigrees. *Hum Genet* 2004; 115: 8-12.
72. Tu X, Tu J, Wen X, *et al.* A study of lipoprotein lipase gene intron 8 polymorphisms in Chinese Han race essential hypertension patients. *Int J Cardiol* 2005; 99: 263-7.
73. Safar ME, Frohlich ED. The arterial system in hypertension. A prospective view. *Hypertension* 1995; 26: 10-4.
74. Cohn JS, Johnson EJ, Millar JS, *et al.* Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. *J Lipid Res* 1993; 34: 2033-40.
75. Cohn JS. Postprandial lipemia: emerging evidence for atherogenicity of remnant lipoproteins. *Can J Cardiol* 1998; 14 Suppl B: 18B-27B.
76. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med* 1999; 246: 341-55.
77. Caslake MJ, Packard CJ, Gaw A, *et al.* Fenofibrate and LDL metabolic heterogeneity in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 702-11.
78. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 160-7.
79. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 1993; 34: 1255-74.
80. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967; 276: 215-25 contd.

81. Athyros VG, Giouleme OI, Nikolaidis NL, *et al.* Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-5.
82. Gagne C, Brun LD, Julien P, *et al.* Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *CMAJ* 1989; 140: 405-11.
83. Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, *et al.* Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 1996; 335: 848-54.
84. Weinstein MM, Yin L, Tu Y, *et al.* Chylomicronemia elicits atherosclerosis in mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 30: 20-3.
85. Cambien F, Jacqueson A, Richard JL, *et al.* Is the level of serum triglyceride a significant predictor of coronary death in "normocholesterolemic" subjects? The Paris Prospective Study. *Am J Epidemiol* 1986; 124: 624-32.
86. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, *et al.* A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 701-7.
87. Tremblay K, Methot J, Brisson D, *et al.* Etiology and risk of lactescent plasma and severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol*; 5: 37-44.
88. Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, *et al.* Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1289-94.
89. Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, *et al.* Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1512-24.
90. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* 2007; 176: 1113-20.
91. Pejic RN, Lee DT. Hypertriglyceridemia. *J Am Board Fam Med* 2006; 19: 310-6.
92. Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999; 40: 1933-49.
93. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 109-21.

94. Schreibman PH, Wilson DE, Arky RA. Familial type IV hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med* 1969; 281: 981-5.
95. Goldberg IJ. Hypertriglyceridemia: impact and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009; 38: 137-49.
96. Ariza MJ, Sanchez-Chaparro MA, Baron FJ, *et al.* Additive effects of LPL, APOA5 and APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the ICARIA genetic sub-study. *BMC Med Genet*; 11: 66.
97. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1997; 135: 145-59.
98. Brisson D, St-Pierre J, Santure M, *et al.* Genetic epistasis in the VLDL catabolic pathway is associated with deleterious variations on triglyceridemia in obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 1325-33.
99. Perron P, Brisson D, Santure M, *et al.* Apolipoprotein E and lipoprotein lipase gene polymorphisms interaction on the atherogenic combined expression of hypertriglyceridemia and hyperapobetalipoproteinemia phenotypes. *J Endocrinol Invest* 2007; 30: 551-7.
100. Devanand DP, Pelton GH, Zamora D, *et al.* Predictive utility of apolipoprotein E genotype for Alzheimer disease in outpatients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2005; 62: 975-80.
101. Tuzgol S, Bijvoet SM, Bruin T, *et al.* Apolipoprotein CII-Padova (Tyr37-->stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. *J Med Genet* 1994; 31: 622-6.
102. Chen CH, Cao YL, Hu WC. Apolipoprotein C-II promoter T-->A substitution at position -190 affects on the transcription of the gene and its relationship to hyperlipemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 62-5.
103. Fojo SS, Stalenhoef AF, Marr K, *et al.* A deletion mutation in the ApoC-II gene (ApoC-II Nijmegen) of a patient with a deficiency of apolipoprotein C-II. *J Biol Chem* 1988; 263: 17913-6.
104. Niculescu LS, Vladica M, Sima AV. Association of APOA5 and APOC3 gene polymorphisms with plasma apolipoprotein A5 level in patients with metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*; 391: 587-91.
105. Sundaram M, Zhong S, Khalil MB, *et al.* Functional analysis of the missense APOC3 mutation Ala23Thr associated with human hypotriglyceridemia. *J Lipid Res*; 51: 1524-34.

- 106.** Hegele RA, Ban MR, Hsueh N, *et al.* A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4189-94.
- 107.** Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, *et al.* Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet*; 375: 1634-9.
- 108.** Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fisher RM, *et al.* Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis* 2003; 167: 311-7.
- 109.** Baroni MG, Berni A, Romeo S, *et al.* Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet* 2003; 4: 8.
- 110.** Humphries SE, Berglund L, Isasi CR, *et al.* Loci for CETP, LPL, LIPC, and APOC3 affect plasma lipoprotein size and sub-population distribution in Hispanic and non-Hispanic white subjects: the Columbia University BioMarkers Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12: 163-72.
- 111.** Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*; 467: 52-8.
- 112.** Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*; 466: 707-13.
- 113.** Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, *et al.* Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nat Genet*; 42: 684-7.
- 114.** Garenc C, Aubert S, Laroche J, *et al.* Population prevalence of APOE, APOC3 and PPAR-alpha mutations associated to hypertriglyceridemia in French Canadians. *J Hum Genet* 2004; 49: 691-700.
- 115.** Normand T, Bergeron J, Fernandez-Margallo T, *et al.* Geographic distribution and genealogy of mutation 207 of the lipoprotein lipase gene in the French Canadian population of Quebec. *Hum Genet* 1992; 89: 671-5.
- 116.** Minnich A, Kessler A, Roy M, *et al.* Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J Lipid Res* 1995; 36: 117-24.
- 117.** Panzenboeck U, Wintersberger A, Levak-Frank S, *et al.* Implications of endogenous and exogenous lipoprotein lipase for the selective uptake of HDL3-associated cholesteryl esters by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res* 1997; 38: 239-53.

- 118.** Seo T, Al-Haideri M, Treskova E, *et al.* Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. *J Biol Chem* 2000; 275: 30355-62.
- 119.** Murdoch SJ, Breckenridge WC. Effect of lipid transfer proteins on lipoprotein lipase induced transformation of VLDL and HDL. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1303: 222-32.
- 120.** Carriere F, Verger R, Lookene A, *et al.* Lipase structures at the interface between chemistry and biochemistry. *EXS* 1995; 73: 3-26.
- 121.** Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 1992; 287 ( Pt 2): 337-47.
- 122.** Wong H, Yang D, Hill JS, *et al.* A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5594-8.
- 123.** Griffon N, Jin W, Petty TJ, *et al.* Identification of the active form of endothelial lipase, a homodimer in a head-to-tail conformation. *J Biol Chem* 2009; 284: 23322-30.
- 124.** Faustinella F, Smith LC, Semenkovich CF, *et al.* Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. *J Biol Chem* 1991; 266: 9481-5.
- 125.** Scanu A. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* 1966; 153: 640-1.
- 126.** Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, *et al.* Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2007; 39: 1483-7.
- 127.** Paglialunga S, Cianflone K. Regulation of postprandial lipemia: an update on current trends. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 61-75.
- 128.** Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, *et al.* The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 1990; 265: 4570-7.
- 129.** Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, *et al.* Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 1998; 47: 431-8.
- 130.** Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, *et al.* PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; 15: 5336-48.
- 131.** Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E271-88.

- 132.** Gaudet D, Vohl MC, Julien P, *et al.* Relative contribution of low-density lipoprotein receptor and lipoprotein lipase gene mutations to angiographically assessed coronary artery disease among French Canadians. *Am J Cardiol* 1998; 82: 299-305.
- 133.** Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43: 1997-2006.
- 134.** Dionne C, Gagne C, Julien P, *et al.* Genealogy and regional distribution of lipoprotein lipase deficiency in French-Canadians of Quebec. *Hum Biol* 1993; 65: 29-39.
- 135.** Evans V, Kastelein JJ. Lipoprotein lipase deficiency--rare or common? *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 283-7.
- 136.** Garenc C, Aubert S, Laroche J, *et al.* Gene polymorphisms in the Quebec population: a risk to develop hypertriglyceridemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 588-96.
- 137.** Julien P, Vohl MC, Gaudet D, *et al.* Hyperinsulinemia and abdominal obesity affect the expression of hypertriglyceridemia in heterozygous familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes* 1997; 46: 2063-8.
- 138.** De Braekeleer M, Dionne C, Gagne C, *et al.* Founder effect in familial hyperchylomicronemia among French Canadians of Quebec. *Hum Hered* 1991; 41: 168-73.
- 139.** Baggio G, Manzato E, Gabelli C, *et al.* Apolipoprotein C-II deficiency syndrome. Clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after apolipoprotein C-II administration in two affected patients. *J Clin Invest* 1986; 77: 520-7.
- 140.** Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, *et al.* Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983; 24: 147-55.
- 141.** Brunzell JD, Miller NE, Alaupovic P, *et al.* Familial chylomicronemia due to a circulating inhibitor of lipoprotein lipase activity. *J Lipid Res* 1983; 24: 12-9.
- 142.** Feoli-Fonseca JC, Levy E, Godard M, *et al.* Familial lipoprotein lipase deficiency in infancy: clinical, biochemical, and molecular study. *J Pediatr* 1998; 133: 417-23.
- 143.** Heaney AP, Sharer N, Rameh B, *et al.* Prevention of recurrent pancreatitis in familial lipoprotein lipase deficiency with high-dose antioxidant therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1203-5.
- 144.** Stroes ES, Nierman MC, Meulenberg JJ, *et al.* Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2303-4.

- 145.** Gaudet D, de Wal J, Tremblay K, *et al.* Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler Suppl* 2010; 11: 55-60.
- 146.** Hauenschild A, Bretzel RG, Schnell-Kretschmer H, *et al.* Successful Treatment of Severe Hypertriglyceridemia with a Formula Diet Rich in Omega-3 Fatty Acids and Medium-Chain Triglycerides. *Ann Nutr Metab* 2010; 56: 170-5.
- 147.** Brisson D, Ledoux K, Bosse Y, *et al.* Effect of apolipoprotein E, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipoprotein lipase gene mutations on the ability of fenofibrate to improve lipid profiles and reach clinical guideline targets among hypertriglyceridemic patients. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 313-20.
- 148.** Julien P, Gagne C, Murthy MR, *et al.* Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-Canadian population. *Hum Mutat* 1998; Suppl 1: S148-53.
- 149.** Ruel IL, Gaudet D, Perron P, *et al.* Determinants of HDL particle size in patients with the null (P207L) or defective (D9N) mutation in the lipoprotein lipase gene: the Quebec LipD Study. *Atherosclerosis* 2002; 162: 269-76.
- 150.** Ruel IL, Gaudet D, Perron P, *et al.* Characterization of LDL particle size among carriers of a defective or a null mutation in the lipoprotein lipase gene: the Quebec LIPD Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1181-6.
- 151.** Gehrlich S. Common mutations of the lipoprotein lipase gene and their clinical significance. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1: 70-8.
- 152.** Rip J, Nierman MC, Ross CJ, *et al.* Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1236-45.
- 153.** Hall S, Chu G, Miller G, *et al.* A common mutation in the lipoprotein lipase gene promoter, -93T/G, is associated with lower plasma triglyceride levels and increased promoter activity in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1969-76.
- 154.** Ioka RX, Kang MJ, Kamiyama S, *et al.* Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J Biol Chem* 2003; 278: 7344-9.
- 155.** Young SG, Davies BS, Fong LG, *et al.* GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 389-96.
- 156.** Oka K, Wang-Iverson P, Paterniti JR, Jr., *et al.* Interaction of lipoprotein lipase with heparin. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 556: 173-80.



- 157.** Rutledge JC, Woo MM, Rezai AA, *et al.* Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ Res* 1997; 80: 819-28.
- 158.** Henderson AD, Richmond W, Elkeles RS. Hepatic and lipoprotein lipases selectively assayed in postheparin plasma. *Clin Chem* 1993; 39: 218-23.
- 159.** Cisar LA, Hoogewerf AJ, Cupp M, *et al.* Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *J Biol Chem* 1989; 264: 1767-74.
- 160.** Hoogewerf AJ, Cisar LA, Evans DC, *et al.* Effect of chlorate on the sulfation of lipoprotein lipase and heparan sulfate proteoglycans. Sulfation of heparan sulfate proteoglycans affects lipoprotein lipase degradation. *J Biol Chem* 1991; 266: 16564-71.
- 161.** Beigneux AP, Weinstein MM, Davies BS, *et al.* GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 211-6.
- 162.** Gin P, Yin L, Davies BS, *et al.* The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J Biol Chem* 2008; 283: 29554-62.
- 163.** Weinstein MM, Yin L, Beigneux AP, *et al.* Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J Biol Chem* 2008; 283: 34511-8.
- 164.** Ory DS. Chylomicrons and lipoprotein lipase at the endothelial surface: bound and GAG-ged? *Cell Metab* 2007; 5: 229-31.
- 165.** Cunningham O, Andolfo A, Santovito ML, *et al.* Dimerization controls the lipid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions. *EMBO J* 2003; 22: 5994-6003.
- 166.** Franssen R, Young SG, Peelman F, *et al.* Chylomicronemia with Low Postheparin Lipoprotein Lipase Levels in the Setting of GPIHBP1 Defects. *Circ Cardiovasc Genet* 2010. 3: 169-78
- 167.** Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, *et al.* The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem* 2006; 281: 934-44.
- 168.** Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, *et al.* ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2002; 277: 33742-8.
- 169.** Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, *et al.* Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 2002; 43: 1770-2.

- 170.** Shan L, Yu XC, Liu Z, *et al.* The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2009; 284: 1419-24.
- 171.** Liu J, Afroza H, Rader DJ, *et al.* Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. *J Biol Chem* 2010; 285: 27561-70
- 172.** Obunike JC, Lutz EP, Li Z, *et al.* Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 8934-41.
- 173.** Fisher EA. GPIHBP1: Lipoprotein Lipase's Ticket to Ride. *Cell Metab* 2010; 12: 1-2.
- 174.** Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 41-7.
- 175.** Gin P, Beigneux AP, Davies B, *et al.* Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1464-8.
- 176.** Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, *et al.* The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: New players, new insight. *Atherosclerosis* 2010; 211: 1-8.
- 177.** Engert JC, Berube P, Mercier J, *et al.* ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000; 24: 120-5.
- 178.** Hastbacka J, de la Chapelle A, Mahtani MM, *et al.* The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 1994; 78: 1073-87.
- 179.** Engert JC, Lemire M, Faith J, *et al.* Identification of a chromosome 8p locus for early-onset coronary heart disease in a French Canadian population. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 105-14.
- 180.** Gretarsdottir S, Sveinbjornsdottir S, Jonsson HH, *et al.* Localization of a susceptibility gene for common forms of stroke to 5q12. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 593-603.
- 181.** Foucher C, Rattier S, Flavell DM, *et al.* Response to micronized fenofibrate treatment is associated with the peroxisome-proliferator-activated receptors alpha G/C intron7 polymorphism in subjects with type 2 diabetes. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 823-9.

- 182.** Brouillette C, Bosse Y, Perusse L, *et al.* Effect of liver fatty acid binding protein (FABP) T94A missense mutation on plasma lipoprotein responsiveness to treatment with fenofibrate. *J Hum Genet* 2004; 49: 424-32.
- 183.** Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, *et al.* Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305: 869-72.
- 184.** Ingram CJ, Raga TO, Tarekegn A, *et al.* Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. *J Mol Evol* 2009; 69: 579-88.
- 185.** Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, *et al.* Genetic determinants of cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1475-81.
- 186.** Lin BK, Clyne M, Walsh M, *et al.* Tracking the epidemiology of human genes in the literature: the HuGE Published Literature database. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 1-4.
- 187.** Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, *et al.* STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. *PLoS Med* 2009; 6: e22.
- 188.** von Elm E, Altman DG, Egger M, *et al.* The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *PLoS Med* 2007; 4: e296.

