

Université de Montréal

La glycoprotéine GLG1 régule le métabolisme des lipides et le développement de
l'athérosclérose chez les souris déficientes en apolipoprotéine E

Par

Nadine Ardo

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en sciences pharmaceutiques, option pharmacologie

Avril 2020

© Nadine Ardo, 2020

Université de Montréal
Faculté de Pharmacie

Ce mémoire intitulé

La glycoprotéine GLG1 régule le métabolisme des lipides et le développement de l'athérosclérose chez les souris déficientes en apolipoprotéine E

Présenté par
Nadine Ardo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Pr Yahye Merhi
Président-rapporteur

Pr Gaétan Mayer
Directeur de recherche

Pr Simon-Pierre Gravel
Membre du jury

Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde. Des efforts significatifs ont été menés pour améliorer la prévention des MCV et ont abouti à une réduction du taux de mortalité. Cependant, un ralentissement considérable du taux de réduction des MCV a été observé à partir de 2011 malgré les nouvelles avancées thérapeutiques. Ces taux alarmants justifient le besoin de découvrir de nouvelles thérapies afin d'améliorer la prévention des MCV dans la population générale. Des taux élevés de cholestérol total et transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont fortement liés aux MCV athérosclérotiques. Ainsi, les thérapies hypolipémiantes sont les thérapies les plus utilisées pour prévenir les MCV. Nos résultats antérieurs ont identifié *Golgi glycoprotein 1* (GLG1) comme étant une nouvelle protéine impliquée dans le métabolisme lipidique. Par conséquent, notre étude actuelle vise à démontrer l'effet de GLG1 sur le développement de l'athérosclérose. Pour étudier cet effet, nous avons réduit l'expression de GLG1 (silencage génique ou *knockdown*) dans le foie de souris hypercholestérolémiques *ApoE*^{-/-} en utilisant un virus adéno-associé de type 8 (AAV8) véhiculant un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) ciblant GLG1. Deux semaines post-injection, les souris ont été nourries par un régime occidental pendant 12 semaines. L'étude a révélé que le *knockdown* de GLG1 réduit significativement les taux plasmatiques de cholestérol total, de lipoprotéines de très basse densité (VLDL), de LDL et diminue les lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique. Cependant, nos résultats ont démontré que le *knockdown* de GLG1 à l'aide du système AAV8 n'était pas stable pendant toute l'étude, le rendant inefficace au-delà de 2 mois. En résumé, nos résultats montrent que le *knockdown* de GLG1 réduit les taux de cholestérol plasmatique ainsi que la progression de l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-}. Cette réduction s'est produite en dépit de la perte progressive du *knockdown* de GLG1 et est probablement liée à la réduction de la sécrétion d'apolipoprotéines B100. Ces résultats montrent que GLG1 est une cible thérapeutique prometteuse pour abaisser les taux de cholestérol plasmatique, en particulier les VLDL et LDL, et prévenir le développement de l'athérosclérose.

Mots-clés : Virus adéno-associé, apolipoprotéine B100, souris *ApoE* déficientes, athérosclérose, cholestérol, GLG1, LDL, maladie cardiovasculaire.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide. Significant efforts have been made to prevent CVD and have resulted in a reduced mortality rate. However, a considerable slowdown in the reduction rate of CVD has been observed starting in 2011 despite new therapeutic advances. These alarming rates justify the need to discover new therapies to improve the prevention of CVD in the general population. High levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) are strongly linked to atherosclerotic cardiovascular diseases. Thus, lipid-lowering therapies are the most used therapies to prevent CVDs. Our previous study identified Golgi glycoprotein 1 (GLG1) as a new protein involved in lipid metabolism. Therefore, our current study aims to demonstrate the effect of GLG1 on the development of atherosclerosis. To study the effect of GLG1 on atherosclerosis, we reduced GLG1 expression in hypercholesterolemic *ApoE*^{-/-} mice livers using an adeno-associated virus coding for a short hairpin RNA (shRNA) targeting GLG1 then 2 weeks post-injection mice were fed a Western diet for 12 weeks. The study revealed that GLG1 knockdown significantly reduced plasma total cholesterol levels, especially very low-density lipoprotein (VLDL)- and LDL-C, and atherosclerotic lesions in the aortic root. However, our results showed that AAV-mediated GLG1 knockdown was not stable during the entire study, making it ineffective in lowering plasma cholesterol levels beyond 2 months. In summary, our results show that lowering GLG1 expression reduces plasma cholesterol levels as well as atherosclerosis progression in *ApoE*^{-/-} mice. Remarkably, the reduction in atherosclerosis occurred in spite of the gradual loss of GLG1 AAV-mediated knockdown and is likely related to the reduced apolipoprotein B100 secretion. These findings demonstrate that GLG1 is a promising therapeutic target for lowering plasma cholesterol levels, particularly VLDL- and LDL-C, and preventing atherosclerosis development.

Keywords: AAV, apoB100, *ApoE*-deficient mice, atherosclerosis, cholesterol, cardiovascular disease, GLG1, LDL.

Table des matières

Résumé	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux	6
Liste des figures	7
Liste des sigles et abréviations.....	8
Remerciements.....	11
Chapitre 1 – Introduction.....	12
1. Métabolisme des lipides	12
1.1. Les lipoprotéines : structure et classification.....	12
1.2. Les apolipoprotéines.....	14
1.3. Métabolisme des lipoprotéines	16
1.3.1. Digestion, absorption et transport des lipides alimentaires	18
1.3.1.1. Digestion des lipides alimentaires	18
1.3.1.2. Absorption des lipides.....	18
1.3.1.3. Les chylomicrons.....	18
1.3.2. Voie endogène des lipoprotéines	19
1.3.2.1. Assemblage des VLDL.....	20
1.3.2.2. Cascade de dégradation des VLDL	20
1.3.2.3. Catabolisme des LDL	20
1.3.3. Transport inverse du cholestérol	23
1.3.3.1. HDL naissantes	24

1.3.3.2.	Mécanisme d'efflux du cholestérol et maturation des HDL	24
1.3.3.3.	Clairance des HDL	25
2.	Athérosclérose	25
2.1.	Définition et facteurs de risque	25
2.2.	Physiopathologie.....	26
2.2.1.	Dysfonction endothéliale	26
2.2.2.	Infiltration des LDL et recrutement des monocytes.....	27
2.2.3.	Progression de la lésion	29
2.3.	Traitements.....	30
2.3.1.	Thérapies ciblant les lipides	31
2.3.1.1.	Statines	31
2.3.1.2.	Inhibiteurs de PCSK9	32
2.3.1.3.	Inhibiteurs de l'absorption du cholestérol.....	33
2.3.1.4.	Fibrates	33
2.3.2.	Thérapies anti-inflammatoires.....	34
2.3.2.1.	Anticorps dirigés contre l'interleukine 1 β (IL-1 β)	34
2.3.2.2.	Colchicine.....	34
3.	Hypercholestérolémie familiale.....	34
3.1.	Définition et présentation clinique	35
3.2.	Les principales mutations	36
3.2.1.	LDLR	36
3.2.2.	APOB	38
3.2.3.	PCSK9	39
3.2.4.	Quatrième locus.....	39

4.	Golgi glycoprotéine 1 (GLG1)	40
4.1.	Structure et distribution	40
4.2.	Rôles de GLG1	41
4.2.1.	Roulement des leucocytes	41
4.2.2.	Développement squelettique	43
4.2.3.	Hématopoïèse	44
4.2.4.	Athérosclérose	45
4.2.5.	Métabolisme des lipides	46
Chapitre 2 – Objectif du mémoire		49
Chapitre 3 – Article		51
3.1.	Abstract.....	54
3.2.	Introduction	55
3.3.	Materials and Methods.....	56
3.4.	Results.....	62
3.5.	Discussion	65
3.6.	Acknowledgments.....	68
3.7.	References	69
3.8.	Figures.....	73
Chapitre 4 – Discussion		76
Références bibliographiques		83
Annexes		95

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes lipoprotéines et leurs caractéristiques.....	15
Tableau 2. Les 5 classes de mutations dans LDLR.	37

Liste des figures

Chapitre 1 – Introduction :

Figure 1. Classification des lipoprotéines selon la taille, la densité et la composition.	12
Figure 2. Structure des lipoprotéines.	13
Figure 3. Les voies de transports intravasculaire du cholestérol.	17
Figure 4. Le devenir d'une particule de LDL et de son récepteur après endocytose.	22
Figure 5. Physiopathologie de l'athérosclérose.	30
Figure 6. Effets pléiotropes des statines sur les plaques athéromateuses.	32
Figure 7. Les cinq mutations fonctionnelles du récepteur des LDL.	38
Figure 8. Structure de GLG1.	40
Figure 9. Expression protéique de GLG1.	41
Figure 10. Rôle de PSGL-1, ESL-1 et CD44 dans la capture et le roulement des leucocytes.	42
Figure 11. Phénotypes des souris <i>Glg1</i> ^{-/-}	44
Figure 12. Effet de GLG1 sur le métabolisme des lipides.	47
Figure 13. Schéma représentant le mécanisme proposé de la sécrétion et la dégradation de l'apoB en présence (gauche) ou en absence de GLG1 (droite).	49

Chapitre 3 – Article :

Figure 3.1. Experimental Protocol in <i>ApoE</i> ^{-/-} mice.	58
Figure 3.2. GLG1 mRNA and protein expression is strongly inhibited 2 weeks after AAV8-shGlg1 injection but is re-expressed progressively.	73
Figure 3.3. Plasma cholesterol levels in GLG1 knockdown mice.	74
Figure 3.4. Reduced atherosclerotic lesions in the absence of GLG1 in <i>ApoE</i> ^{-/-} mice.	75

Annexe :

Figure A1. Analyses densitométriques de GLG1 (A), apoB100 (B), apoB48 (C), LDLR (E), pro-PCSK9 (F) et PCSK9 (G) dans le foie des souris et l'apoB100 (D) dans le plasma des souris.	95
Figure A2. Expression relative de l'ARNm de LDLR (A), PCSK9 (B) et HMGCR (C) dans le foie des souris.	96

Liste des sigles et abréviations

AA : Acide aminé
AAV : Virus adéno-associé
ABCA1 : *ATP-binding cassette A1*
ACAT : *Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : Acide gras
APN : Adiponectine
Apo: Apolipoprotéine
APOBEC1 : *APOB mRNA editing complex*
AVC : Accident vasculaire cérébral
CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*
CFR : *Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor*
CML : Cellules musculaires lisses
CRP : Protéine C-réactive
CV : Cardiovasculaire
DAMP : *Danger-associated molecular pattern*
DGAT : *Acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase*
eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*
ESL-1 : *E-selectin ligand 1*
FABPm : *Plasma membrane fatty acid-binding proteins*
FATP4 : *Fatty acid transport proteins 4*
FDB : *Familial defective apoB-100*
FGF : *Fibroblast growth factor*
FMF : Fièvre méditerranéenne familiale
FUT : Fucosyltransférase
GLG1 : Golgi glycoprotéine 1
HDL : *High density lipoprotein*

HF : Hypercholestérolémie familiale
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryle-CoA
HSPC : Cellule souche et progénitrice hématopoïétique
HTA : Hypertension artérielle
IDL : *Intermediate density lipoprotein*
Il-8 : Interleukine-8
INSIG : *Insulin-induced gene*
LCAT : Lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL : *Low density lipoprotein*
LDLR : Récepteur des LDL
Lp (a) : Lipoprotéine (a)
LRP : *LDLR-related-protein*
LTCP-1 : *Latent transforming growth factor- β complex protein 1*
MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein 1*
MCV : Maladie cardiovasculaire
MEC : Matrice extracellulaire
MTP : *Microsomal triglyceride transfer protein*
Narc-1 : *Neural Apoptosis Regulated Convertase 1*
NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NO : Oxyde nitrique
NPC1L1 : *Niemann-Pick C1-like 1*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*
PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PL : Phospholipide
PLTP : *Phospholipid Transfer Protein*
PPAR- α : *Peroxisome proliferator-activated receptor- α*
PRR : *Pattern recognition receptor*

PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*

RCT : *Reverse cholesterol transport*

RE : *Réticulum endoplasmique*

ROS : *Reactive oxygen species*

SCAP : *SREBP cleavage-activating protein*

shRNA : *Short hairpin RNA*

SLe : *Sialyl Lewis*

SR-BI : *Scavenger receptor class B1*

SRE : *Sterol response element*

SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*

TG : *Triglycéride*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TM : *Transmembrane*

VLDL : *Very low density lipoprotein*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Gaétan Mayer, pour sa patience, son implication et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je souhaite également remercier les membres du Jury, les professeurs Yahye Merhi et Simon-Pierre Gravel, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Un grand merci à toute l'équipe, Alisar Katbe, Annie Demers, Brent Richard Stranix et Steve Poirier, pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans votre équipe. J'aimerais surtout remercier Annie pour avoir répondu à toutes mes questions. Je tiens également à remercier Alisar pour l'aide et la confiance apportée.

Finalement, je remercie mes parents, Albert et Arlette, ma sœur Rita et mon frère Jean-Paul pour le soutien et le support moral. Merci également à « my partner in crime », Maya Farhat, qui était à mes côtés durant toute cette aventure. Merci pour ta patience et tes encouragements. Sans vous, je n'aurais jamais pu accomplir ce travail. Je vous aime !

Chapitre 1 – Introduction

1. Métabolisme des lipides

Les lipides sont des molécules organiques indispensables à l'organisme humain. Ils sont insolubles dans l'eau et les milieux biologiques aqueux tels que le sang et le cytoplasme. Les lipides circulent dans le plasma sous forme de lipoprotéines (formées d'apolipoprotéines (apo), cholestérol, triglycérides (TG) et phospholipides (PL)). Celles-ci proviennent de l'association des lipides à des protéines, nommées les apolipoprotéines, formant un complexe miscible à l'eau (1).

1.1. Les lipoprotéines : structure et classification

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité, leur taille et/ou leur mobilité électrophorétique sur gel d'agarose. On distingue ainsi 5 classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL (*Very low-density lipoprotein*), les IDL (*Intermediate-density lipoprotein*), les LDL (*Low-density lipoprotein*) et les HDL (*High-density lipoprotein*).

C'est la composition relative en protéines et en lipides qui détermine la densité de ces lipoprotéines. En effet, plus elles sont riches en protéines plus leur densité est élevée. Au contraire, plus elles sont enrichies en lipides plus leur densité diminue (2). La classification des lipoprotéines selon leur taille, leur densité et leur composition est présentée dans la **figure 1**.

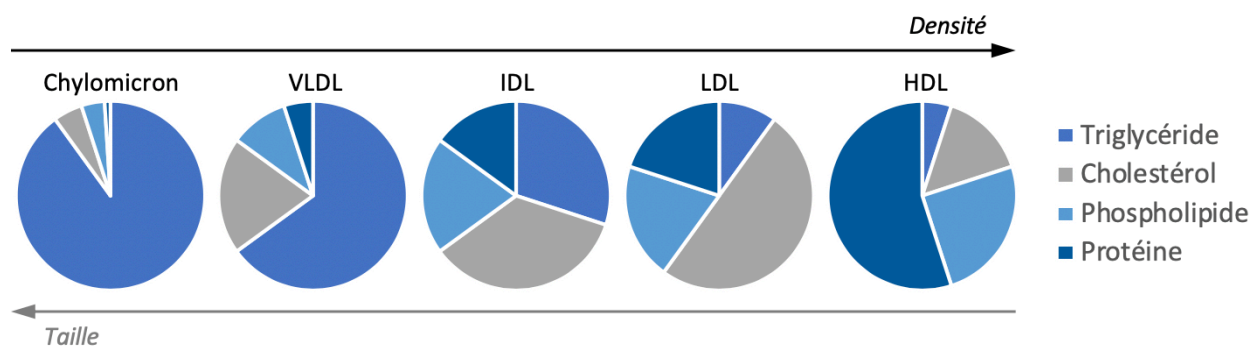


Figure 1. Classification des lipoprotéines selon la taille, la densité et la composition.

VLDL: very low-density lipoprotein; IDL: intermediate-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein.

La structure générale de toutes les lipoprotéines est la suivante (**Figure 2**) :

- Une enveloppe hydrophile constituée de PL, de cholestérol libre ou non estérifié et d'apolipoprotéines
- Un cœur lipidique hydrophobe formé de TG et de cholestérol estérifié (3).

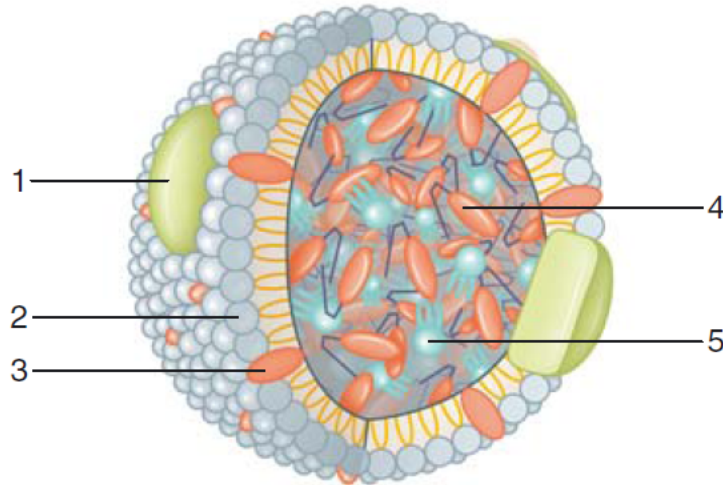


Figure 2. Structure des lipoprotéines.

Toutes les lipoprotéines sont formées d'une enveloppe hydrophile et d'un cœur lipidique hydrophobe. Adaptée de (4).

1. Apolipoprotéine ; 2. Phospholipides ; 3. Cholestérol non estérifié ; 4. Cholestérol estérifié ; 5. Triglycérides.

La lipoprotéine (a) ou Lp(a) possède une structure similaire aux particules de LDL, par la taille, le contenu en lipide et la présence de l'apoB100. Elle se distingue par la présence de l'apoprotéine (a). Elle se distingue des autres lipoprotéines du fait de son homologie structurale avec le plasminogène, protéine impliquée dans la fibrinolyse. Ceci explique alors ses propriétés prothrombotiques. Son rôle comme facteur de risque indépendant des MCV est désormais établi grâce aux nombreuses études épidémiologiques et génétiques (3).

1.2. Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines correspondent à un ensemble de protéines connues pour s'associer aux lipides et former les lipoprotéines. Les apolipoprotéines ont quatre fonctions principales. Elles guident la formation des lipoprotéines et jouent un rôle structural majeur, favorisant la stabilité de ce complexe. De plus, elles peuvent servir d'activateurs ou inhibiteurs d'enzymes ou de ligands pour certains récepteurs impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines. Les différentes lipoprotéines ainsi que leurs caractéristiques sont toutes résumées dans le **tableau 1**.

Apolipoprotéine	Lieu de synthèse	Présence dans les lipoprotéines	Rôle métabolique
ApoA-I	Foie Intestin	HDL Chylomicrons	Protéine de structure des HDL Active la LCAT
ApoA-II	Foie	HDL Chylomicrons	Protéine de structure des HDL Active la lipase hépatique
ApoA-IV	Intestin	HDL Chylomicrons	Inconnu
ApoA-V	Foie	VLDL Chylomicrons HDL	Favorise la lipolyse des TG médiée par la LPL
ApoB48	Intestin	Chylomicrons	Protéine de structure des chylomicrons
ApoB100	Foie	VLDL IDL LDL Lp (a)	Protéine de structure Ligand des récepteurs aux LDL
ApoC-I	Foie	Chylomicrons VLDL HDL	Active la LCAT
ApoC-II	Foie	Chylomicrons VLDL HDL	Co-facteur de la LPL
ApoC-III	Foie	Chylomicrons VLDL HDL	Inhibe la LPL et la capture des lipoprotéines
ApoE	Foie	Résidus ou « <i>remnants</i> » des chylomicrons IDL HDL	Ligand des récepteurs aux LDL
Apo(a)	Foie	Lp (a)	Inhibe l'activation du plasminogène

Tableau 1. Les différentes lipoprotéines et leurs caractéristiques. Adapté de (3).

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein; IDL: intermediate-density lipoprotein; LCAT: lécithine-cholestérol acyltransférase; LPL: lipoprotéine lipase; TG: triglycéride.

1.3. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines implique 3 voies principales : la voie exogène, la voie endogène et le transport inverse du cholestérol (RCT, *reverse cholesterol transport*). Les lipides alimentaires sont transportés de l'intestin vers les cellules périphériques par la voie exogène, alors que la voie endogène permet le transport des lipides d'origine hépatique. Comme son nom l'indique, le transport inverse du cholestérol assure le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Le cholestérol présent dans l'organisme provient de 2 sources différentes : 20% est d'origine alimentaire et le reste est synthétisé par le foie. Le foie est le seul organe capable de synthétiser et d'éliminer le cholestérol de l'organisme. Les cellules périphériques ne possèdent pas le système enzymatique nécessaire à l'élimination du cholestérol qui a tendance à s'accumuler sous forme estérifiée. L'homéostasie du cholestérol est maintenue grâce à la voie du transport inverse qui récupère l'excès de cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour l'éliminer. Ainsi, il pourra être excrété dans la bile, sous forme de cholestérol libre ou après conversion en acide biliaire (**Figure 3**) ou directement par l'intestin (excrétion *trans-intestinale* de cholestérol (TICE)) (5).

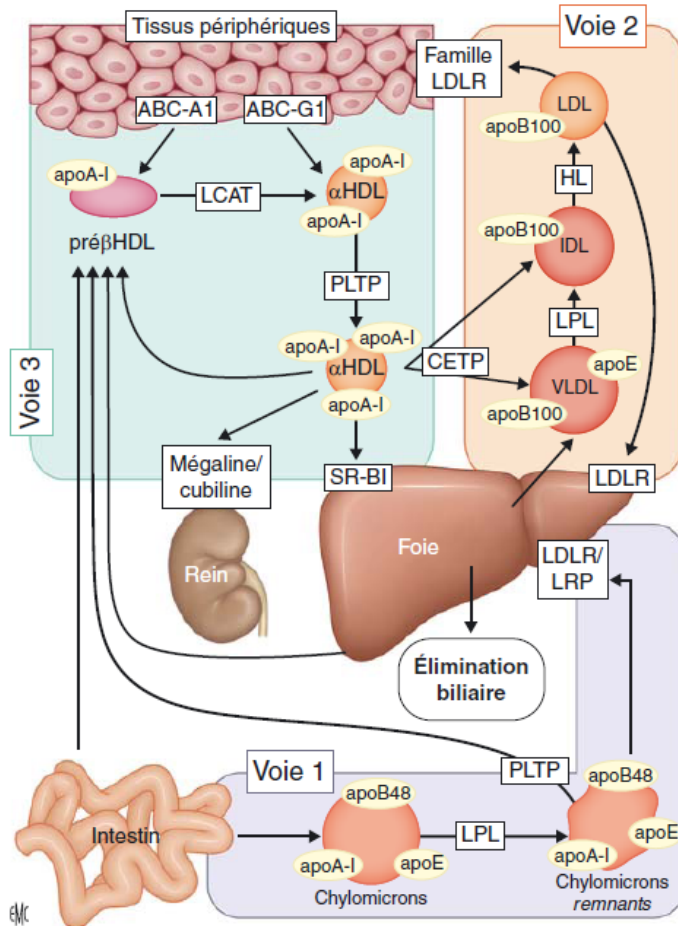


Figure 3. Les voies de transports intravasculaire du cholestérol.

Voie exogène (voie 1) : les lipides alimentaires digérés seront assemblés à nouveau dans les entérocytes pour former les chylomicrons riches en triglycérides. Une fois dans la circulation sanguine, sous l'action de la LPL, les chylomicrons, appauvris en TG seront convertis en résidus ou « *remnants* » captés par le foie. Voie d'apport endogène (voie 2) : le foie synthétise des particules riches en TG de très faible densité soit les VLDL. Ces derniers vont également subir l'action de la LPL pour aboutir à la formation d'IDL. La lipase hépatique, en hydrolysant davantage les TG, permettra la transformation des IDL en LDL, principale lipoprotéine impliquée dans le transport du cholestérol aux tissus périphériques. Voie de retour inverse du cholestérol (voie 3) : les HDL sont responsables du retour du cholestérol périphérique

excédentaire au foie. Cette voie est initiée par les HDL naissants ou préβHDL, qui vont capter du cholestérol *via* le transporteur ABCA1, indispensable à l'efflux du cholestérol. Par la suite, le cholestérol capté sera estérifié par la LCAT. Cet enrichissement en ester de cholestérol permet la conversion des préβHDL discoïdales en αHDL sphériques. L'efflux de cholestérol vers les αHDL se poursuit par plusieurs mécanismes dont les processus actifs impliquant ABCA1 et ABCG1 ou même par une diffusion passive. De plus, les αHDL font l'objet de remaniement permanent sous l'action de plusieurs enzymes : PLTP qui favorise la formation d'HDL de grande taille et la CETP responsable du transfert de cholestérol depuis les HDL vers les VLDL et IDL. Enfin, le cholestérol périphérique se trouvant désormais au niveau de l'HDL sera capté de façon sélective par le récepteur SR-BI au niveau du foie pour être éventuellement secrété par la bile, et les HDL résiduelles peuvent être également éliminées par voie rénale grâce aux récepteurs de type cubiline/mégaline. Adaptée de (4).

ABCA1, ABCG1 : transporteurs ATP-binding cassette A1 et G1; HDL : high-density lipoprotein; LDL : low-density lipoprotein; VLDL : very low-density lipoprotein; IDL : intermediate-density lipoprotein; LCAT : lécithine-cholestérol acyltransferase; CETP : cholesteryl ester transfer protein; PLTP : phospholipid transfer protein; LDLR : récepteur LDL; LPL : lipoprotéine lipase.

1.3.1. Digestion, absorption et transport des lipides alimentaires

1.3.1.1. Digestion des lipides alimentaires

L'émulsification des lipides par les sels biliaires est une étape clé de la digestion intestinale, facilitant ainsi l'hydrolyse des substrats par les différentes lipases. En effet, la lipase pancréatique, en présence de son cofacteur la co-lipase, hydrolyse les TG émulsionnés au niveau du duodénum et aboutit à la libération d'acides gras (AG) et de 2-monoglycérides. L'hydrolyse du cholestérol estérifié par la cholestérol estérase pancréatique est essentielle pour permettre à la forme libre d'être absorbée. Quant aux phospholipides (tel que la lécithine ou phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine), il y a libération d'acide gras et de lysophospholipides sous l'action de la phospholipase A2 présente dans le suc pancréatique (6).

1.3.1.2. Absorption des lipides

L'absorption intestinale du cholestérol se fait par une diffusion facilitée médiée par le transporteur *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1). Le cholestérol est transporté de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique, où il sera par la suite estérifié. À l'inverse, le cholestérol peut être refoulé à l'extérieur de l'entérocyte grâce à des protéines de types *ATP-binding cassette* (ABC) protein, ABCG5 et ABCG8. Quant à l'absorption des AG et du 2-monoglycéride, elle se fait par simple diffusion (flip-flop) pour les AG à courtes chaînes ou grâce à des transporteurs protéiques tel que « *Plasma membrane fatty acid-binding proteins* » (FABPm), « *fatty acid transport proteins 4* » (FATP4) et CD36 pour les AG à longues chaînes (7).

1.3.1.3. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont synthétisés exclusivement dans l'intestin afin de transporter les lipides alimentaires et les vitamines liposolubles dans le sang. Leur noyau lipidique est formé de TG, de cholestérol estérifié et de vitamines liposolubles alors que leur enveloppe est constituée de cholestérol libre, protéines et de phospholipides, en particulier la phosphatidylcholine. La composante structurale majeure des chylomicrons est l'apoB48. L'apoA-I, apoA-IV, et des apoC en font également partie (7). L'assemblage des chylomicrons au sein des entérocytes nécessite plusieurs étapes. Une fois absorbé par les entérocytes, c'est au niveau du réticulum endoplasmique (RE) que le cholestérol sera ré-estérifié par l'*acyl-CoA cholesterol acyltransferase*

(ACAT) et que les AG et les 2-monoglycérides seront re-synthétisés en diacylglycérol (8). Dans le RE, la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) intervient pour transférer les lipides à l'apoB48 naissante. Ces particules de chylomicrons seront transférées du RE vers l'appareil de Golgi au niveau duquel elles vont acquérir d'autres apolipoprotéines et vont être sécrétées dans la lymphe pour rejoindre la circulation sanguine (3, 7).

Une fois dans la circulation systémique, les chylomicrons vont acquérir de nouvelles protéines provenant des HDL. Le métabolisme des chylomicrons comporte 2 étapes : hydrolyse des TG par la lipoprotéine lipase (LPL) et la capture des résidus de chylomicrons par les cellules hépatiques. Ainsi, les TG des chylomicrons vont être hydrolysés par la LPL en présence de son cofacteur l'apoC-II. Les AG libérés seront captés par les muscles et les tissus adipeux (9). Contrairement à l'apoC-II, l'activité de la LPL est inhibée par l'apoC-III. Cette lipolyse aboutit à une réduction du volume des chylomicrons qui a pour conséquence un transfert de PL, d'apoA, apoC-II et d'apoC-III à l'HDL. La résultante finale est une nouvelle particule nommée résidus des chylomicrons. Elle est enrichie en cholestérol estérifié et contient l'apoB48 et l'apoE (3). Les résidus des chylomicrons sont rapidement captés par le foie suite à la liaison de l'apoE avec le récepteur de LDL (LDLR) ou *LDLR-related-protein* (LRP). D'ailleurs, suite à un repas, la totalité des chylomicrons est éliminée de la circulation dans un délai de 12-14 heures (10). Les résidus vont être internalisés dans les hépatocytes et vont subir une protéolyse et une lipolyse responsable de la libération du cholestérol libre. Ce cholestérol pourra être soit éliminé dans la bile à l'état libre ou sous forme d'acides biliaires ou directement par l'intestin (excrétion *trans-intestinale de cholestérol* (TICE)), soit incorporé dans les VLDL nouvellement synthétisées au niveau hépatique, soit stocké sous forme estérifiée dans les gouttelettes lipidiques (4, 11).

1.3.2. Voie endogène des lipoprotéines

Le foie se trouve au centre du métabolisme des lipoprotéines et constitue le point de départ de la voie endogène. En effet, au niveau hépatique les triglycérides sont synthétisés et incorporés au cœur des VLDL pour être sécrétés par la suite dans le sang (2). Des anomalies dans le métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB sont à l'origine de certaines dyslipidémies et sont associés à un risque accru de maladies cardiovasculaires (MCV) (12).

1.3.2.1. *Assemblage des VLDL*

Les VLDL sont des lipoprotéines riches en TG et sont responsables du transport des lipides du foie vers les tissus périphériques. Les TG à incorporer sont synthétisés dans la lumière du RE en réponse aux influx d'AG libres provenant des adipocytes, des résidus des chylomicrons ou de l'intestin par la veine porte (13). La voie principale de synthèse des VLDL implique le transfert d'un acyl à un diacylglycérol sous l'action de la *acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase* (DGAT), aboutissant à la synthèse d'une molécule de TG (14). Quant au cholestérol estérifié présent dans le cœur hydrophobe des VLDL, il est obtenu par action de l'ACAT hépatique. L'assemblage débute par la lipidation de l'apoB100 dans le RE, médiée par la MTP. Cependant, une quantité insuffisante de lipides résulte en une dégradation intracellulaire de l'apoB100 (13).

1.3.2.2. *Cascade de dégradation des VLDL*

Une fois sécrétées dans la circulation sanguine et tout comme les chylomicrons, les VLDL vont être hydrolysées sous l'action de LPL pour libérer des AG captés par les tissus (4). L'hydrolyse des triglycérides de VLDL entraîne la formation de résidus, appelés IDL. Ces particules sont relativement enrichies en cholestérols estérifiés et acquièrent l'apoE provenant des HDL (3, 8). Le transfert d'ester de cholestérol des HDL vers les VLDL, IDL et LDL se fait sous l'action de la CETP et il est accompagné par un transfert réciproque de TG aux HDL. Par une voie analogue à celle de l'élimination des résidus des chylomicrons, les IDL peuvent être épurées de la circulation par liaison de l'apoE aux récepteurs hépatiques LDL et LRP. Seulement 50% des IDL sont concernées par cette voie. Le reste va continuer à être hydrolysé par la lipase hépatique provoquant une diminution de la teneur en TG et un transfert d'apolipoprotéines des IDL vers d'autres lipoprotéines conduisant ainsi à la formation de LDL. Ces particules contiennent majoritairement du cholestérol estérifié et uniquement l'apoB100. Ainsi, le LDL est un produit final du métabolisme des VLDL (3).

1.3.2.3. *Catabolisme des LDL*

Les LDL assurent le transport du cholestérol vers les différents tissus suite à leur interaction avec les récepteurs aux LDL. Les LDLR hépatiques constituent la principale voie d'élimination du cholestérol de la circulation et leur activité est minutieusement régie par les taux de cholestérol

intracellulaire (15). Une fois synthétisés dans le RE, ces récepteurs seront transportés vers l'appareil de Golgi et ensuite vers la membrane plasmique où ils se rassemblent dans des puits recouverts de clathrine. L'internalisation des LDL s'effectue en plusieurs étapes. Grâce à leur apoB100, les particules de LDL se lient aux LDLR et les complexes sont ensuite internalisés dans la cellule par endocytose. Au pH acide des endosomes, les LDLR vont subir une modification conformationnelle favorisant alors la libération des LDL (16). Ces particules sont transportées vers les lysosomes au niveau desquels les hydrolases lysosomales dégradent l'apoB100 en acides aminés et clivent le cholestérol estérifié en cholestérol libre et en acides gras. Quant aux LDLR libérés, ils regagnent la surface cellulaire pour assurer un nouveau cycle d'internalisation (17).

PCSK9

Les proprotéines convertases constituent une famille d'enzymes impliquées dans la transformation des précurseurs protéiques, tels que les hormones, les enzymes, les neuropeptides et les récepteurs, en molécules bioactives par protéolyse (18). Jusqu'à présent, neuf protéases à sérine ont été découvertes. En effet, Seidah et al. (19) ont caractérisé le neuvième membre de la famille des subtilases : la proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9), initialement appelée Narc-1 (Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1) puisqu'elle a été identifiée par le clonage d'ADN complémentaire (ADNc, acide désoxyribonucléique complémentaire) exprimés à la suite d'une apoptose induite par la privation de sérum des neurones du cervelet. PCSK9 est principalement d'origine hépatique, mais est également bien exprimée dans l'intestin, les reins et le système nerveux. PCSK9 contient un peptide signal (acides aminés (aa) 1-30), un prodomaine (aa 31 à 152), un domaine catalytique (aa 153 à 404), une région charnière (aa 405 à 454) et suivi d'un domaine C-terminale de 237 aa riches en cystéines et histidines (aa 455 à 692) (20, 21) .

Dégradation du LDLR

PCSK9 est synthétisée et sécrétée par les hépatocytes. PCSK9 circulant se lie, par son domaine catalytique, au domaine EGF-A (facteur de croissance épidermique) du LDLR. Le complexe est ensuite acheminé vers les endosomes. Au pH acide de des endosomes, l'affinité de

PCSK9 pour le LDLR augmente fortement (22), empêchant ainsi le récepteur d'adopter une conformation fermée requise pour son recyclage. Par conséquent, PCSK9 perturbe le recyclage de LDLR conduisant à sa dégradation dans les lysosomes et par la suite à un nombre réduit de LDLR disponibles (**Figure 4**) (21, 23, 24).

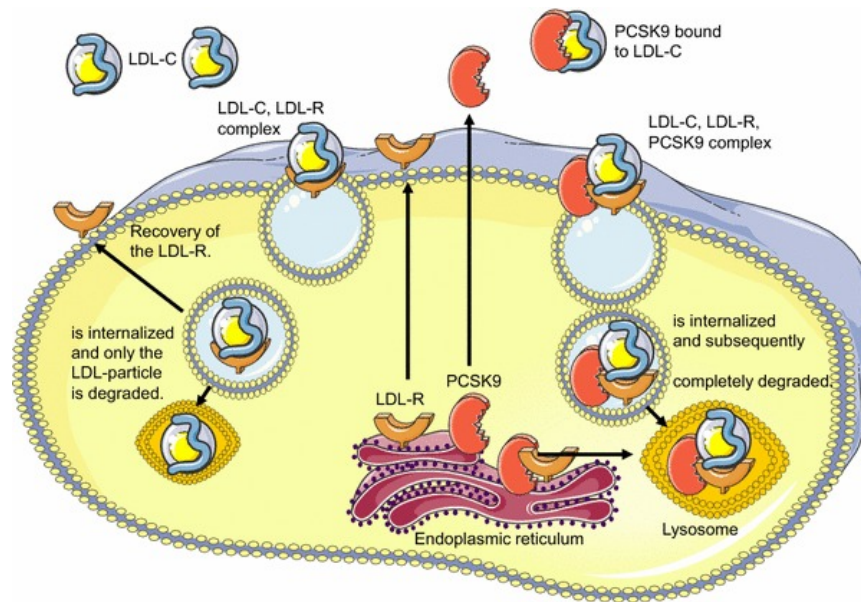


Figure 4. Le devenir d'une particule de LDL et de son récepteur après endocytose.

Après la liaison d'une particule de LDL à son récepteur (LDLR), le complexe est internalisé dans un puit de clathrine qui finit par former une vésicule et fusionner avec un endosome. Le pH acide de l'endosome ($\text{pH} \approx 5$) provoque la dissociation des particules de LDL de leur récepteur. Les LDL sont transportées vers des lysosomes au niveau desquels elles sont dégradées. Quant au LDLR libéré, il regagne la surface cellulaire pour assurer un nouveau cycle d'internalisation. D'autre part, la liaison de PCSK9 au LDLR empêche le recyclage de LDLR conduisant à sa dégradation. Adaptée de (23).

L'internalisation des LDL constitue un apport substantiel en cholestérol responsable d'un rétrocontrôle négatif. En effet, l'augmentation du cholestérol libre intracellulaire permet :

- D'activer l'ACAT responsable de l'estérification de ce cholestérol qui sera stocké dans des gouttelettes lipidiques, ce qui protège la cellule contre la mort cellulaire induite par le cholestérol libre à forte dose (25) ;
- La suppression de la transcription et l'accélération de la dégradation de la HMG-CoA réductase, enzyme limitante de la voie de synthèse *de novo* du cholestérol ;

- La suppression de la transcription du gène *LDLR*, ce qui permet de réguler le nombre de récepteurs nécessaire pour maintenir un taux de cholestérol intracellulaire suffisant pour les besoins métaboliques en évitant la surcharge.

Ces phénomènes de répression sont sous le contrôle d'une paire de facteurs de transcription liés à la membrane du RE et régulés par le stérol, nommés SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) (17). Ils sont synthétisés sous forme de protéines inactives intégrées à la membrane du RE. Cet état inactif est maintenu grâce à leur liaison au *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) et *insulin-induced gene* (INSIG), protéine de rétention du RE. En cas de déplétion en cholestérol, SCAP subit des modifications conformationnelles permettant la dissociation du complexe SREBP-SCAP de INSIG et la migration vers l'appareil de Golgi. À ce niveau, SREBP2 est clivé par deux protéases pour libérer sa partie N-terminale cytosolique et agir en tant que facteur de transcription. L'extrémité N-terminale de la SREBP2 est alors transloquée vers le noyau où il se lie à l'élément de réponse au stérol (SRE, « *sterol response element* ») qui se trouve au niveau des promoteurs de tous les gènes des 21 enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol (*HMG-CoA réductase, mevalonate kinase etc...*) et du *LDLR*, augmentant ainsi leur transcription (26, 27). Le niveau de cholestérol intracellulaire et SREBP2 régulent aussi l'expression de *PCSK9*. Étant donné que le promoteur du gène *PCSK9* contient la séquence SRE, *PCSK9* est régulé par des stérols à travers SREBP2. Les taux de *PCSK9* diminuent au cours du jeûne et augmentent après l'alimentation (28).

1.3.3. *Transport inverse du cholestérol*

Le concept de transport inverse du cholestérol permet de décrire le processus par lequel le cholestérol extra-hépatique ou périphérique est ramené au foie pour être excrété dans la bile sous forme d'acides biliaires ou cholestérol libre. Cette voie de retour est indispensable pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Effectivement, les cellules périphériques acquièrent du cholestérol par la synthèse de novo ou l'internalisation de lipoprotéines, mais elles sont incapables de le cataboliser. Vu la toxicité liée à l'accumulation du cholestérol libre provoquant la mort cellulaire, ces cellules ont développé plusieurs mécanismes de défense dont le plus important est le RCT. Les HDL, lipoprotéines antiathérogènes, jouent un rôle majeur dans cette voie (29).

1.3.3.1. HDL naissantes

Le foie et l'intestin grêle secrètent les HDL sous forme de particules naissantes discoïdes formées essentiellement de phospholipides et d'apoA-I, on parle alors d'HDL naissante ou pré-βHDL. Cette biogénèse implique le transporteur ABCA1 indispensable à l'efflux du cholestérol et des PL vers l'apoA-I. En plus de leur synthèse hépatique ou intestinale, les pré-βHDL résultent de l'assemblage de PL et de l'apoA-I libérés par les chylomicrons suite à leur déstabilisation par la LPL ou du remodelage intravasculaire des HDL matures (4).

1.3.3.2. Mécanisme d'efflux du cholestérol et maturation des HDL

La maturation des HDL comporte 2 étapes clés : l'efflux du cholestérol et son estérification par la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT). L'efflux du cholestérol à partir des cellules périphériques aux HDL fait intervenir 4 processus différents : la diffusion passive, les voies impliquant les transporteurs ABCG1 et ABCA1, ainsi que le récepteur scavenger classe B1 (SR-BI, « *scavenger receptor class B1* ») (30). Une fois le cholestérol lié à l'HDL, la LCAT activée par son cofacteur l'apoA-I, catalyse le transfert d'acide gras vers le cholestérol libre acquis. Sous sa forme estérifiée, ce cholestérol pénètre dans le noyau hydrophobe de l'HDL, transformant progressivement cette dernière en particule sphérique de taille croissante : αHDL. De plus, les αHDL font l'objet de remaniement permanent sous l'action de plusieurs enzymes (lipase hépatique et endothéliale, PLTP, CETP). La CETP régit le transfert du cholestérol estérifié des HDL vers des lipoprotéines de faible densité en échange de triglycérides. Par ailleurs, elle est responsable d'une accumulation de cholestérol estérifié dans les LDL et leur diminution dans les HDL. Ceci se reflète respectivement par une augmentation du taux de LDL et une diminution du taux de HDL. Cette substitution du cholestérol estérifié non hydrolysable, associée à l'hydrolyse par la lipase hépatique des TG acquis, participe à l'appauvrissement en lipide du cœur hydrophobe et l'instabilité des HDL. Ainsi, les réactions d'hydrolyse citées ci-dessus, entraînent la dissociation des HDL en une particule αHDL appauvrie en lipides neutres et de taille réduite ainsi qu'une particule préβHDL (31).

1.3.3.3. *Clairance des HDL*

Au cours du RCT, le cholestérol incorporé dans les particules HDL sera transporté à travers le compartiment vasculaire pour être livré au foie. La principale voie d'internalisation du cholestérol provenant des HDL par les hépatocytes s'effectue par le récepteur SR-BI. Ainsi, au niveau du foie et des tissus stéroïdogènes, ce récepteur assure une capture sélective du cholestérol, mais sans internalisation ni dégradation de l'apoA-I. Dans le foie, le cholestérol participera à la synthèse des sels biliaires ou sera excrété tel quel dans la bile, alors qu'au niveau des tissus stéroïdogènes il servira de substrat pour la formation des hormones stéroïdiennes (31).

2. **Athérosclérose**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde, ce qui correspond à 17.5 millions de décès par an. Dans 80% des cas, elles surviennent sous forme de crise cardiaque ou d'accident vasculaire cérébral (AVC) causés principalement par l'athérosclérose (32).

2.1. **Définition et facteurs de risque**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi artérielle, caractérisée par l'accumulation de lipides dans l'intima, la paroi interne des vaisseaux (**Figure 5**). Elle commence très tôt dans l'enfance et progresse silencieusement au cours de la vie. L'accumulation de plaques athéromateuses se fait à l'intérieur des artères de moyens et gros calibres; surtout aux endroits où le flux laminaire est perturbé, tels que les bifurcations (33). La formation de ces plaques se fait de manière progressive et résulte en un épaissement de la paroi artérielle pouvant entraîner la réduction du flux sanguin. L'obstruction de la lumière vasculaire par les plaques ou leur rupture entraîne des conséquences graves, tels qu'un AVC ou un infarctus du myocarde (34).

La physiopathologie de l'athérosclérose demeure largement incomprise. Cependant, certaines conditions ou habitudes de vie sont connues pour augmenter le risque de développer de l'athérosclérose. Ces facteurs de risque sont classés en deux catégories : les modifiables et les non-modifiables. Ces derniers incluent l'âge, le sexe et la génétique. Les autres facteurs de risque, y compris les dyslipidémies (taux élevés de lipoprotéines de basse densité LDL, triglycérides TG

ou lipoprotéine (a), faible taux de lipoprotéines de haute densité HDL dans le plasma), l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, l'obésité, le tabagisme, la sédentarité, peuvent être contrôlés et l'athérosclérose peut ainsi être retardée ou prévenue (35).

2.2. Physiopathologie

2.2.1. *Dysfonction endothéliale*

L'endothélium vasculaire constitue la surface interne des vaisseaux sanguins. Il est connu pour ses différentes fonctions dans l'hémostase, l'angiogenèse et la migration des leucocytes. Cependant, son rôle majeur réside dans sa capacité à réguler le tonus vasculaire grâce à la libération de substances vasoactives, telles que l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline (substances vasodilatatrices) ainsi que l'endothéline et l'angiotensine II (substances vasoconstrictrices) (36, 37).

Les contraintes de cisaillement au niveau de l'endothélium, créées par le flux sanguin, sont les activateurs clés de la NO synthase endothéliale (eNOS, « *Endothelial nitric oxide synthase* »), responsable de la production du NO. De plus, des molécules de signalisation (acétylcholine, bradykinine, VEGF etc...) peuvent stimuler la production de NO. Celui-ci va diffuser à travers la membrane endothéliale et activer la guanylate cyclase présente dans différents types cellulaires. En effet, son activation aboutit aux effets anticoagulants du NO (inhibition de l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire), à la diminution de l'adhésion des leucocytes et à la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) suite à la déphosphorylation des filaments de myosine (38). Le NO empêche également l'oxydation des LDL qui sont excessivement athérogènes (39).

La dysfonction endothéliale ou activation endothéliale est une étape précoce du développement de l'athérosclérose. Elle est caractérisée par la diminution de substances vasodilatatrices, notamment le NO, entraînant ainsi une altération de la vasodilatation. La diminution des taux de NO découle soit de l'augmentation de sa dégradation par les espèces réactives de l'oxygène (ROS, « *reactive oxygen species* ») soit de la diminution des substrats de la eNOS ou de son activité

enzymatique. La dysfonction endothéliale se manifeste également par une augmentation de l'inflammation, la prolifération des CML, les activités prothrombotiques de l'endothélium et la perméabilité vasculaire favorisant ainsi l'infiltration des LDL et monocytes. Elle résulte d'une augmentation du stress oxydatif due aux facteurs de risque associés à la maladie notamment l'hyperlipidémie, l'HTA, le diabète et le tabagisme (40, 41).

2.2.2. *Infiltration des LDL et recrutement des monocytes*

L'endothélium ainsi activé va favoriser l'accumulation des LDL dans l'intima et va exprimer des molécules d'adhésion à sa surface, telles que les molécules d'adhésion vasculaire de type 1 (VCAM-1), les molécules d'adhésion intercellulaire de type 1 (ICAM-1), les E-sélectines et les P-sélectines qui vont favoriser le recrutement des monocytes. Les cellules endothéliales endommagées vont également sécréter des cytokines (MCP-1 « *monocyte chemoattractant protein 1* ») et chimiokines (CCL2, CXCL10, Interleukine-8 (Il-8)) qui vont contribuer au recrutement des cellules inflammatoires (monocytes, lymphocytes T et B...). Quant aux LDL, une fois dans l'intima, elles sont transformées en LDL oxydées (oxLDL) suite à des modifications enzymatiques ou oxydatives. Les LDL oxydées favorisent l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et peuvent agir en tant que chimioattractants pour les monocytes en circulation. Les monocytes recrutés se différencient en macrophage dans l'intima sous l'effet de facteurs stimulants de colonies de macrophages (M-CSF, « *macrophage colony stimulating factor* »). Ces macrophages ainsi que les CML peuvent internaliser les LDL oxydés à travers des récepteurs éboueurs (CD36, scavenger receptor A...) présents à leurs surfaces. Les macrophages et CML peuvent accumuler les LDL de manière insaturable et finissent par se transformer en cellules spumeuses. Enfin, l'accumulation de ces cellules dans l'intima conduit à la formation des stries lipidiques qui constituent la première étape de la formation de la lésion athérosclérotique (42, 43) **(Figure 5b)**.

Concernant le recrutement des cellules inflammatoires, ceci se fait en différentes étapes bien régulées : capture, roulement, adhésion et transmigration. En effet, les sélectines jouent un rôle important dans la capture et le roulement des leucocytes à la surface endothéliale. Leur adhésion se fait par l'intermédiaire des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales

VCAM-1 et ICAM-1. Les intégrines exprimées à la surface des leucocytes tels que VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) favorisent davantage l'adhésion.

Les L-sélectines sont exprimées à la surface des leucocytes alors que les E-sélectines sont exclusives aux cellules endothéliales. Pour ce qui est des P-sélectines, elles sont surtout présentes dans les α -granules plaquettaires et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, mais une fois activées elles sont mobilisées vers la surface cellulaire (44). La P-sélectine lie son ligand la P-sélectine glycoprotéine 1 (PSGL-1, « *P-selectin glycoprotein ligand-1* »), exprimé par les leucocytes. Les E- et L-sélectines peuvent également lier la PSGL-1, mais avec une affinité plus faible que la P-sélectine. La E-sélectine lie également CD44 et ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) et elle est exprimée seulement en cas d'inflammation. La liaison de PSGL-1 aux sélectines joue un rôle crucial dans la capture et le roulement des monocytes (44, 45). Le roulement sur la E-sélectine est plus lent que celui sur les P- et L-sélectines, freinant ainsi le mouvement des monocytes et les préparant à l'adhésion (46).

Comme mentionné ci-haut, l'accumulation d'oxLDL stimule l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium. La présence de VCAM-1 et ICAM-1 est nécessaire pour l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales. En fait, ces molécules se lient aux intégrines présentes à la surface des monocytes pour induire une adhésion ferme. Ensuite, sous l'influence de certains facteurs (MCP-1, M-CSF...), les monocytes sont capables de traverser la paroi artérielle, se différencier en macrophages, capter les oxLDL et se transformer en cellules spumeuses (47). Grâce à leur récepteurs PRR (« *pattern recognition receptors* »), notamment TLR2 (*Toll-like receptor 2*) et TLR4, les macrophages sont capables d'identifier les oxLDL comme étant des molécules associées aux agents pathogènes (PAMP, « *pathogen-associated molecular pattern* ») ou des molécules associées aux dangers (DAMP, « *danger-associated molecular pattern* »). Par conséquent, ils entraînent la libération de facteurs de croissance (PDGF « *platelet-derived growth factor* ») ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , MCP-1...) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β ...), renforçant davantage la réponse immunitaire et l'infiltration de cellules inflammatoires dans la lésion athérosclérotique (48).

2.2.3. *Progression de la lésion*

En réponse à cette activation, les CML migrent de la média, couche moyenne de la paroi artérielle, vers l'intima et prolifèrent sous l'effet de facteurs de croissance tels que le PDGF. Ce processus contribue à l'épaississement de la lésion. De plus, les CML synthétisent des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) dont le collagène et l'élastine, formant ainsi la chape fibreuse recouvrant le cœur lipidique de la plaque. D'autre part, l'apoptose des cellules spumeuses entraîne la libération de leur contenu lipidique. Ensuite, l'incapacité à éliminer les déchets cellulaires, ou efferocytose défectueuse, aboutit à la formation d'un noyau nécrotique (49) **(Figure 5c)**.

Afin d'éviter l'obstruction des vaisseaux, la paroi artérielle peut se remodeler en effectuant des changements au niveau du nombre de CML, le tonus vasculaire et la MEC. Quand l'obstruction de la lumière vasculaire atteint 75%, la perfusion des tissus en aval sera insuffisante pour répondre à leurs besoins entraînant ainsi des signes et symptômes cliniques relatifs au site où la perfusion est compromise (ex. une sténose coronaire peut entraîner une angine de poitrine ; une claudication intermittente quand les membres inférieurs ne sont pas bien perfusés). Ces manifestations cliniques peuvent être plus ou moins catastrophiques selon la nature de la plaque. Une plaque stable est caractérisée par plus de collagène, moins d'inflammation et peut subir des calcifications ou minéralisations. Contrairement à une plaque stable, une plaque instable est caractérisée par une exacerbation de l'inflammation et une chape fibreuse plus mince la rendant plus vulnérable à la rupture. Suite à la rupture, le cœur lipidique de la plaque entre en contact avec le sang activant la cascade de coagulation et d'agrégation plaquettaire, aboutissant ainsi à la formation de thrombus **(Figure 5d)**. La présence de ce thrombus dans la lumière vasculaire pourrait entraîner des conséquences ischémiques graves menant à la mort subite (43).

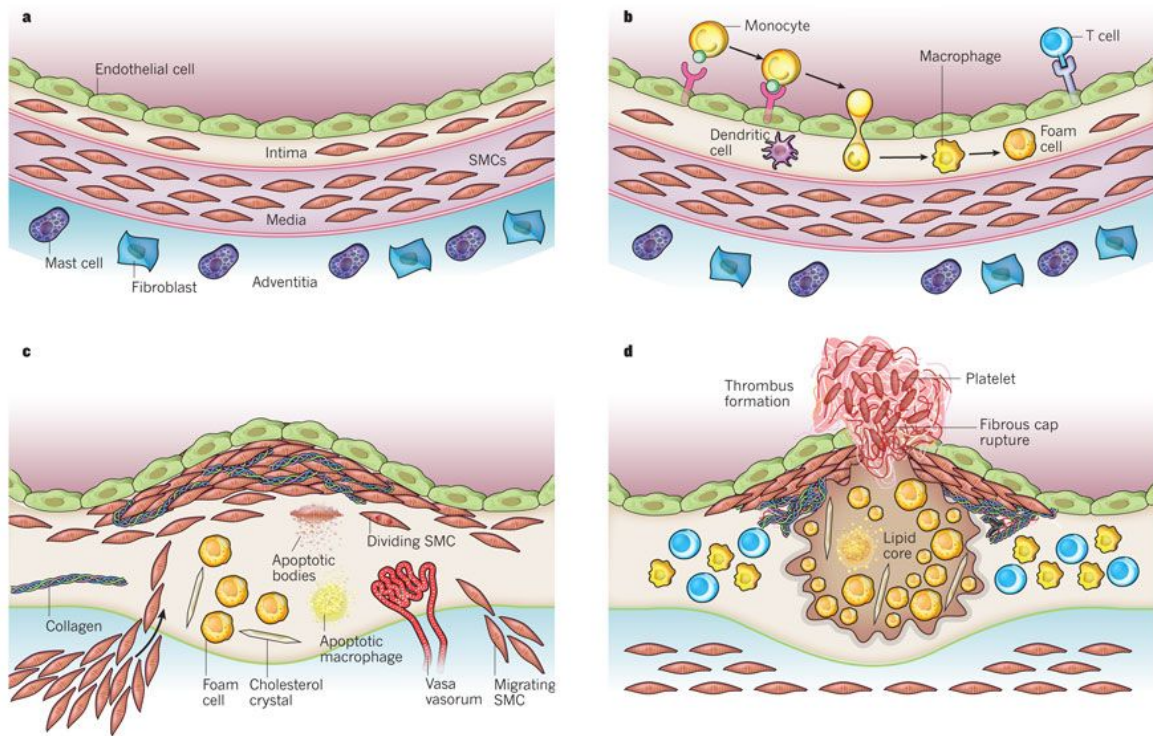


Figure 5. Physiopathologie de l'athérosclérose.

a) L'artère normale est composée de 3 couches : l'intima tapissée par l'endothélium, la média et l'adventice (de l'intérieur du vaisseau vers l'extérieur). b) La première étape de l'athérosclérose est caractérisée par une dysfonction endothéliale, l'infiltration de l'intima par les monocytes, la différenciation en macrophages et l'accumulation de lipides conduisant à la formation de cellules spumeuses. c) Les CML migrent de la média vers l'intima, prolifèrent et synthétisent des molécules de la MEC (collagène, élastine) formant ainsi la chape fibreuse recouvrant le cœur lipidique de la plaque. L'apoptose des cellules spumeuses et la libération de leur contenu lipidique aboutit à la formation d'un noyau nécrotique. d) La rupture de la chape fibreuse met le cœur lipidique de la plaque en contact avec le sang activant la cascade de coagulation et d'agrégation plaquettaire, aboutissant ainsi à la formation de thrombi. Adaptée de (49).

2.3. Traitements

Le traitement de l'athérosclérose est surtout basé sur la prise en charge des facteurs de risque tels que l'augmentation de l'activité physique, une alimentation saine et équilibrée, l'arrêt du tabagisme etc... Dans certains cas, le changement du mode de vie seulement est insuffisant et d'autres thérapies s'avèrent nécessaires, particulièrement la prise de médicaments ou des chirurgies (angioplastie, pontage coronarien...). Le traitement médicamenteux vise à moduler les deux composantes importantes dans l'athérosclérose, les lipides et l'inflammation (34).

2.3.1. *Thérapies ciblant les lipides*

2.3.1.1. *Statines*

En inhibant une étape clé dans la voie de synthèse des stérols, les statines sont des médicaments très efficaces pour abaisser le taux de cholestérol. En effet, l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol est la conversion de l'HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryle-CoA) en acide mévalonique par l'HMG-CoA réductase. En inhibant de façon compétitive l'HMG-CoA réductase, les statines induisent l'activation du facteur de transcription SREBP2 (voir le mécanisme à la section 1.3.2.3.), entraînent l'augmentation de l'expression du LDLR au niveau du foie et la diminution des taux plasmatiques de LDL-C de 20 à 60%, dépendamment de la puissance de la statine, et d'autres lipoprotéines contenant l'apoB, y compris les lipoprotéines riches en triglycérides. Outre leur effet principal sur le taux de LDL-C, les statines sont capables de réduire le taux de TG de 10 à 20 % et d'augmenter de façon modeste l'HDL-C de 1 à 10% (50). De plus, plusieurs études à grande échelle ont démontré que les statines réduisent considérablement la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (CV) d'environ 30% dans le cadre d'une prévention primaire, quel que soit l'âge ou le sexe (51-55). Elles peuvent également entraîner la régression des plaques d'athérome (56). Enfin, les statines présentent des effets cardioprotecteurs indépendamment de leur impact sur le métabolisme lipidique. Il s'agit de leurs effets pléiotropes anti-inflammatoires, antioxydants, anti-thrombotiques et l'amélioration de la fonction endothéliale entraînant une plus grande stabilité des plaques (57) **(Figure 6)**.

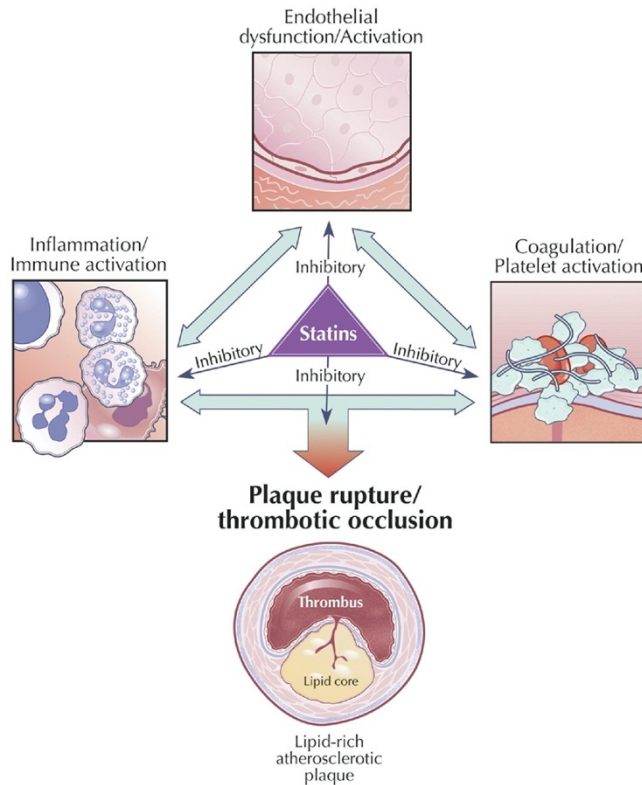


Figure 6. Effets pléiotropes des statines sur les plaques athéromateuses.

Outre la diminution du LDL-C, les statines ont des effets pléiotropes anti-inflammatoires, antioxydants, anti-thrombotiques et l'amélioration de la fonction endothéliale entraînant une plus grande stabilité des plaques. Adaptée de (57) avec l'autorisation de Elsevier.

2.3.1.2. Inhibiteurs de PCSK9

Les anticorps inhibiteurs de PCSK9, evolocumab (Repatha®) et alirocumab (Praluent®) administrés par injection sous-cutanée, lient le domaine catalytique de PCSK9 en circulation, bloquent sa liaison avec le LDLR et réduisent sa dégradation dans les lysosomes, ce qui augmente l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes et diminue les taux plasmatiques de LDL-C. Les études avec les anticorps monoclonaux anti-PCSK9 en association avec une statine, ont montré une réduction des taux de LDL-C jusqu'à 60% comparé au groupe traité par un placebo avec une statine (58, 59). Dans les études FOURIER et ODYSSEY OUTCOMES, l'association d'un de ces anticorps avec une statine a abouti à la réduction additionnelle d'environ 15 à 20% du risque de survenue d'un nouvel événement CV et de 15% du risque de complications CV, par rapport aux statines seules (60, 61). De plus, l'étude GLAGOV a démontré une régression du volume de la plaque plus importante chez les patients traités avec l'association d'evolocumab et statines que

les statines seules (62). Malgré leurs bénéfices cliniques, leur usage reste assez restreint du fait de leurs coûts élevés (63).

L'inclisiran, un petit ARN interférant (siRNA) ciblant PCSK9, réduit la synthèse hépatique de PCSK9. Les études de phase III, ORION-10 et ORION-11, ont montré une réduction du taux de LDL-C de plus que 50% par rapport au placebo, chez les patients recevant une injection sous-cutanée d'inclisiran tous les 6 mois sur une période totale de 18 mois. À noter que ces patients recevaient des statines à la dose maximale tolérée. L'effet sur la prévention des événements CV est en cours d'évaluation dans l'étude ORION-4. Cependant, les résultats préliminaires montrent une réduction de la survenue des événements CV dans le groupe recevant l'inclisiran comparé au placebo (64).

2.3.1.3. *Inhibiteurs de l'absorption du cholestérol*

L'ézétimibe inhibe l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire et biliaire sans affecter l'absorption des nutriments liposolubles. Cette inhibition se fait au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, par interaction avec la protéine NPC1L1 et permet une réduction de la quantité de cholestérol délivrée au foie. Par conséquent, le foie réagit en augmentant l'expression du LDLR, ce qui entraîne une augmentation de la clairance du LDL-C plasmatique. Les études cliniques montrent une réduction du LDL-C de 15 à 22% suite à la prise d'ézétimibe et une réduction supplémentaire de 15 à 20% chez des sujets déjà traités par une statine (50). L'étude clinique IMPROVE-IT rapporte une réduction d'environ 6% des événements CV à la prise d'ézétimibe avec une statine, par rapport aux statines seules (65). De plus, l'étude PRECISE-IVUS a montré qu'un pourcentage plus élevé de patients traités avec la bithérapie (78%) présentait une régression des plaques par rapport aux sujets traités avec des statines seules (58%) (66).

2.3.1.4. *Fibrates*

Les fibrates sont des agonistes du « *peroxisome proliferator-activated receptor- α* » (PPAR- α), membre de la famille des récepteurs nucléaires. Une fois activé, ce récepteur régule l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ceci entraîne plusieurs conséquences sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines dont l'activation de la bêta-oxydation des acides gras, la stimulation de la synthèse de la LPL et l'inhibition de la transcription de l'ApoC-III, connue pour

inhiber la LPL (67). Les fibrates sont très efficaces pour réduire le taux des TG à jeun ainsi que les TG postprandiaux et les particules résiduelles riches en TG. Cependant, leur efficacité globale sur le risque de MCV est beaucoup moins robuste jusqu'à présent que celle des statines (50).

2.3.2. *Thérapies anti-inflammatoires*

2.3.2.1. *Anticorps dirigés contre l'interleukine 1 β (IL-1 β)*

L'IL-1 β est sécrétée dans le plasma par les cellules endothéliales, les monocytes et macrophages et joue un rôle important dans l'athérosclérose. En effet, elle favorise l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales, la prolifération des CML ainsi que la production d'autres cytokines (IL-6, TNF- α) (68). Le canakinumab (Ilaris®) est un anticorps monoclonal contre l'IL-1 β . L'inhibition de l'IL-1 β entraîne une baisse des taux d'IL-6 et de la protéine C-réactive (CRP), sans affecter le taux de lipides (69). L'étude CANTOS a montré que cet anticorps réduit de 15% la récurrence d'évènements cardiovasculaires dans le cadre d'une prévention secondaire (70).

2.3.2.2. *Colchicine*

La colchicine est l'une des plus anciennes molécules thérapeutiques découvertes. Son mécanisme d'action consiste à inhiber la formation de microtubules, l'activité de l'inflammasome NLRP3 « *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* », diminuer l'adhésion aux cellules endothéliales et la production de cytokines. Elle est connue surtout pour son usage dans le traitement de la goutte, la maladie de Behçet et la fièvre méditerranéenne familiale (FMF) (71). L'étude préliminaire LoDoCo a démontré une réduction des évènements cardiovasculaires récurrents chez les patients traités par l'association de statine et de colchicine (72). Les résultats de l'étude COLCOT concordent avec ceux obtenus dans l'étude LoDoCo. En effet, il y a réduction de 23% de la survenue d'évènements cardiovasculaires ischémiques suite à un infarctus du myocarde récent chez les patients traités par une dose journalière de 0.5 mg de colchicine (73).

3. **Hypercholestérolémie familiale**

Les dyslipidémies couvrent un large spectre d'anomalies lipidiques. Elles sont caractérisées par des variations des taux plasmatiques de lipoprotéines et englobent les hyperlipidémies et les hypolipidémies. Les dyslipidémies peuvent être secondaires à une condition sous-jacente ou

iatrogènes et/ou primaires résultant de l'interaction entre une prédisposition génétique et les facteurs environnementaux.

En 1967, les travaux de Dr. Fredrickson ont conduit à la classification des hyperlipidémies qui fut par la suite admise par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1970 (74) et adoptée pendant longtemps. Cependant, cette dernière ne comporte pas les hypolipidémies d'où la nécessité de développer une classification beaucoup plus exhaustive.

3.1. Définition et présentation clinique

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est une pathologie essentiellement monogénique à transmission autosomique dominante, associée à une élévation importante des niveaux de LDL plasmatiques. La prévalence mondiale est estimée à environ 1/200 à 1/300 pour les formes hétérozygotes et de 1/250 000 pour les homozygotes qui constituent les formes les plus sévères (75). L'excès de cholestérol conduit à la formation des plaques d'athérome et donc à l'augmentation du risque CV. De plus, l'accumulation du cholestérol provoque la formation de xanthomes, xanthélasmas et des arcs cornéens (76). La forme hétérozygote (HeFH) doit être suspectée chez les adultes non traités ayant des concentrations de LDL-C supérieures à 4-5 mmol/L (155-190 mg/dl) tandis que la forme homozygote (HoFH) est suspectée lorsque les taux de LDL-C sont supérieurs à 13 mmol/L (500 mg/dl) (77). Environ 70-95% des cas de FH sont causés par des mutations au niveau de trois gènes : *LDLR*, *APOB* et *PCSK9* (78). La sévérité de la présentation clinique dépend du type de mutation. Par exemple, les patients ayant des mutations dans *LDLR* ont un phénotype plus sévère que les porteurs de mutations dans *APOB* (76).

Une forme autosomique récessive de FH causée par des mutations de perte de fonction dans le gène *LDLRAP1* a également été documentée (79). Ce gène code pour *LDL receptor adapter protein 1* (également connu sous le nom de ARH), une protéine adaptatrice requise pour l'internalisation du récepteur des LDL par les hépatocytes (80). De plus, des mutations dans le gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*) (81) et celui du *STAP1* (*signal transducing adaptor family member 1*) (82) ont été signalées. L'apoE se trouve sur les lipoprotéines riches en TG et elle intervient dans leur catabolisme alors que la fonction de *STAP1* dans l'homéostasie du cholestérol demeure inconnue (76). Certains sujets sont des hétérozygotes composites ou doubles hétérozygotes, porteurs de plus qu'une mutation dans les gènes mentionnés ci-dessus, conduisant

habituellement à un phénotype intermédiaire entre hétérozygote et homozygote (83). Il existe des patients ayant une HF sans être porteurs de variations génétiques dans les gènes connus pour être impliqués dans la maladie, suggérant ainsi qu'il reste d'autres gènes causant l'HF à découvrir ou que la maladie peut être de nature polygénique (76, 84).

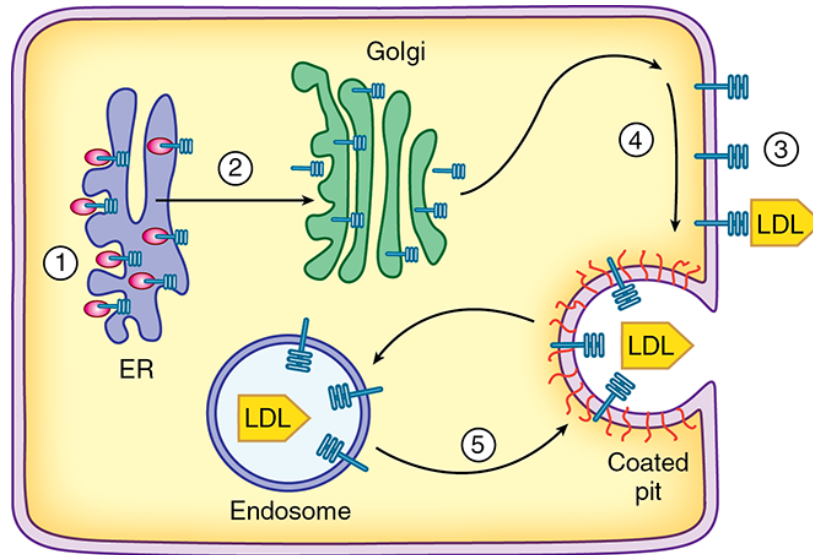
3.2. Les principales mutations

3.2.1. *LDLR*

L'HF est causée par une mutation dans le gène codant pour le récepteur des LDL dans plus de 90% des cas diagnostiqués et localisé en 19q13.2 (85). Les travaux de Brown et Goldstein ont permis la caractérisation du LDLR ainsi que les mutations dans ce gène impliquées dans l'hypercholestérolémie familiale (86). Le récepteur des LDL joue un rôle essentiel dans la régulation des taux plasmatiques de LDL-C en participant à la clairance des particules de LDL. Les mutations du LDLR conduisent à la synthèse d'un récepteur ayant une activité complètement ou partiellement défectueuse à la surface des hépatocytes. En conséquence, l'internalisation des LDL diminue, ce qui entraîne une augmentation des taux plasmatiques de LDL-C (85). Le gène *LDLR* est situé sur le bras court du chromosome 19 au locus 19p13.2, et à ce jour, plus de 2000 mutations du gène *LDLR* ont été décrites (76, 87). Les mutations dans *LDLR*, modifiant la fonction de la protéine encodée, sont classées en cinq grandes classes selon leurs conséquences sur le transport du récepteur dans la voie de sécrétion ou dans la voie d'endocytose (**Tableau 2 et Figure 7**). Les mutations de classe 1 sont des mutations nulles qui n'entraînent aucune protéine LDLR détectable. Dans les mutations de classe 2, le transport du LDLR du RE vers l'appareil de Golgi est complètement (classe 2a) ou partiellement (classe 2b) bloqué. Une mutation de classe 3 conduit à l'expression d'un LDLR non fonctionnel. Les mutations de classe 4 entraînent une liaison à des LDL, mais les complexes LDLR-LDL ne peuvent pas être internalisés et, dans les mutations de classe 5, le recyclage du LDLR n'est pas efficace et donc le LDLR est rapidement dégradé dans les lysosomes (88).

Tableau 2. Les 5 classes de mutations dans LDLR.

Classe 1	Classe 2		Classe 3	Classe 4	Classe 5
Mutations nulles qui n'entraînent aucun récepteur des LDL détectable	2a Le transport du récepteur des LDL du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi est complètement bloqué	2b Le transport du récepteur des LDL du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi est partiellement bloqué	Expression d'un récepteur des LDL non fonctionnel	Formation de complexes LDLR-LDL mais qui ne peuvent pas être internalisés	Le recyclage du LDLR n'est pas efficace et donc le LDLR est rapidement dégradé



Mutation class	Synthesis	Transport	Binding	Clustering	Recycling
①	→X				
②		→X			
③			→X		
④				→X	
⑤					→X

Source: D. Valle, S. Antonarakis, A. Ballabio, A. Beaudet, G.A. Mitchell. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Figure 7. Les cinq mutations fonctionnelles du récepteur des LDL. Adaptée de (89) avec l'autorisation de Annual Reviews, Inc.
ER : Endoplasmic Reticulum (Réticulum Endoplasmique).

3.2.2. APOB

Le gène *APOB* est localisé en 2p24.1 et code pour l'apolipoprotéine B 100 (apoB100), constituant des VLDL et seule protéine à la surface des LDL. Suite à sa liaison au LDLR, les particules de LDL sont internalisées et hydrolysées, entraînant la diminution de LDL-C dans le plasma (3). En 1986, Vega et Grundy ont montré que certains patients présentent une réduction dans la clairance du LDL-C et ont suggéré que ceci peut être due à un défaut de structure ou de composition des particules de LDL (90). Cependant ce n'est qu'en 1987 qu'Innerarity *et al.* ont confirmé l'hypothèse et ont permis d'établir qu'une apoB100 génétiquement altérée conduit à une liaison

défectueuse au LDLR. Ces résultats ont permis de faire référence à cette maladie comme étant une *familial defective apoB-100* (FDB) (91).

Les patients atteints de FDB ont des taux de LDL-C inférieurs de 20% à 25% par rapport aux porteurs de mutation au niveau du *LDLR*. De plus, la présentation de la maladie est moins sévère, les sujets atteints répondent mieux aux statines et présentent un risque plus faible de maladies coronariennes (76, 92).

3.2.3. *PCSK9*

Le gène *PCSK9* est localisé sur le bras court du chromosome 1 en 1p32.3. Il code pour la sérine protéase *PCSK9* impliquée dans la régulation de la dégradation du récepteur des LDL dans le lysosome de la cellule, ce qui l'empêche d'être recyclé vers la surface cellulaire (76). Comme mentionné dans la section 2.3.2.3, la liaison de *PCSK9* au récepteur des LDL forme un complexe qui sera internalisé. Une fois dans la cellule, le complexe est acheminé vers les lysosomes et le *LDLR* sera dégradé.

En 2003, des mutations gain de fonction dans ce gène ont été identifiées par Abi Fadel *et al.* (93) comme étant impliqué dans l'HF. Les porteurs de ces mutations présentent une augmentation des taux de LDL-C circulants à cause d'une augmentation de la dégradation des *LDLR* entraînant une réduction du nombre de récepteurs disponibles à la surface des hépatocytes (88).

Au contraire, les mutations pertes de fonction de *PCSK9* sont associées à des niveaux bas de LDL-C avec un risque de MCV nettement réduit. En effet, l'étude de Cohen *et al.* a montré que les sujets d'origine africaine, porteurs de mutations non-sens dans *PCSK9* 426C→G (Y142X) et 2037C→A (C679X), présentent une réduction de 28% des niveaux de LDL-C et de 88% du risque de MCV. La variation dans *PCSK9* 137G→T (R46L) chez les sujets caucasiens entraîne une diminution de 15% des taux de LDL-C avec une réduction de 47% de l'incidence de MCV (94). Ces résultats montrent l'importance de diminuer les niveaux de *PCSK9* afin de réduire le risque de survenue de MCV.

3.2.4. *Quatrième locus*

En 2010, Marques-Pinheiro *et al.* ont découvert un nouveau locus associé à l'HF, nommé *HCHOLA4* et situé sur le chromosome 16q22.1. En effet, une étude génomique a été réalisée chez

une large famille française atteinte d'HF dans laquelle des mutations dans *LDLR*, *APOB* et *PCSK9* avaient été exclues. De plus, sur 18 familles étudiées, le lien avec ce locus n'a pas été exclu chez 6 d'entre-elles. L'équipe a séquencé 57 gènes des 154 localisés dans cette région, mais n'ont pas réussi à trouver le gène causal (95). Le gène codant pour GLG1, une nouvelle protéine d'interaction avec PCSK9 qui a été identifiée dans notre laboratoire, est situé au niveau de ce locus, d'où l'intérêt de déterminer son rôle dans la régulation du cholestérol et le développement de l'athérosclérose.

4. Golgi glycoprotéine 1 (GLG1)

4.1. Structure et distribution

Dans le génome humain, le gène *GLG1* a été cartographié à 16q22-q23 (96) et code pour la Golgi glycoprotéine 1 (GLG1), connue également sous le nom de *E-selectin ligand 1* (ESL-1) (97), *MG-160* (98), *cysteine-rich fibroblast growth factor receptor* (CFR) (99) et *latent transforming growth factor- β complex protein 1* (LTCP-1) (100) selon l'espèce où il a été identifié. Par exemple, CFR est d'origine aviaire alors que la ESL-1 est murine. Chez la souris, le gène *Glg1* est localisé sur le chromosome 8 dans une région semblable à celle du chromosome 16q humain (101).

GLG1 est une protéine transmembranaire de type 1 ce qui veut dire qu'elle traverse une fois la membrane cellulaire. C'est une protéine de 160 kDa formée de 1179 acides aminés (aa) chez l'homme et 1175 aa chez la souris (102). Sa séquence protéique est conservée dans plusieurs espèces (103) et comporte un peptide signal de 29 aa, une partie N-terminale extracellulaire de 1116 aa, un domaine transmembranaire de 21 aa et une partie C-terminale intracellulaire de 13 aa chez l'humain (**Figure 8**). Son domaine extracellulaire est large et comprend 16 répétitions riches en cystéine ainsi que 5 sites de glycosylation (99).

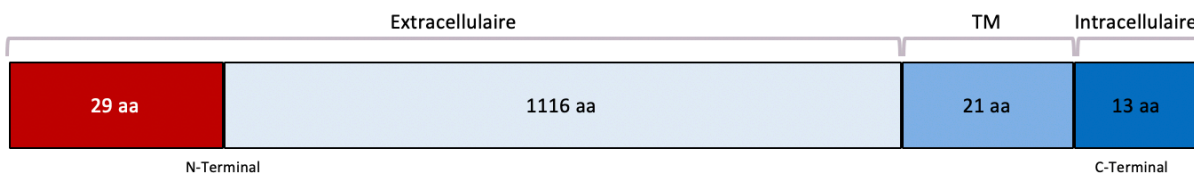


Figure 8. Structure de GLG1.

TM: transmembrane

Il existe 3 isoformes de GLG1 chez l'humain : l'isoforme 3 de 1179 aa, l'isoforme 1 de 1203 aa (extension de 24 aa en C-terminal) et l'isoforme 2 de 1192 aa (extension de 24 aa en C-terminal + les aa 147-157 manquants) (102).

Au niveau cellulaire, GLG1 est localisée dans l'appareil de Golgi et au niveau des microvillosités présentes à la surface des cellules (104). C'est une protéine ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus à différents niveaux (**Figure 9**).

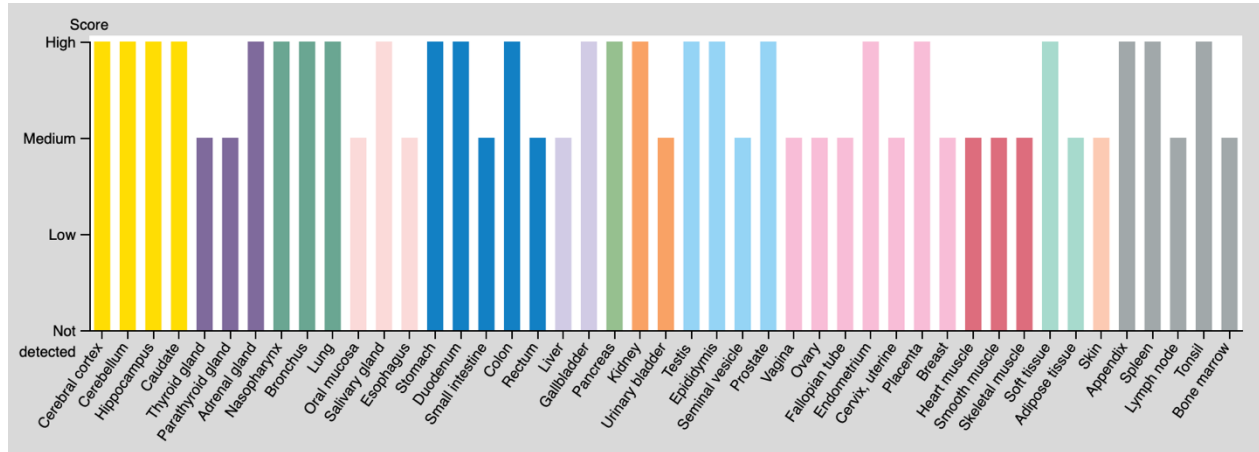


Figure 9. Expression protéique de GLG1. Adaptée de (105).

4.2. Rôles de GLG1

Les fonctions de GLG1 sont très peu connues. En effet, il existe seulement une vingtaine d'articles sur ce sujet dans la littérature. Cependant, l'interaction de GLG1 (ESL-1) avec son récepteur E-sélectine reste la mieux étudiée.

4.2.1. Roulement des leucocytes

Plusieurs études ont montré que ESL-1 est un ligand pour la E-sélectine (97, 106, 107), qui se trouve à la surface des cellules endothéliales activées (45). Pour interagir avec la E-sélectine, ESL-1 doit subir une $\alpha(1,3)$ -fucosylation (ajout d'un fucose) en N-terminal (106). En 2007, une étude a montré que PSGL-1, CD44 et ESL-1 coopèrent ensemble pour réguler la capture et le roulement des leucocytes. Ainsi, dans des cellules hématopoïétiques de souris, les chercheurs ont provoqué une diminution de l'expression de *Glg1* à l'aide de lentivirus véhiculant un *short hairpin RNA* (shRNA) ciblant *Glg1*. Ensuite, les cellules obtenues ont été injectées chez des souris irradiées *Selp1g^{-/-}* (déficiente en PSGL1), *Cd44^{-/-}* (déficiente en CD44) ou les 2 ensembles *Selp1g^{-/-} Cd44^{-/-}*

(déficiente en PSGL-1 et CD44). Les résultats de l'étude montrent que chez les souris *Selplg^{-/-}*, l'adhésion des leucocytes à l'E-sélectine est complètement abolie suggérant la participation des 2 glycoprotéines, ESL-1 et PSGL-1, dans cette étape. De plus, la vitesse de roulement des leucocytes ESL-1 et PSGL-1 déficients est augmentée. Ceci est également observé chez les souris ESL-1 et CD44 déficients suggérant que ces 3 protéines sont nécessaires pour réguler la vélocité du roulement. Le nombre de leucocytes qui réussissent à adhérer est réduit chez les 3 groupes. Cependant, l'efficacité d'adhésion (nombre de leucocytes roulants/nombre de leucocytes adhérents) est seulement réduite chez les souris déficientes en ESL-1 et CD44. Pour conclure, ces résultats montrent que ESL-1 agit comme médiateur entre PSGL-1 et CD44. PSGL-1 semble intervenir dans la capture des leucocytes alors que ESL-1 et CD44 dans le contrôle de la vitesse de roulement (**Figure 10**) (108).

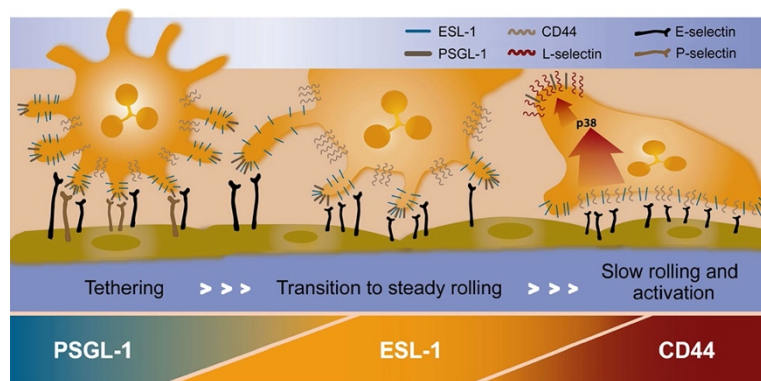


Figure 10. Rôle de PSGL-1, ESL-1 et CD44 dans la capture et le roulement des leucocytes.

PSGL-1, ESL-1 et CD44 coopèrent ensemble pour réguler le roulement des monocytes. La PSGL-1 assure la capture des leucocytes, ESL-1 est essentielle pour la conversion du roulement rapide en plus lent et régulier et le CD44 ralentit davantage le roulement et active les leucocytes. Adaptée de (108).

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1; ESL-1 : E-selectin ligand 1

De plus, l'interaction entre E-sélectine et ses ligands exprimant l'antigène sialyl Lewis x ou A (SLe^x, SLe^A) après fucosylation, a été impliquée dans les métastases. Un article récent a montré que la diminution de l'expression de Glg1 chez la souris entraîne une réduction des métastases osseuses. En outre, les patients ayant des taux de GLG1 et de fucosyltransférases FUT-3 ou 6 (enzyme de fucosylation) plus élevés avaient un mauvais pronostic pour les récives (109).

4.2.2. Développement squelettique

Miyaoka *et al.* ont montré que 90% des souris *Glg1*^{-/-} meurent en moins de 2 jours après leur naissance et présentent un retard de croissance, une queue tordue et une fente palatine (**Figure 11**). De plus, ils ont démontré que GLG1 interagit avec Fgf18 (*fibroblast growth factor 18*) et régule positivement sa signalisation *via* Fgfr3c, favorisant ainsi le bon développement squelettique. Cependant, cette interaction est bloquée en présence de Dlk qui joue également un rôle dans le développement. À noter que les souris *Glg1*^{-/-} possèdent le même phénotype que les souris *Fgf18*^{-/-} et *Dlk*^{-/-} (110).

Yang *et al.* ont découvert que les souris *Glg1*^{-/-} présentent un retard de croissance et de la maturation du squelette (dysplasie squelettique). En effet, ces souris sont plus petites et leurs os sont plus courts et plus minces. Par ailleurs, l'absence de GLG1 entraîne une augmentation de la maturation de TGF- β (*transforming growth factor beta*) et de la signalisation TGF- β /SMAD ce qui provoque une réduction de la prolifération des chondrocytes (cellules composants les cartilages) au niveau des plaques de croissance (111).

Dans une étude différente, ces chercheurs ont montré que GLG1 joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie osseuse en agissant également sur la maturation de TGF- β . En effet, les souris *Glg1*^{-/-} présentent une ostéopénie importante avec une augmentation de la résorption osseuse et une diminution de la minéralisation suite à l'augmentation de la maturation de TGF- β en absence de GLG1 (112). Cela dit, il est désormais établi que GLG1 est impliquée dans la régulation du remodelage osseux et la différenciation des chondrocytes (111, 112).

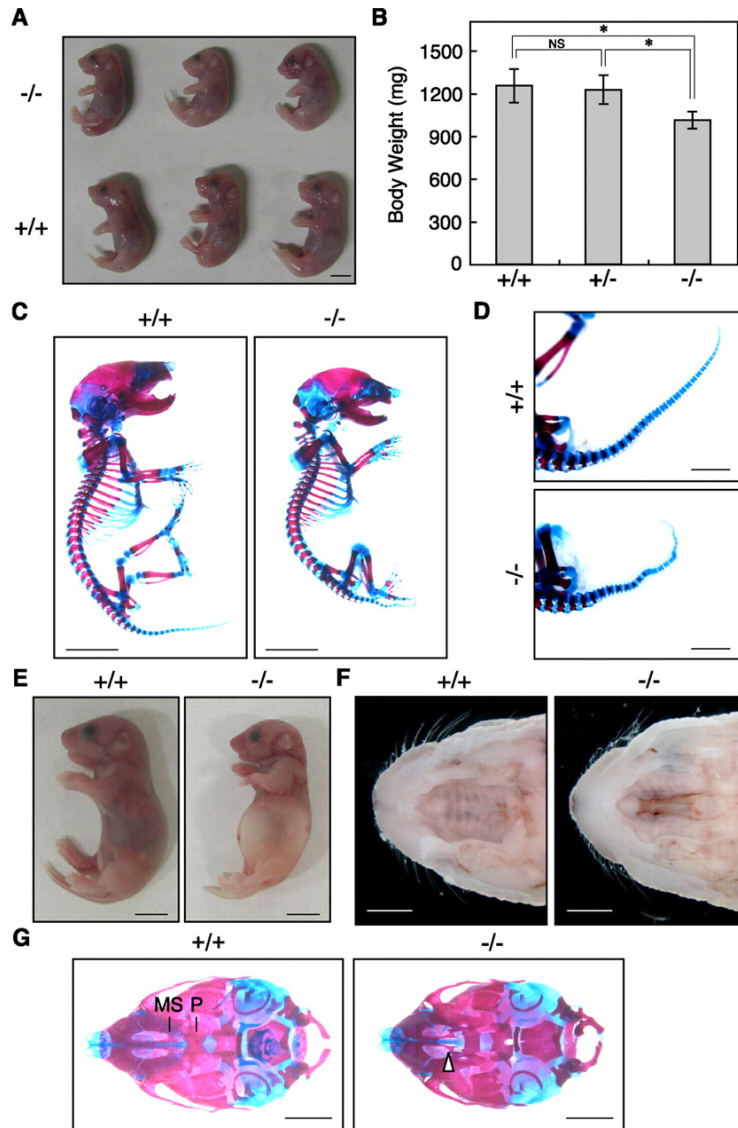


Figure 11. Phénotypes des souris *Glg1*^{-/-}.

Les embryons de souris *Glg1*^{-/-} sont plus petits (A) et pèsent moins (B). Le squelette des nouveau-nés est complet (C) mais leurs queues sont tordues (D). Certaines souris présentent une fente palatine (F) à l'origine d'une distension abdominale (E). De plus, la fusion des maxillaires est incomplète dans 23% des cas (G). Adaptée de (110) avec l'autorisation de The Company of Biologists Ltd.

4.2.3. Hématopoïèse

Dans la moelle osseuse, ESL-1 maintient la prolifération des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) en réduisant la production de TGF- β par ces cellules, d'où son rôle important dans l'homéostasie hématopoïétique. Effectivement, les souris *Glg1*^{-/-} présentent une

augmentation de la production de TGF- β par les HSPC entraînant une quiescence aberrante et donc un nombre élevé de cellules immatures dans la moelle osseuse (113).

4.2.4. Athérosclérose

Principalement à cause de son rôle sur la migration des monocytes, des chercheurs ont étudié l'effet de la diminution de l'expression de Glg1 sur les plaques d'athérosclérose. Des souris *ApoE*^{-/-}, modèle répandu dans les études d'athérosclérose, ont été croisées avec des souris *Glg1*^{+/-} obtenues par la stratégie de piégeage de gènes dans des cellules souches embryonnaires injectées chez des souris C57BL/6. Les résultats n'ont pas montré de différence dans la taille des lésions au niveau de l'aorte et du sinus aortique. Cependant, des différences dans la composition des plaques ont été observées. En effet, les lésions des souris *ApoE*^{-/-} *Glg1*^{+/-} présentaient plus de collagène et moins de macrophages au niveau du sinus aortique (114).

De plus, Yamamoto *et al.* ont trouvé une interaction entre GLG1 et l'adiponectine (APN). Celle-ci est connue pour ses propriétés anti-diabétiques et anti-athérogènes. Les mécanismes par lesquelles l'APN produit son effet anti-athérogène sont très peu connus. Cependant, certaines études *in vitro* ont démontré qu'elle inhibe plusieurs étapes dans l'athérosclérose telles que l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et la prolifération des CML. L'effet anti-athérogène de l'APN avec GLG1 empêche sa liaison à son récepteur l'E-sélectine, une étape clé dans l'athérosclérose (115). Comme mentionné dans la section 4.2.1, ce processus est nécessaire pour le roulement des leucocytes à une vitesse plus faible sur les cellules endothéliales.

4.2.5. Métabolisme des lipides

Dans l'objectif de trouver de nouvelles protéines qui interagissent avec PCSK9, notre laboratoire a découvert que GLG1 interagit non seulement avec PCSK9, mais également avec apoB et LDLR (Samami *et al.*, en préparation) (**Figure 12A**). Ainsi, la fonction de GLG1 dans le métabolisme des lipides a été étudiée étant donné son interaction avec ces 3 protéines clés dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Pour cela, des souris C57BL/6 ont été injectées avec un virus adéno-associé de type 8 (AAV8) véhiculant soit un shARN (*short hairpin RNA*) ciblant GLG1 (shGLG1) soit un shARN-contrôle (shScramble). Les résultats de l'étude ont montré que la diminution de l'expression (*knockdown*) de GLG1 entraîne une diminution de l'apoB, LDLR et PCSK9 dans le foie des souris (**Figure 12B**). De plus, les souris shGLG1 présentaient des taux réduits de LDL-C, HDL-C (**Figure 12C**) et moins de TG sécrétés dans le plasma avec une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques (**Figure 12D**) et TG dans le foie. Ces expériences ont été également réalisées *in vitro* dans des cellules hépatiques humaines, Huh7, qui ont été transfectées avec des siRNA ciblant GLG1, afin de réduire son expression. Comme dans les souris shGLG1, la diminution de l'expression de GLG1 dans les Huh7 entraîne une réduction de l'apoB, LDLR et PCSK9 (**Figure 12B**). Cependant, contrairement à la diminution de l'apoB dans le milieu des Huh7, l'étude avec les souris a montré une accumulation de l'apoB dans le plasma. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la diminution de GLG1 dans le foie entraîne une réduction du LDLR (**Figure 12E**), qui est responsable de la clairance de l'apoB (Samami *et al.*, en préparation).

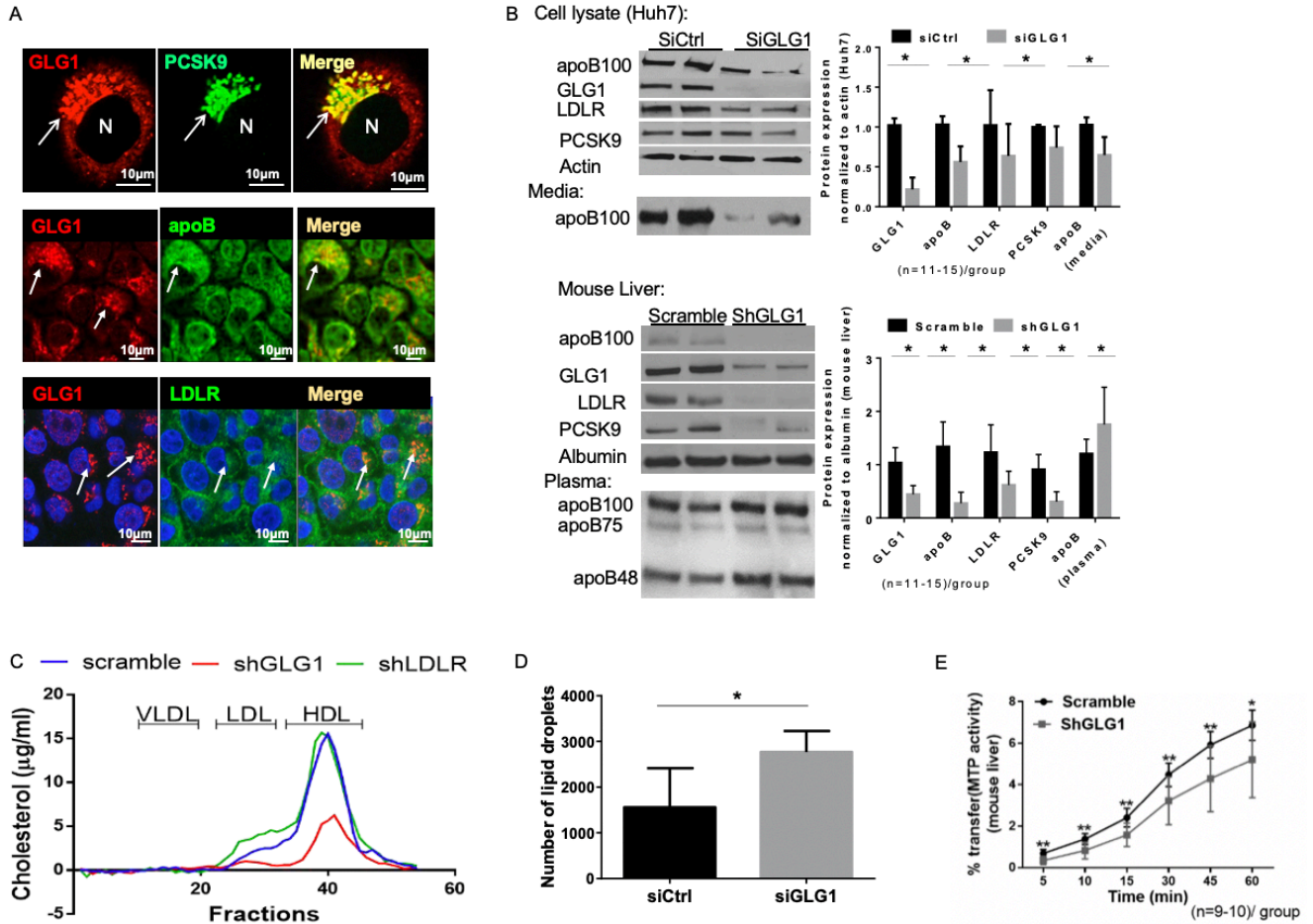


Figure 12. Effet de GLG1 sur le métabolisme des lipides.

(A) Microscopie confocale en fluorescence de GLG1 endogène avec PCSK9 surexprimé, apoB et LDLR dans les cellules Huh7. Les flèches pointent vers des régions de co-localisation partielle. Barre d'échelle : 10 μm . **(B)** Immunobuvardage et analyses densitométriques de GLG1, apoB100, PCSK9 dans les cellules Huh7 ainsi que l'apoB100 dans le milieu leur milieu, 72h post-transfection avec un siRNA ciblant GLG1 (siGLG1) ou le contrôle (siCtrl) (panneau supérieur). Les mêmes analyses ont été réalisées sur les foies de souris shGLG1 et leur contrôle (scramble) avec l'analyse de l'apoB dans le plasma de souris (panneau inférieur). **(C)** Le cholestérol présent dans les fractions de lipoprotéines du plasma, provenant de chaque groupe de souris (avec ou sans *knockdown* GLG1), a été mesuré par voie enzymatique. Les échantillons de plasma regroupés ont été fractionnés par chromatographie de filtration sur gel en utilisant une colonne Superose 6. **(D)** Quantification du nombre de gouttelettes lipidiques dans chaque groupe de cellules Huh7 transfectées. **(E)** Activité enzymatique de la MTP mesurée dans les tissus hépatiques de souris scramble et shGLG1 (Samami *et al.*, en préparation).

Par la suite, le mécanisme de régulation de l'apoB par GLG1 a été caractérisé dans les cellules Huh7. Les résultats ont montré qu'en absence de GLG1, il y avait une augmentation de marqueurs de l'autophagie et une diminution de l'apoB. Ainsi, le *knockdown* de GLG1 induirait la dégradation de l'apoB dans les autophagosomes. Pour le confirmer, des cellules Huh7 ont été traitées avec la 3-méthyladénine (3-MA), qui est un inhibiteur de la formation des autophagosomes. En présence du 3-MA, la dégradation de l'apoB était diminuée. De plus, les cellules transfectées avec le siGLG1 expriment davantage la protéine p62 (capable de se lier aux protéines ubiquitinylées et favoriser leur dégradation) qui co-localise avec l'apoB. L'hypothèse privilégiée est qu'en absence de GLG1, l'apoB non lipidée finit par s'agréger et sera par la suite dégradée par autophagie (**Figure 13**). En conclusion, l'interaction entre GLG1 et apoB est nécessaire pour la sécrétion de l'apoB et l'homéostasie du cholestérol (Samami *et al.*, en préparation). Cependant, le rôle des interactions entre GLG1-PCSK9 et GLG1-LDLR reste à être élucidé.

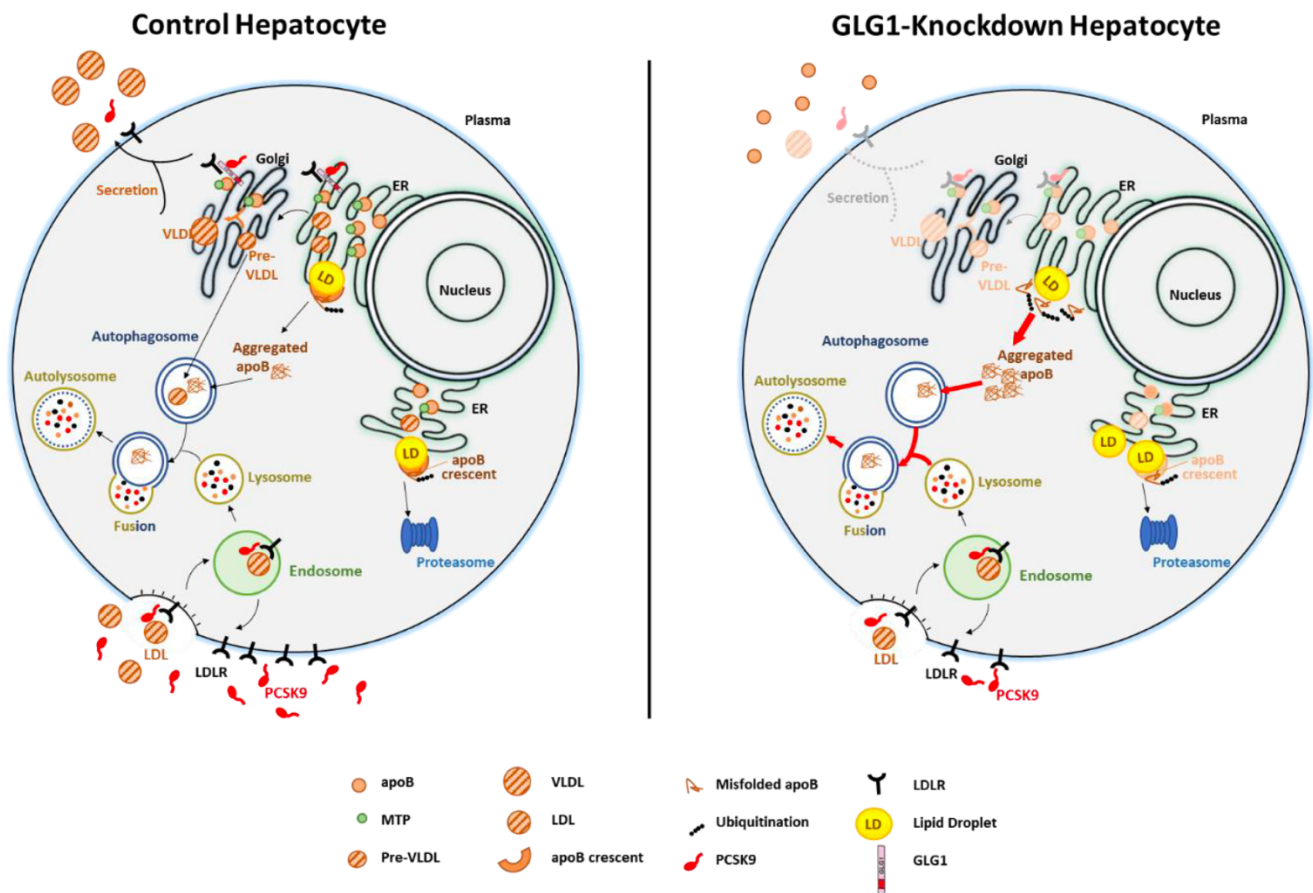


Figure 13. Schéma représentant le mécanisme proposé de la sécrétion et la dégradation de l'apoB en présence (gauche) ou en absence de GLG1 (droite).

Dans les hépatocytes contrôles (panneau de gauche), GLG1 interagit avec apoB, PCSK9 et LDLR dans le pré-Golgi et régule leur expression à la surface cellulaire. Après sa traduction, l'apoB pourrait être soit sécrétée soit dégradée. Sa lipodation par la MTP entraîne la formation de pré-VLDL et la sécrétion de VLDL-TG. Un défaut de lipodation ou de repliement de l'apoB entraîne son acheminement vers le cytoplasme, où elle sera ubiquitinylée et par la suite dégradée par le protéasome ou l'autophagie. Une altération de la dégradation de l'apoB par la voie ubiquitine-protéasome conduit à l'agrégation de l'apoB. Ces agrégats seront ensuite dégradés par autophagie. Dans les hépatocytes où l'expression de Glg1 est diminuée (panneau de droite), le trafic intracellulaire de PCSK9 et de LDLR vers la surface cellulaire est perturbé, ce qui entraîne une diminution de leur expression à la surface cellulaire. De plus, une diminution de l'activité de la MTP a été observée dans ces hépatocytes, ce qui a entraîné une diminution de la lipodation et de la sécrétion de l'apoB. L'apoB non lipidée finit par s'agréger et sera par la suite dégradée par autophagie (Adaptée de Samami *et al.*, en préparation).

Chapitre 2 – Objectif du mémoire

GLG1 est une protéine ubiquitaire, mais ses fonctions sont encore peu connues. Le rôle de GLG1 le plus caractérisé est celui de son implication dans le roulement des leucocytes. Deux études

avaient impliqué GLG1 dans l'athérosclérose, mais aucune n'a montré un effet sur le métabolisme des lipides. Une des études avait montré que les souris haploinsuffisantes pour *Glg1* présentaient plus de dépôt de collagène et moins de macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques sans avoir un effet sur la réduction des plaques. Dans le but de trouver des molécules qui interagissent avec PCSK9, une protéine importante dans le métabolisme des lipides, nos résultats antérieurs avaient montré que GLG1 interagit avec PCSK9, LDLR et apoB qui sont des protéines clés dans le métabolisme des lipides.

Dans cette étude, en raison de la difficulté d'obtenir des souris *Glg1*^{-/-} qui survivent après la naissance, nous avons induit la diminution de l'expression de GLG1 dans le foie des souris *Apoe*^{-/-} en utilisant un virus adéno-associé de type 8 (AAV8) véhiculant soit un shARN ciblant GLG1 (shGLG1) soit un shARN-contrôle (shScramble).

Basé sur nos résultats antérieurs, notre hypothèse est que GLG1 régule la sécrétion de l'apoB et le développement de l'athérosclérose.

Mon projet avait donc pour objectif de :

- Évaluer l'efficacité du AAV8 à réduire l'expression de GLG1 dans le foie des souris *Apoe*^{-/-} ;
- Étudier l'effet de la diminution de l'expression de GLG1 sur les taux de cholestérol plasmatiques ;
- Étudier l'effet de la diminution de l'expression de GLG1 sur le développement de l'athérosclérose chez les souris *Apoe*^{-/-}.

Chapitre 3 – Article

Contributions des auteurs

NA et GM ont contribué à l'élaboration de l'étude et à sa mise en place. NA a réalisé les mises au point et les expériences. NA et GM ont analysé les données. AD et AK ont aidé dans les expériences. NA et GM ont rédigé l'article. Les fonds octroyés à GM par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal et la Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal ont permis la réalisation de cette étude.

Article en préparation.

Golgi glycoprotein 1 (GLG1) regulates lipid metabolism and the development of atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice

Nadine Ardo^{1,2}, Alisar Katbe^{1,2}, Annie Demers¹, Gaétan Mayer^{1,2,*}

¹Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Montreal Heart Institute; ²Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

*Corresponding author:

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal; Montreal Heart Institute, 5000, Belanger Street, Montreal, QC, H1T 1C8, Canada.

E-mail address: gaetan.mayer@icm-mhi.org

List of Abbreviations

AAV8: Adeno-associated virus type 8
ADH: Autosomal dominant hypercholesterolemia
APN: Adiponectin
ApoB: Apolipoprotein B
ASCVD: Atherosclerotic cardiovascular disease
CFR: Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor
CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
ESL-1: E-selectin ligand 1
FBS: Fetal bovine serum
FGF: Fibroblast growth factors
FH: Familial hypercholesterolemia
FPLC: Fast protein liquid chromatography
GC: Genome copies
GLG1: Golgi glycoprotein 1
HDL: High-density lipoprotein
HeFH: Heterozygous FH
HoFH: Homozygous FH
HPLC: High-performance liquid chromatography
HRP: Horseradish peroxidase
IDL: Intermediate-density lipoprotein
LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol
LDLR: LDL receptor
LTCP-1: Latent transforming growth factor- β complex protein 1
miRNA: MicroRNA
MTP : Microsomal triglyceride transfer protein
NP-40: Nonidet P-40
PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin 9
PEI: Polyethylenimine
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
RT: Room temperature
SDS/PAGE: Sodium dodecyl (lauryl) sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA: Short hairpin RNA
TBST: Tris Buffered Saline with Tween
TGF- β : Transforming growth factor- β
VLDL: Very-Low density lipoprotein

3.1. Abstract

Background and Aim: High levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) are strongly linked to atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD). Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder associated with increased LDL-C levels and early development of ASCVDs. FH is caused by mutations in *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* genes. A fourth locus has been mapped at 16q22.1, a region of 154 genes, where the causal gene remains unknown. Our previous results revealed that Golgi glycoprotein 1 (GLG1), which gene is located within this region, interacts with LDLR, apoB and PCSK9, and is involved in the regulation of mouse plasma cholesterol levels. The objective of this study was to assess the effect of GLG1 on the development of atherosclerosis.

Methods and Results: *ApoE*^{-/-} mice were injected with an adeno-associated virus coding for a short hairpin RNA targeting GLG1 (AAV8-shGLG1) to knockdown GLG1 expression in the liver and then fed a Western diet for 12 weeks. AAV8-shGLG1 efficiently inhibited GLG1 expression in *ApoE*^{-/-} mice livers, leading to a decrease of 34% in very low-density lipoprotein (VLDL)-C and 41% in LDL-C levels ($p < 0.05$), and a decrease of apoB100 levels in the liver for about 2 months. However, GLG1 knockdown was not stable during the entire study of 90 days, making it ineffective in lowering plasma cholesterol levels on the long-term. Even though GLG1 expression gradually returned to basal levels after two months, lesions areas in the aortic sinus of shGLG1 mice showed a significant 25% reduction compared to the control ($p < 0.05$).

Conclusion: In summary, our results show that lowering GLG1 expression reduces VLDL-C and LDL-C levels as well as atherosclerosis progression in *ApoE*^{-/-} mice. Remarkably, the reduction in atherosclerosis occurred in spite of the gradual loss of GLG1 AAV-mediated knockdown and is likely related to the reduced apoB100-expression in shGLG1 mice livers. These findings demonstrate that GLG1 is a promising therapeutic target for lowering plasma cholesterol levels, particularly VLDL- and LDL-C, and preventing atherosclerosis development.

Keywords: AAV, apoB100, *ApoE*^{-/-} mice, atherosclerosis, cholesterol, FH, GLG1, LDL.

3.2. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder associated with increased plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and early development of atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD) (1). ASCVDs are the leading cause of death worldwide, representing 31% of global deaths (2). Mutations in *LDLR* (3), *APOB* (4), and *PCSK9* (5) genes are known to cause FH in 70-95% of patients (6). The most common mutation is in the *LDLR* gene that causes a decrease in LDL receptor (LDLR) numbers or function, leading to an increase in plasma LDL-C levels. Heterozygous FH (HeFH) affects between 1:200 and 1:300 individuals, while homozygous FH (HoFH) is less common, affecting 1:250000 people (7). When untreated, HeFH is characterized by LDL-C levels higher than 4-5 mmol/L (155-190 mg/dl), whereas levels are greater than 13 mmol/L (500 mg/dl) in HoFH patients (8). In 2010, a fourth locus, linked to autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH), has been mapped at 16q22.1, a region of 154 genes, but the causal gene remains unknown (9).

Golgi glycoprotein 1 (GLG1) encoding gene is located within the 16q22-23 region (10). GLG1, also known as E-selectin ligand 1 (ESL-1), MG-160, cysteine-rich fibroblast growth factor receptor (CFR) and latent transforming growth factor- β complex protein 1 (LTCP-1) (11), is an ubiquitous type I transmembrane protein (12, 13), localized in the Golgi and on the cell surface (14). The functions of GLG1 are not well characterized. GLG1 interacts with different molecules such as E-selectin, transforming growth factor- β (TGF- β) precursors, and fibroblast growth factors (FGF), suggesting multiple functions. Previous studies have shown that *Glg1*-deficient mice present growth retardation and die shortly after birth. This is mostly due to increased maturation of TGF- β associated with an increase in its signaling, which impaired chondrocyte proliferation (15). GLG1 was also identified as an E-selectin binding protein essential for leukocyte steady rolling (16, 17). In an atherosclerosis study, haploinsufficient *GLG1* mice had fewer macrophages and more collagen in atherosclerotic lesions (18). More recently, GLG1 has been identified as an adiponectin (APN)-binding protein. It has been established that this interaction is involved in the anti-atherogenic effects of APN, by blocking GLG1-binding to E-selectin (19).

Our previous results have shown that GLG1 interacts with proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9), LDLR and apolipoprotein B (apoB) (Samami *et al.*, In preparation). We also showed that

GLG1 is involved in the regulation of plasma cholesterol levels. In fact, GLG1 knockdown induces apoB degradation through an autophagy-dependent pathway and reduces cholesterol levels in mouse plasma. These findings led us to hypothesize that GLG1 knockdown could modulate plaque accumulation. Due to the difficulty of having *Glg1*^{-/-} mice that survive after birth, we used an adeno-associated virus type 8 (AAV8) carrying a short hairpin RNA sequence targeting Glg1 mRNA in *ApoE*^{-/-} mice liver. Our results show that a single intravenous injection of AAV8-shGLG1 in *ApoE*^{-/-} mice significantly reduces GLG1 expression and total cholesterol levels, especially very low-density lipoprotein (VLDL)-C and LDL-C, as well as lesion development in the aortic roots.

3.3. Materials and Methods

AAV8 production and purification

HEK293T cells were seeded in six 150 mm plates in DMEM without sodium pyruvate (Wisent, Cat # 319-015), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Wisent, Cat # 080-150). Once they have reached 70-80% confluence, cells were transfected using the polyethylenimine (PEI; Polysciences, Cat # 23966) method, with the plasmid pDG8 (20) and the plasmid of interest (pU6-shScramble or pU6-shGLG1). After 10 to 20 minutes of incubation, the mixture was added dropwise to each plate. The medium was replaced after 7h by fresh DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were harvested 72h post-transfection with a cell scraper, pelleted, resuspended in Tris lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.5) then subjected to three freeze/thaw cycles. Cell lysates were treated with MgCl₂ and benzonase (Santa Cruz sc-202391) for 45 min at 37°C then centrifuged to remove cell debris. The crude lysate was stored at -80°C until use. The virus was purified by iodixanol gradient (Sigma D1156) ultracentrifugation in 5 ml ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, Cat # 344057) then concentrated by centrifugation through Amicon Ultra-15 100kDa tubes (UFC910024). The virus was then titrated by quantitative PCR using BGH primers: forward-primer 5'-TGC CTT CCT TGA CCC T-3' and reverse-primer 5'-CCT TGC TGT CCT GCC C-3'. To generate a standard curve, pU6-shScramble or pU6-shGLG1 plasmids were used in serial dilutions from 2x10⁹ to 2x10⁴ genome copies (GC), performed in duplicates.

The shRNA sequences used were inserted into a vector with U6 promoter and are the following: shmGLG1 (5'-AAGTTAGAGTCCGAGGATATACC) and the control shScramble (5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGC).

Animal procedures

Apoe^{-/-} mice (*Apoe*^{tm1Unc}, stock No. 002052) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) (21). All animals were kept on a 12h light-dark cycle and had free access to water and food. Eight-week-old male *Apoe*^{-/-} mice received 3x10¹¹ vector genome copies (GC) of AAV8-shGLG1 or the control AAV8-shScramble *via* a single tail vein injection. Mice were fed a Western diet providing 42% calories from fat (TD.88137, Harlan Laboratories), starting 2 weeks post-injection until sacrifice after 12 weeks. Body weight and food intake were measured every week until sacrifice. Blood samples were collected from the submandibular vein into EDTA coated tubes before the injection (day 0), and at day 14, 30, 60, 90 post-injection, except on sacrifice (week 14), where blood was obtained *via* cardiac puncture. Plasma was obtained by centrifuging the blood at 1500 x g for 15 min at 4°C and then stored at -80°C for subsequent analysis. All animal experiments were conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Montreal Heart Institute animal ethics committee.

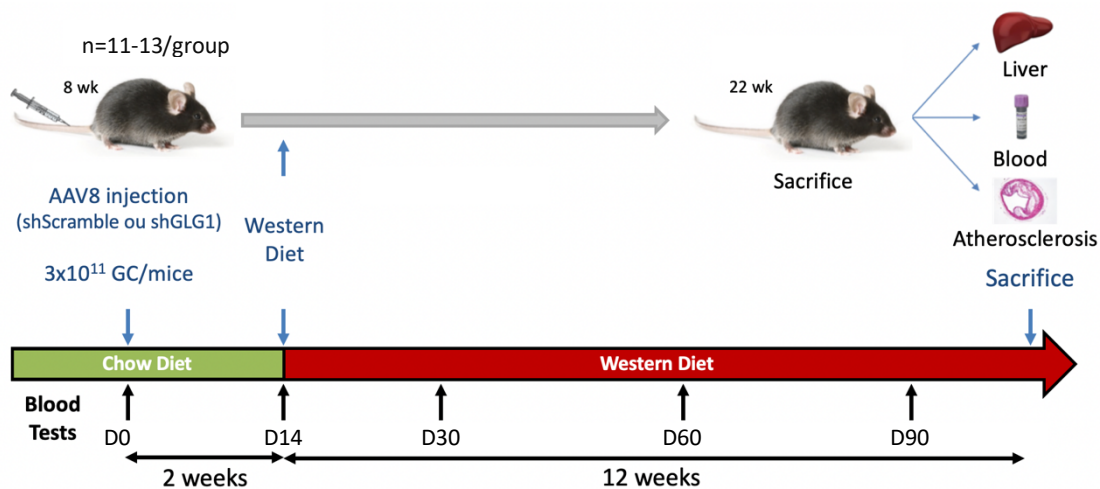


Figure 3.1. Experimental Protocol in *Apoe*^{-/-} mice.

Apoe^{-/-} mice were injected at the age of 8 weeks with an adenovirus-associated (AAV8) carrying a shRNA (short hairpin RNA) targeting GLG1 (shGLG1), or a shRNA-control (shScramble) at a dose of 3x10¹¹ GC/mouse. At 10 weeks of age, mice were placed on a Western diet (42% calories from fat) for the remainder of the study. During the study, blood samples were collected at different time-points: D0 (before the injection), D14, D30, D60 and D90. At 22 weeks of age, mice were sacrificed; their heart, liver, blood and aorta were recovered for further analysis.

Lipid Analysis

Total cholesterol levels were measured using an enzymatic colorimetric method (Cholesterol E kit, Wako diagnostics, Cat # 999-02601) per manufacturer's instructions. A standard curve was generated by diluting the standard solution. Two μ l of plasma were used from each sample then 200 μ l of the color reagent was added to each well and incubated at 37°C for 5 min. The absorbance was then measured at 600 nm using a microplate reader (BioTek Synergy 2).

Plasma lipoprotein fractions were separated by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) as previously described (22) and was carried out at the Lipidomics Core Facility, University of Alberta using pooled plasma from shScramble and shGLG1 mice. Briefly, plasma lipoprotein cholesterol profiles of mice were obtained using 25-50 μ l of pooled plasma loaded onto an Agilent 1200 HPLC (High-performance liquid chromatography) equipped with a Superose-6 column. Cholesterol was detected at 500 nm using in-line infusion of Infinity cholesterol reagent (Thermo). Fractions were

defined as follows: fractions 19-26, very low-density lipoprotein (VLDL); 27–37, intermediate-density lipoprotein/low-density lipoprotein (IDL/LDL); and 38–44, high-density lipoprotein (HDL).

Western Blotting

Livers were homogenized in ice-cold lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS (v/v)), 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.25% Sodium deoxycholate) supplemented with complete protease inhibitor (Roche Applied Science, Cat # 11 697 498 001) using a polytron at maximal speed. Plasma apoB and liver proteins were separated on 5% and 8% SDS/PAGE gel, respectively, and then transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 1h at RT with Tris Buffered Saline with Tween (TBST) supplemented with 5% non-fat milk then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in 1% non-fat milk in TBST followed by an incubation with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000; GE healthcare). Immunoreactive bands were detected using Western Lightning Ultra chemiluminescence kit (PerkinElmer Life Sciences, Cat # NEI112001EA) and BioFlex EC Films (InterScience, Cat # CLEC810). The band intensities were quantified using the NIH ImageJ software and normalized to β -actin or pan-cadherin levels.

Antibodies

The mouse monoclonal anti-mouse apoB 2G11 (23) was a kind gift from the Atherosclerosis, Genetics and Cell Biology group (University of Ottawa) and used at 1:2000. The following antibodies were purchased as follows: rabbit anti-human/mouse GLG1 (ABGAP9839BS, MJS Biolynx; 1:5000), goat anti-mouse LDLR (AF2255, R&D systems; 1:2000), goat anti-mouse PCSK9 (AF8985, Abcam; 1:200), rabbit anti-human/mouse actin (A2066, Sigma; 1:5000-1:10000) and rabbit anti-human/mouse pan-cadherin (71-7100, Life Technologies; 1:10000).

Reverse transcription and real-time/quantitative PCR

Total RNA was isolated from 50-100 mg of liver samples using RiboZol (Amresco, Cat # N580-200ML) and used as templates for cDNA synthesis using iScript cDNA Synthesis kit according the manufacturer's instructions (BioRad, Cat # 170-8891). RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed with the Stratagene Mx3000P

real-time thermal cycler (Agilent Technologies) using the iTaq Universal SYBR Green SuperMix (BioRad, Cat # 172-5121) and specific forward and reverse oligonucleotide primers (listed in **Table 1**). The qPCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 30 seconds, followed by 40 cycles of amplification, with each cycle consisting of 95°C for 5 seconds, and 60°C for 30 seconds. qPCRs were run in duplicate and *Hprt* was used as the normalizing gene. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate relative mRNA levels.

Atherosclerotic lesions analysis

Mice were anesthetized with isoflurane, exsanguinated by cardiac puncture then flushed with 10 ml saline *via* the left ventricle. The entire aortas were isolated and fixed overnight in 10% formalin at 4°C. Aortas were stained with a 0.7% solution of Oil Red O (Sigma-Aldrich, Cat # O0625) for 2 hours at room temperature and counterstained with 0.05% Nuclear Fast Green (Sigma-Aldrich, Cat # F7258) to optimize contrast. Images were captured using a stereomicroscope equipped with a digital camera (MC170 HD; Leica Microsystem). Atherosclerotic lesions were quantified from the aortic root down to the iliac artery bifurcation using the NIH ImageJ software. For the aortic sinus analyses, hearts were fixed in 10% formalin at room temperature for 24-48h, paraffin-embedded and serially sliced in 5 µm sections from the region of the proximal aorta through the aortic sinuses and stained with Masson's trichrome. Paraffin-embedding and sectioning of the hearts were carried out at the Histology Core Facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal. Lesion areas were quantified using ImagePro 9.3 (Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD). We prepared 15 slides for every sample, each containing 4 sections, covering a distance of 300 µm through the aortic root. Aortic lesion area of each mouse was calculated by averaging lesion areas of 4 sections from the same mouse, separated by 75 µm.

Statistical analysis

Results are reported as means ± SEM. Statistical significance was determined using the 2-tailed Student's t-test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8. P < 0.05 was considered statistically significant.

Table 1. qPCR primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Glg1</i>	TCGGGATTGGAAGTTGGACC	CCTCTGGACTTCAGCTCGAC
<i>ApoB</i>	AAGCTGTTCAGTGGCAGCAACA	AGAGAGGCTTGCAAGTTGACCA
<i>Hprt</i>	CAGCGTCGTGATTAGCGATG	CAGAGGGCCACAATGTGATGG

3.4. Results

GLG1 expression is strongly inhibited 2 weeks after AAV8-shGLG1 injection but is re-expressed progressively.

GLG1 functions remain poorly elucidated and, to our knowledge, a link between GLG1 and lipid metabolism has not been established until our recent findings (Samami *et al.*, In preparation). To further investigate the effect of GLG1 knockdown on lipid metabolism and atherosclerosis we used *Apoe*^{-/-} mice, one of the most common murine models for atherosclerosis studies (24). Taking into account that only 1.7% of *Glg1*^{-/-} mice survive postnatally (25), we opted for an AAV-mediated liver-specific knockdown of GLG1. Therefore, we chose the AAV8 as this serotype has been shown to efficiently transduce hepatocytes (26).

For this study, male mice were injected intravenously at 8 weeks of age with an AAV8-shGLG1 or the control AAV8-shScramble. After 2 weeks, mice were fed a Western diet until sacrifice at 14 weeks (**Figure 3.1**). To monitor the robustness of GLG1 knockdown, we also sacrificed mice at 2- and 6-weeks post-injection. After a single intravenous injection of AAV8-shGLG1 (shGLG1) at a dose of 3×10^{11} GC/mice, we observed a 77% reduction ($p=0.024$) in hepatic *Glg1* mRNA levels compared to the control group (shScramble) 2 weeks following the injection (**Figure 3.2A**). However, the inhibitory effect of shGLG1 started to wear off after that. GLG1 mRNA was reduced by 44% ($p=0.025$) at 6-weeks and by 11% at 14 weeks post-injection ($p>0.05$) (**Figure 3.2A, upper panel**). No significant effect of GLG1 knockdown was observed on *Apob* mRNA levels at all time tested (**Figure 3.2A, bottom panel**). We also analyzed GLG1 and apoB100 protein expression in murine liver after GLG1 knockdown. GLG1 protein levels were decreased by 90% after 2 weeks, by 57% at 6 weeks and were at the same levels as that of control shScramble mice after 14 weeks (**Figure 3.2B**). Furthermore, we investigated whether GLG1-knockdown would have any effect on its interacting protein apoB. Two weeks after the injection of AAV8-shGLG1, apoB100 protein level was reduced by 41% and by 10% at 6 weeks but was no longer decreased after 14 weeks (**Figure 3.2B**).

In summary, AAV8-shGLG1 efficiently inhibited GLG1 expression in *Apoe*^{-/-} mice livers, leading to a decrease in apoB protein level for at least 6 weeks. However, GLG1 knockdown was not stable during the entire study, making it ineffective in lowering apoB expression on the long-term.

AAV8-shGLG1 robustly reduces total cholesterol, including VLDL- and LDL-cholesterol levels, in mouse plasma.

Based on our previous results, GLG1-knockdown reduces total cholesterol levels as well as LDL- and HDL-cholesterol in C57BL/6 mice (Samami *et al.*, In preparation). However, the effect on VLDL regulation could not be evaluated in steady-state lipid profiles because this murine model has very low levels of VLDL. Therefore, our study on *ApoE*^{-/-} mice could provide new insight into GLG1 effect on lipid metabolism since these mice are characterized by high VLDL- and LDL-cholesterol levels regardless of diet (27).

As seen in **Figure 3.3A**, a single injection of AAV8-shGLG1 significantly decreased plasma total cholesterol levels for more than a month in *ApoE*^{-/-} mice. Total cholesterol levels decreased from 312.2 ± 35.98 mg/dl in control mice to 183.9 ± 11.2 mg/dl in shGLG1 mice at week 2 (44% reduction; p=0.0032) and from 835.8 ± 86.3 mg/dl to 379.4 ± 26.7 mg/dl at week 4 (55% reduction; p=1.3⁻⁵). However, following the same pattern as observed for GLG1 expression, cholesterol levels started increasing after 4 weeks until there was no significant difference with the control group 12 weeks post-injection (**Figure 3.3A**).

Plasma lipid profiles showed that cholesterol levels in VLDL and LDL were markedly reduced after 4 weeks in shGLG1 mice (**Figure 3.3B, upper panel**). FPLC analysis of plasma cholesterol distribution revealed that VLDL-C level was decreased by 34%, LDL-C by 41% and HDL-C by 21% in shGLG1 mice compared to shScramble-injected control mice. In contrast, shGLG1 mice had a reduction of 13% in VLDL-C, 15% in LDL-C and 20% in HDL-C at sacrifice (**Figure 3.3B, bottom panel**).

These results demonstrate that a single AAV8-shGLG1 injection has a high impact in reducing plasma lipoprotein cholesterol levels. Therefore, cholesterol levels are tightly linked to the expression of GLG1 emphasizing its importance in lipid metabolism.

GLG1-knockdown reduces plaque formation in aortic roots of *ApoE*^{-/-} mice.

Numerous investigations have established a link between high concentrations of apoB-containing lipoproteins and the development of ASCVDs (28). Given that GLG1-knockdown leads to reduced

LDL- and VLDL-C levels in mice plasma, we sought to evaluate the effect of lowering GLG1 expression on the development of atherosclerosis.

After 12 weeks of Western diet mice were sacrificed and the impact of GLG1-knockdown on atherosclerotic lesion formation was analyzed in the whole aorta and the aortic root. We proceeded to stain *en face* the neutral lipids in the whole aorta with Oil Red O and the paraffin-embedded aortic root sections with Masson's Trichrome. **Figure 3.4A** shows the lesion areas of mouse aortic sinuses. The mean lesion area in the aortic root of shGLG1 mice ($0.44 \pm 0.01 \text{ mm}^2$) was significantly reduced by 25% compared to the scramble shRNA-injected mice ($0.6 \pm 0.05 \text{ mm}^2$) ($p=0.0059$). These findings are also in line with those of Oil Red O-stained aorta of AAV8-shGLG1-injected mice. Quantification analysis showed that shGLG1 mice aortic plaque area percentage ($3.8 \pm 0.65\%$) was 43.6% lower compared to the control group ($6.8 \pm 1.3\%$) revealing a trend ($p=0.074$) toward a marked reduction in plaque area (**Figure 3.4B**).

Even though GLG1 expression gradually returned to baseline after 14 weeks of the AAV8-shGLG1 injection, its effect on plasma cholesterol and atherosclerosis development was prominent resulting in reduced lesions in the aortic root. Thus, these observations support the important role of GLG1 in atherosclerosis.

3.5. Discussion

The current study demonstrates that lowering GLG1 expression reduces plasma lipoprotein cholesterol levels as well as atherosclerosis progression in *ApoE*^{-/-} mice. As seen in the aortic roots, this reduction had a strong impact on plaque formation, significantly reducing plaque buildup by 25% in shGLG1 mice. Two previous studies have suggested a role for GLG1 in atherosclerosis but none of them have reported a reduction in plaque formation. Luo *et al.* have found that lesions in the aortic root of *Glg1* haploinsufficient mice on an *ApoE*^{-/-} background have increased collagen deposition and fewer macrophages. However, they didn't observe any difference in plaque formation in the aorta nor the aortic sinus of *ApoE*^{-/-}*Glg*^{+/-} mice compared to *ApoE*^{-/-}*Glg1*^{+/+} mice (18). Yamamoto *et al.* have identified GLG1 as an adiponectin-binding (APN) protein. They have shown that this interaction blocks GLG1 binding to E-selectin, a known mechanism of monocyte recruitment in atherosclerotic lesions (19).

Our results show that mice injected with an AAV8-shGLG1 had significantly lower cholesterol levels in highly atherogenic lipoproteins, namely LDL and VLDL. Moreover, apoB100 protein expression in shGLG1 knockdown mice liver was also reduced. These data provide further support to our recent discovery in which we highlighted that GLG1 knockdown in C57BL/6 mice leads to a marked reduction in cholesterol levels of plasma apoB-containing lipoproteins. The suggested mechanism behind this reduction is that GLG1 downregulation decreases microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity, required for apoB lipidation in endoplasmic reticulum. Inadequate lipidation of apoB leads to its degradation through an aggresome/autophagy pathway. ApoB is the primary apolipoprotein of LDL and VLDL; thus, less lipidated apoB are associated with lower LDL and VLDL levels. Alternatively, GLG1 may be directly required for apoB100 secretion and its absence leads to apoB aggregation and degradation by autophagy (Samami *et al.*, In preparation). Taken together, our findings demonstrate that GLG1 is involved in lipid metabolism and impacts atherosclerosis development; therefore, it would be interesting to identify possible mutations in the *GLG1* gene. GLG1 encoding gene is located on chromosome 16q23.1. Two studies have implicated this region in lipid metabolism disorders, such as ADH and hypoalphalipoproteinemia (low HDL-C levels). In 2010, this region has been linked to ADH in families where mutations in

LDLR, *APOB*, and *PCSK9* genes have been excluded. After analyzing 57 genes out of 154, the causal gene remained unknown (9). Furthermore, Dastani *et al.* have studied this locus in French-Canadian subjects presenting low plasma HDL-C levels without finding the accountable gene (29). These observations strongly suggest that *GLG1* sequencing in these subjects might help identify the gene of interest.

Given that GLG1 knockdown reduces cholesterol levels in atherogenic lipoproteins, we sought to study this effect on atherosclerosis development. For this purpose, we analyzed lesion formation in *ApoE*^{-/-} mice after 12 weeks of Western diet. Atherosclerotic lesion size was significantly reduced in aortic roots of shGLG1 mice. These observations support that lowering GLG1 expression reduces plasma cholesterol levels which in turn lowers atherosclerotic lesions. Moreover, plaque area in the whole aorta of shGLG1 mice showed a trend towards lower plaque size. Divergence between our results and those of Luo *et al.* could be due to the use of different strategies to reduce GLG1 expression. In fact, Luo *et al.* developed *ApoE*^{-/-}*Glg1*^{+/-} mice, which are heterozygous for *Glg1*, and showed a 60% reduction in GLG1 protein levels (18). In the current study, we found that GLG1 protein levels were reduced by 90% 2 weeks after a single injection of AAV8-shGLG1 compared to AAV8-shScramble in *ApoE*^{-/-} mice. Therefore, a mutation in one copy of this gene is likely insufficient to produce the effect we have observed on plaque formation.

Although GLG1 knockdown was not maintained throughout the whole study, we were still able to observe a reduction in atherosclerosis development. At 2 weeks post-injection, *Glg1* mRNA expression was reduced by 77% and total cholesterol by 44% in shGLG1 mice whereas total cholesterol was reduced by 55%, VLDL-C by 34% and LDL-C by 41% at day 30 compared to the control. These parameters started increasing progressively until there was a slight difference between the two groups at 14 weeks. VLDL-C and LDL-C were decreased by 13% and 15%, respectively, compared to the control group. AAV-based gene therapies are widely used in clinical studies. AAVs are known for their lack of pathogenicity and their safety. They are expected to be long-lasting and have tissue-specific transduction depending on the serotype used (30). Although we do not know the exact cause for the gradual loss of AAV8-shGLG1 effect over 3 months, some explanations could be possible. First, injecting high doses of AAV carrying shRNA might result in dose-related liver toxicity and loss of transgene expression (31). Measuring levels of certain

plasma parameters (AST, ALT, bilirubin, albumin...) as well as microRNA (miRNA) levels in murine liver such as mir-122 could help confirm or discard this hypothesis. Second, AAV DNA does not integrate into the host genome but can persist in the host nucleus in an episomal form; thus, it can be lost during cell division. In adult mice, hepatocytes undergo cell division every ~100-200 days, which means that liver transduction results in stable transgene expression. However, in some cases, such as fibrosis, cirrhosis or other liver metabolic diseases, hepatocyte turnover can be faster and leads to vector dilution (32). Schierwagen *et al.* showed that 7 weeks of Western diet are enough for *Apoe*^{-/-} mice to develop hepatic steatosis, fibrosis, and inflammation. Moreover, TGF- β , a profibrotic marker, was increased in these mice (33). One of GLG1 functions is to inhibit the maturation of TGF- β precursors. Therefore, absence of GLG1 increased TGF- β maturation and TGF- β /SMAD signaling (34). This signaling pathway in hepatocytes is also known for its role in fibrosis, steatosis and cellular death (35). In the current study, *Apoe*^{-/-} mice were fed a Western diet for 12 weeks, long enough to develop liver steatosis and fibrosis. Furthermore, GLG1 knockdown in *Apoe*^{-/-} mice could have accelerated the disease onset by increasing TGF- β /SMAD signaling.

Altogether, these events could increase cell turnover, leading to the loss of transgene expression. To overcome this limitation, several strategies could be considered in future studies. AAV-based CRISPR/Cas9 systems could be an effective tool since they are able to permanently modify the genomic DNA (36). Other strategies aim to promote integration of the transgene in the host genome. Wang *et al.* integrated into the AAV vector a DNA sequence homologous to the sequence encoding for the 28S ribosomal RNA and allowed the integration of human fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) transgene in the genome of *Fah*-deficient mice (37). Once the AAV stability is optimized, it would be interesting to evaluate the effect of long-lasting (>3 months) GLG1 knockdown on apoB level, plasma cholesterol and atherosclerosis regression in *Apoe*^{-/-} mice.

In summary, we provide new evidence on the role of GLG1 in lipid metabolism and atherosclerosis. Remarkably, the reduction in atherosclerosis is likely related to the reduced apoB-expression in shGLG1 mice livers and occurred in spite of the gradual loss of GLG1 AAV-mediated knockdown. However, the effect of GLG1 on cholesterol metabolism and the mechanism behind it require further characterization. Altogether, our results show that GLG1 is

a promising therapeutic target for lowering plasma cholesterol levels, particularly VLDL- and LDL-C, and preventing atherosclerosis development.

3.6. Acknowledgments

We would like to thank Audric Moses (Lipidomics Core Facility, University of Alberta, Canada) for the FPLC analyses, Julie Hinsinger and Micheline Fortin for their technical support at the Histology Core Facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal. We thank Marie-Elaine Clavet-Lanthier (Histology and Immunochemistry platform, Montreal Heart Institute) for the staining of the aortic roots and her technical support. We also thank Natacha Duquette, Marie-Eve Higgins and the technicians at the Montreal Heart Institute animal facility for their expert assistance.

3.7. References

1. Sun YV, Damrauer SM, Hui Q, Assimes TL, Ho YL, Natarajan P, et al. Effects of Genetic Variants Associated with Familial Hypercholesterolemia on Low-Density Lipoprotein-Cholesterol Levels and Cardiovascular Outcomes in the Million Veteran Program. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(12).
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) 2017, May 17 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
3. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*. 1974;185(4145):61-3.
4. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(19):6919-23.
5. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-6.
6. Youngblom E, Pariani M, Knowles JW. Familial Hypercholesterolemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
7. Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, Hegele RA, Santos RD, Wierzbicki AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17093.
8. Najam O, Ray KK. Familial Hypercholesterolemia: a Review of the Natural History, Diagnosis, and Management. *Cardiol Ther*. 2015;4(1):25-38.
9. Marques-Pinheiro A, Marduel M, Rabes JP, Devillers M, Villegier L, Allard D, et al. A fourth locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps at 16q22.1. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(11):1236-42.
10. Mourelatos Z, Gonatas JO, Nycum LM, Gonatas NK, Biegel JA. Assignment of the GLG1 gene for MGF-160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus, to chromosome 16q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1995;28(2):354-5.

11. Olofsson A, Hellman U, Ten Dijke P, Grimsby S, Ichijo H, Moren A, et al. Latent transforming growth factor-beta complex in Chinese hamster ovary cells contains the multifunctional cysteine-rich fibroblast growth factor receptor, also termed E-selectin-ligand or MG-160. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 2):427-34.
12. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5600-9.
13. Croul S, Mezitis SG, Stieber A, Chen YJ, Gonatas JO, Goud B, et al. Immunocytochemical visualization of the Golgi apparatus in several species, including human, and tissues with an antiserum against MG-160, a sialoglycoprotein of rat Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem.* 1990;38(7):957-63.
14. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 6):687-94.
15. Miyaoka Y, Tanaka M, Imamura T, Takada S, Miyajima A. A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk). *Development.* 2010;137(1):159-67.
16. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, et al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature.* 1995;373(6515):615-20.
17. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26(4):477-89.
18. Luo W, Wang H, Guo C, Wang J, Kwak J, Bahrou KL, et al. Haploinsufficiency of E-selectin ligand-1 is associated with reduced atherosclerotic plaque macrophage content while complete deficiency leads to early embryonic lethality in mice. *Atherosclerosis.* 2012;224(2):363-7.
19. Yamamoto H, Kuroda N, Uekita H, Kochi I, Matsumoto A, Niinaga R, et al. E-selectin ligand-1 (ESL-1) is a novel adiponectin binding protein on cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(2):425-30.
20. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther.* 1998;9(18):2745-60.

21. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4471-5.
22. Audric Moses RL. Chromatographic techniques for separation and quantification of lipids, lipoproteins, and related metabolites 2019 [Available from: https://cloudfront.ualberta.ca/-/media/medicine/research/cores/lipidomics/fomd_research_core_lipidomics_poster_2019.pdf].
23. Nguyen AT, Braschi S, Geoffrion M, Fong LG, Crooke RM, Graham MJ, et al. A mouse monoclonal antibody specific for mouse apoB48 and apoB100 produced by immunizing "apoB39-only" mice with mouse apoB48. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(2):182-5.
24. Getz GS, Reardon CA. Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research. *Methods Mol Biol*. 2015;1339:1-16.
25. Sreeramkumar V, Leiva M, Stadtmann A, Pitaval C, Ortega-Rodriguez I, Wild MK, et al. Coordinated and unique functions of the E-selectin ligand ESL-1 during inflammatory and hematopoietic recruitment in mice. *Blood*. 2013;122(24):3993-4001.
26. Kattenhorn LM, Tipper CH, Stoica L, Geraghty DS, Wright TL, Clark KR, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther*. 2016;27(12):947-61.
27. Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J Lipid Res*. 2012;53(1):51-65.
28. Shapiro MD, Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Res*. 2017;6:134.
29. Dastani Z, Pajukanta P, Marcil M, Rudzicz N, Ruel I, Bailey SD, et al. Fine mapping and association studies of a high-density lipoprotein cholesterol linkage region on chromosome 16 in French-Canadian subjects. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(3):342-7.
30. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358-78.
31. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006;441(7092):537-41.

32. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;8:87-104.
33. Schierwagen R, Maybuchen L, Zimmer S, Hittatiya K, Back C, Klein S, et al. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep.* 2015;5:12931.
34. Yang T, Mendoza-Londono R, Lu H, Tao J, Li K, Keller B, et al. E-selectin ligand-1 regulates growth plate homeostasis in mice by inhibiting the intracellular processing and secretion of mature TGF-beta. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2474-85.
35. Yang L, Roh YS, Song J, Zhang B, Liu C, Loomba R, et al. Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology.* 2014;59(2):483-95.
36. Li A, Lee CM, Hurley AE, Jarrett KE, De Giorgi M, Lu W, et al. A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;12:111-22.
37. Wang Z, Lisowski L, Finegold MJ, Nakai H, Kay MA, Grompe M. AAV vectors containing rDNA homology display increased chromosomal integration and transgene persistence. *Mol Ther.* 2012;20(10):1902-11.

3.8. Figures

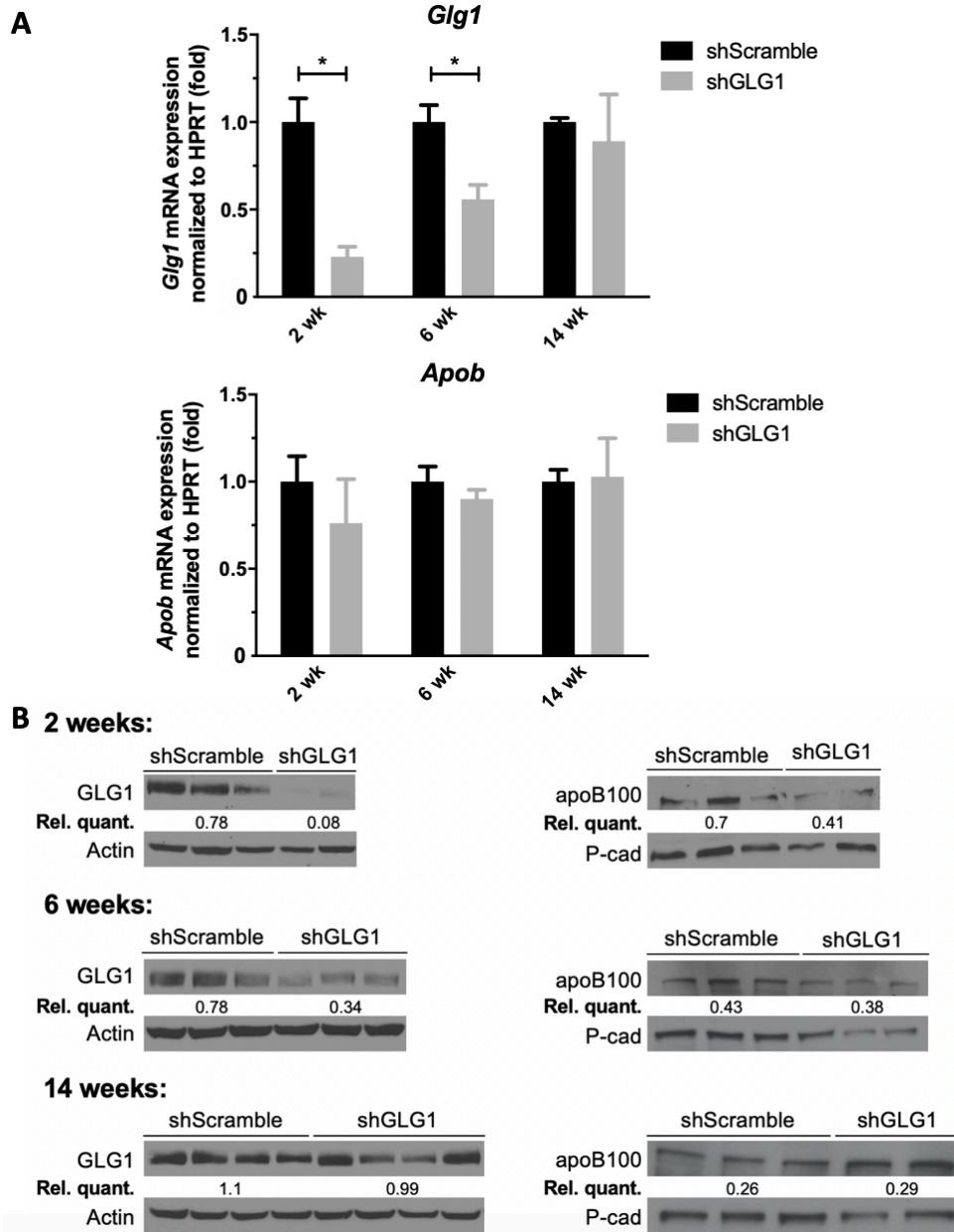


Figure 3.2. GLG1 mRNA and protein expression is strongly inhibited 2 weeks after AAV8-shGlg1 injection but is re-expressed progressively.

(A) GLG1 and apoB mRNA expression relative to HPRT expression in the liver of shGLG1 mice compared to shScramble at 2- (n=2-3/group), 6- (n=3/group) and 14-weeks (n=5-7/group for GLG1; n=11-13/group for ApoB) post-injection. *p<0.05. (B) Western blot and densitometry calculations for GLG1 and apoB100 in mice liver upon knockdown of GLG1 compared to the control group at 2- (n=2-3/group), 6- (n=3/group) and 14- weeks (n=11-13/group) post-injection. Relative quantification (Rel. quant.): Relative protein expression of GLG1 and apoB100 normalized respectively to β -actin and pan-cadherin (P-cad).

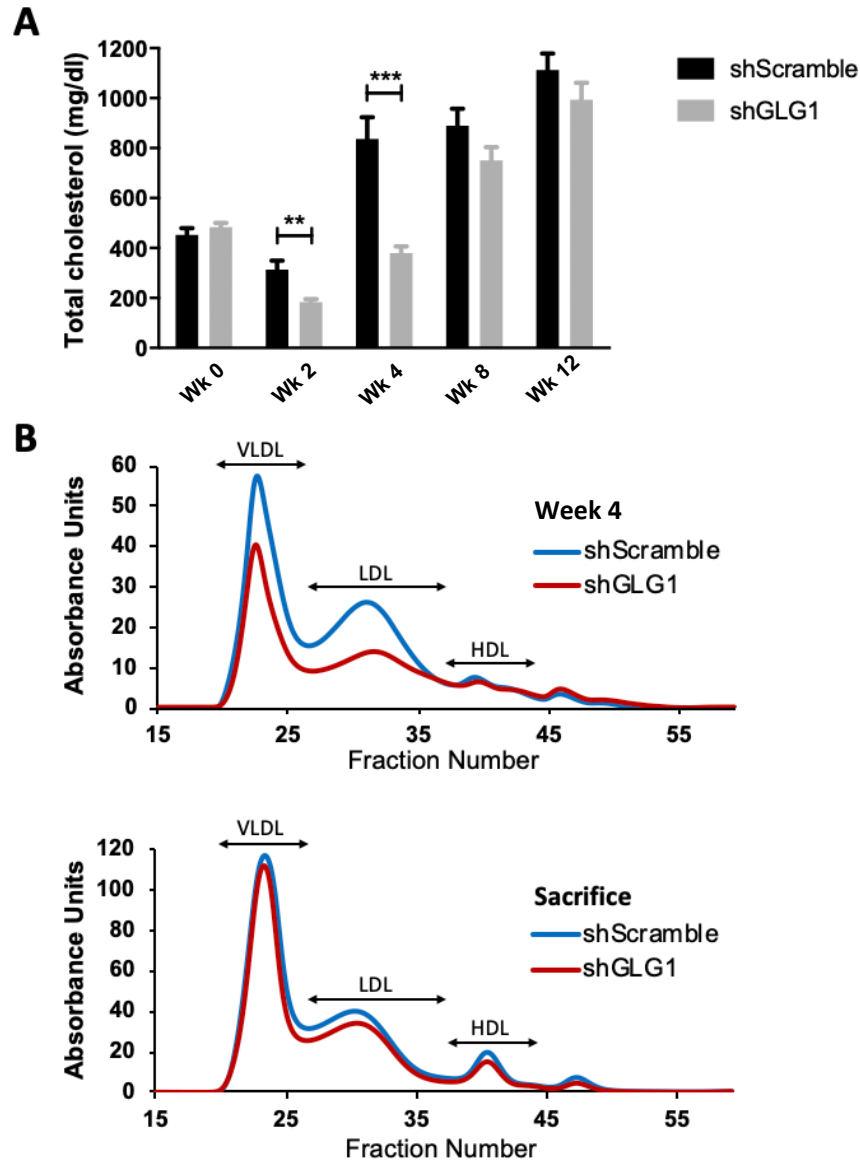


Figure 3.3. Plasma cholesterol levels in GLG1 knockdown mice.

(A) Total cholesterol measured by enzymatic colorimetric method in mouse plasma (shScramble or shGLG1) at week wk 0 (n=20-21/group), wk 2 (n=7-8/group), wk 4 (n=16-17/group), wk 8 (n=13/group) and wk 12 (n=13/group). Wk 0 being the day of injection of AAV8. **p=0.0032, ***p=1.3e-005. (B) Pooled plasma from each group of mice (with or without GLG1 knockdown) at wk 4 (upper panel) (n=9/group) and sacrifice (lower panel) (n=4/group) were separated by FPLC using a Superpose 6 gel filtration FPLC column. Cholesterol was measured using in-line infusion of Infinity cholesterol reagent (Thermo) and detection at 500 nm.

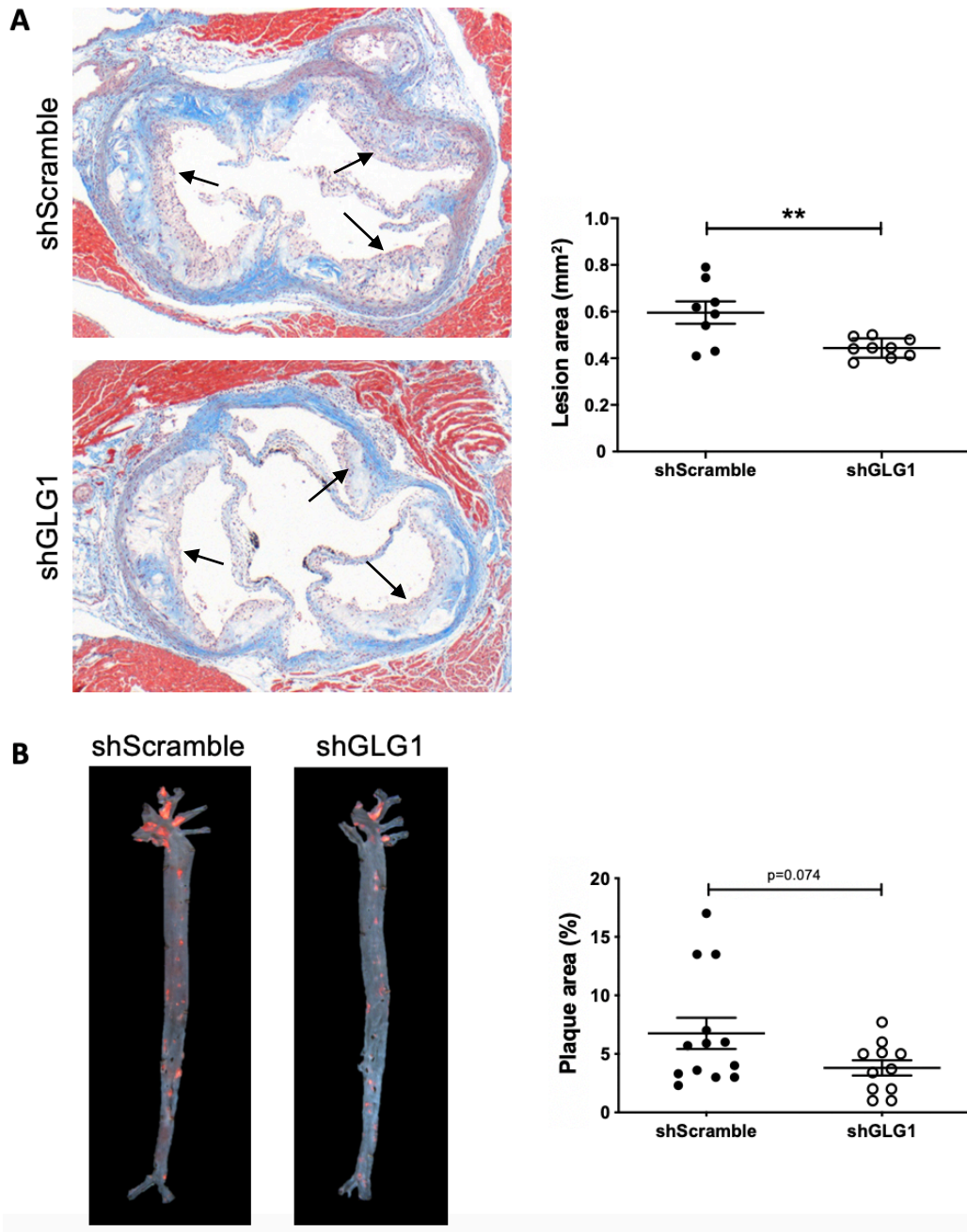


Figure 3.4. Reduced atherosclerotic lesions in the absence of GLG1 in *Apoe*^{-/-} mice.

(A) Representative images of the aortic root from each group (left panel) stained with Masson's Trichrome and quantification analysis (n=8-9/group) using ImagePro v.9.3 (right panel). ****p=0.0059**. Atherosclerotic lesions are indicated by arrows. (B) Representative aortas from each group (left panels) were stained en face with Oil Red O to visualize neutral lipids and quantified (n=11-13/group) using NIH ImageJ (right panel).

Chapitre 4 – Discussion

Les MCV constituent un véritable problème de santé publique et sont de plus en plus préoccupantes, aussi bien pour les patients que pour les professionnels de la santé. Des efforts significatifs ont été menés afin d'améliorer la prévention des MCV et ont abouti à une réduction du taux de mortalité. Par ailleurs, l'identification des facteurs de risque classiques des MCV dont le tabac, les lipides pro-athérogènes, HTA, le diabète, les mauvaises habitudes alimentaires et la sédentarité a entraîné une amélioration de la prévention primaire et de la prise en charge des patients. De plus, l'administration des thérapies préventives telles que les antihypertenseurs et les hypocholestérolémiants chez les sujets ayant un risque élevé de MCV ont entraîné une réduction significative des événements cardiovasculaires (116). Cependant, un ralentissement considérable du taux de réduction des MCV a été observé à partir de 2011 (117). Ces chiffres alarmants justifient le besoin de découvrir de nouvelles thérapies afin d'améliorer la prévention des MCV dans la population générale. Il est notamment indispensable de gérer les taux de cholestérol sanguin, en particulier le LDL-C, qui est fortement corrélé avec la survenue des MCV. Plusieurs acteurs clés interviennent dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dont PCSK9, LDLR et apoB. Dans l'objectif de trouver de nouvelles protéines qui interagissent avec PCSK9, nous avons découvert que GLG1 interagit avec PCSK9, apoB et LDLR (Samami et al., En préparation). Nous avons également trouvé que la diminution de l'expression de GLG1, dans le foie de souris C57BL/6, entraîne une diminution du cholestérol total dans le plasma, surtout le LDL- et HDL-C. Étant donné que la réduction des niveaux de cholestérol des lipoprotéines athérogènes entraîne une diminution des plaques d'athéromes, nous avons cherché à étudier l'effet du *knockdown* de GLG1 sur le développement de l'athérosclérose. Nous ne pouvions pas utiliser les souris *Ldlr*^{-/-} puisqu'il y a un effet de GLG1 sur le niveau de LDLR hépatique. Nous avons donc choisi de faire l'étude chez les souris *ApoE*^{-/-} qui développent rapidement l'athérosclérose (118). En raison de la difficulté d'obtenir des souris *Glg1*^{-/-} qui survivent après la naissance, nous avons provoqué la diminution de l'expression de GLG1 dans le foie des souris *ApoE*^{-/-} en utilisant un AAV8 véhiculant soit un shARN ciblant GLG1 (shGLG1) soit un shARN-contrôle (shScramble). En effet, plusieurs études ont montré le rôle important de GLG1 dans le développement squelettique. Par

conséquent, les souris *Glg1*^{-/-} présentent un retard de croissance en plus d'une mortalité embryonnaire et périnatale (110-112, 114). Pour rencontrer notre objectif, nous avons injecté des souris *ApoE*^{-/-} mâles âgées de 8 semaines soit avec l'AAV8-shGLG1 (n=21) ou l'AAV8-shScramble (n=21) à une dose de 3x10¹¹ copies de génomes (CG). Deux semaines plus tard, les souris ont été placées sur diète de type *Western* pendant 12 semaines jusqu'au sacrifice, après 14 semaines (n=11-13/groupe). Au cours de l'étude, nous avons aussi sacrifié des souris après 2 (n=2-3/groupe) et 6 (n=3/groupe) semaines de l'injection pour vérifier la stabilité du *knockdown* de GLG1.

Nous avons également effectué des prises de sang à différents jours : semaine 0 ou wk 0 (le jour de l'injection), wk 2, wk 4, wk 8 et wk 12. Nous avons observé une diminution significative du cholestérol total à wk 2 et wk 4 chez les souris shGLG1. Cette réduction s'explique surtout par la réduction des VLDL- et LDL-C. À partir de wk 8, les niveaux de cholestérol total n'étaient plus significativement différents entre les deux groupes. Toutefois, la séparation du plasma par FPLC a permis de démontrer une réduction de VLDL-C et LDL-C de 13% et 15%, respectivement, à la 12^{ème} semaine. En analysant les extraits protéiques du foie des souris, nous avons remarqué que l'expression de GLG1 était fortement réduite chez les souris shGLG1 à 2 semaines et augmentait progressivement pour atteindre les mêmes niveaux que les souris shScramble à 14 semaines post-injection. En effet, la modulation du cholestérol total va dans le même sens que la modulation de l'expression de GLG1. Nous avons également évalué les niveaux d'expressions protéiques et d'ARNm de l'*ApoB*, *Pcsk9* et *Ldlr* dans le foie des souris. Bien que l'apoB dans le foie semble être réduite en protéine, il n'y a pas de différences significatives au niveau de son ARNm. Ces résultats viennent confirmer davantage l'importance de GLG1 dans la régulation du cholestérol plasmatique et la sécrétion de l'apoB. Nos travaux antérieurs suggèrent qu'en absence de GLG1, la diminution de VLDL- et LDL-C dans la circulation est possiblement due à la diminution de l'activité de la MTP, requise pour la lipodation de l'apoB dans le RE. En absence de GLG1, une lipodation inadéquate de l'apoB entraîne la formation d'agrégats qui seront dégradés par autophagie. Par conséquent, la formation de VLDL et de leurs produits de catabolisme, les LDL, sera réduite. Alternativement, il est possible que GLG1 soit nécessaire pour le trafic de l'apoB du

RE vers le Golgi. En absence de GLG1, l'apoB demeurerait dans le RE et formerait des agrégats qui seraient dégradés par autophagie (Samami *et al.*, En préparation).

À 2 et 6 semaines post-injection, les résultats d'analyses d'expression protéique de LDLR, ProPCSK9 et PCSK9 (Annexe, Figure A1 E-G) et d'ARNm de *Ldlr*, *Pcsk9* et *Hmgcr* (Annexe, Figure A2 A-C) se sont avérés difficiles à interpréter puisqu'ils présentaient beaucoup de variabilité et n'étaient pas significatifs. D'où la nécessité d'augmenter le nombre de souris par groupe dans le futur afin de réduire la variabilité et d'atteindre une significativité statistique pour pouvoir les comparer aux résultats obtenus à 14 semaines et tirer des conclusions. Nous avons également remarqué que les niveaux d'apoB100 plasmatiques des souris shGLG1 ont augmenté de 5 fois par rapport aux contrôles à 6 semaines de l'injection (Annexe, Figure A1 D). Ceci a été observé dans l'étude avec les souris C57BL/6 2 semaines post-injection et pourraient s'expliquer par la diminution de LDLR dans le foie. En effet, la réduction de LDLR à la surface des hépatocytes entraîne une accumulation de l'apoB dans le plasma par défaut de clairance (Samami *et al.*, En préparation).

Nos résultats suggèrent que GLG1 est impliquée dans le métabolisme des lipides. Il serait donc intéressant d'identifier d'éventuelles mutations dans le gène codant pour GLG1 et localisé au niveau du locus 16q22-q23. Cette région a été impliquée dans l'HF et l'hypoalphalipoprotéïnémie (faibles taux de HDL-C). Son implication dans l'HF a été découverte chez des familles ayant des taux élevés de LDL-C sans avoir des mutations dans *LDLR*, *APOB* et *PCSK9*. Après avoir analysé 57 gènes sur 154, le gène causal est demeuré inconnu (95). De plus, une étude a impliqué ce locus chez des sujets canadiens-français présentant de faibles taux plasmatiques de HDL-C sans pour autant identifier le gène causal (119). Ces observations suggèrent que le séquençage de *GLG1* chez ces individus pourrait l'impliquer dans les dyslipidémies.

Plusieurs études de population ont établi un lien entre les taux élevés de cholestérol et la survenue de MCV telles que l'étude de Framingham (120). Étant donné que le *knockdown* de GLG1 réduit les taux de cholestérol dans les lipoprotéines athérogènes, nous avons cherché à étudier le rôle de GLG1 sur le développement de l'athérosclérose. En analysant les coupes de sinus aortiques des souris *ApoE*^{-/-} après 12 semaines de diète, nous avons observé une réduction significative de l'étendue des lésions chez les souris shGLG1 malgré l'absence de différence des

taux de cholestérol entre les deux groupes au sacrifice. De plus, nous avons remarqué une tendance à la baisse de la surface des lésions au niveau des aortes entières des souris shGLG1 comparée à celle des contrôles. Ainsi, l'augmentation du nombre de souris permettrait d'atteindre une significativité statistique. Dans notre étude, nous avons observé une réduction de 90% des niveaux protéiques de GLG1 après 2 semaines de l'injection du AAV8-shGLG1 chez les souris *Apoe*^{-/-}. Luo *et al.* ont développé des souris *Apoe*^{-/-}*Glg1*^{+/-} qui ont une copie du gène *Glg1* inactivée. Ces souris présentaient une réduction de 60% des niveaux protéiques de GLG1 (99). L'emploi de différentes stratégies pour diminuer l'expression de GLG1 a entraîné différents niveaux d'expression de GLG1 ce qui pourrait expliquer la divergence entre nos résultats et ceux de Luo *et al.* Par conséquent, une mutation dans une seule copie du gène *Glg1* est probablement insuffisante pour produire l'effet que nous avons observé sur le développement de l'athérosclérose. Luo *et al.* ont provoqué la diminution de l'expression de GLG1 dans toutes les cellules dont les macrophages alors que nous avons provoqué la diminution de l'expression de GLG1 principalement dans les hépatocytes. Étant donné que GLG1 est impliqué dans la capture et le roulement des macrophages, la diminution de son expression dans les macrophages entraîne une réduction de ces cellules dans les lésions (99). De plus, les macrophages présents pourraient être de types M2. En effet, il existe deux grands types de macrophages : les M1 ou « classiques » et les M2 ou « alternatifs ». Les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires en réponse aux pathogènes et favorisent la progression des lésions athérosclérotiques alors que les macrophages M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires et pourraient être impliqués dans la régression des lésions (121). Il serait donc intéressant de caractériser et de quantifier les macrophages dans les plaques d'athérome de nos souris shGLG1.

Comme observé au niveau protéique, deux semaines après l'injection du virus, les taux d'ARNm de *Glg1* ont été fortement réduits chez les souris shGLG1 par rapport au contrôle. Ensuite, ils ont commencé à augmenter progressivement jusqu'à ce qu'il n'y ait pas de différence entre les deux groupes. Bien que le knockdown du GLG1 n'a pas été maintenu tout au long de l'étude, nous avons quand même observé un effet sur la formation des lésions. Plusieurs études cliniques évaluent les thérapies géniques basées sur les AAV afin de réguler l'expression d'un gène. Les AAV sont reconnus pour leur tropisme et spécificité tissulaire, selon le sérotype utilisé, ainsi que leur

absence de pathogénicité et leur durabilité (103). Certaines hypothèses pourraient expliquer la perte du *knockdown* de GLG1 chez les souris *Apoe*^{-/-}. L'injection de fortes doses d'AAV véhiculant des shARN peut entraîner une toxicité hépatique et une perte d'expression du transgène (104). Dans la présente étude, quelle que soit la séquence de shARN utilisée, 3 souris sur 42 ont montré des signes de toxicité hépatique (le plasma et le foie étaient jaunâtres en raison de l'accumulation de bilirubine) et sont décédées 5 jours après l'injection de 3x10¹¹ copies de génomes CG/souris. Cependant, ces souris pesaient moins que les autres au début de l'étude et leur décès pourrait ne pas être relié à l'injection de l'AAV8. De plus, avant de commencer l'étude sur les souris *Apoe*^{-/-}, nous avons effectué une étude pilote chez des souris *Pcsk9*^{-/-} sur une période de 6 semaines en utilisant la même dose de virus, afin d'évaluer la stabilité du *knockdown*. La diminution de l'expression de GLG1 était maintenue tout au long de l'étude sans effet néfaste apparent. Par conséquent, l'hypothèse de la toxicité hépatique dose-dépendante est fortement improbable. La régénération du foie pourrait également expliquer la perte de l'effet du AAV. En effet, l'ADN viral ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte et reste sous forme épisomale dans le noyau ; il peut alors être perdu lors de la division cellulaire (122). Dans cette étude, nous avons utilisé des souris de 8 semaines d'âge donc à l'état adulte. L'âge ne semble pas être un facteur dans notre cas puisque les hépatocytes de souris adultes se divisent tous les 100 à 200 jours et donc l'expression du transgène devrait rester stable. Cependant, dans certains cas, tels que la fibrose, la cirrhose ou d'autres maladies métaboliques du foie, le *turnover* des hépatocytes peut être plus rapide et entraîner la perte du plasmide (122). Schierwagen *et al.* ont montré que les souris *Apoe*^{-/-} développent une stéatose hépatique, de la fibrose et de l'inflammation après 7 semaines de diète de type *Western*. De plus, l'ARNm de TGF-β, un facteur de croissance profibrotique, était augmenté dans les foies de ces souris (123). Dans le cadre de notre étude, les souris *Apoe*^{-/-} ont reçu la diète pendant 12 semaines, suffisamment pour développer une stéatose et une fibrose hépatiques. L'une des fonctions de GLG1 est d'inhiber la maturation des précurseurs de TGF-β. Par conséquent, la diminution de l'expression de GLG1 augmente la maturation de TGF-β et la signalisation TGF-β/SMAD (111). Cette voie de signalisation dans les hépatocytes est également connue pour son rôle dans la fibrose, la stéatose et la mort cellulaire (124). Le *knockdown* de GLG1 chez les souris *Apoe*^{-/-} pourrait donc accélérer l'apparition de la stéatose en augmentant la

signalisation TGF- β /SMAD. La diminution de l'expression de GLG1 pourrait donc favoriser le *turnover* hépatique, entraînant la perte d'expression du transgène. Pour surmonter cette limitation, plusieurs stratégies pourraient être envisagées. Les AAV véhiculant un système CRISPR/Cas9 pourraient être efficace puisqu'ils sont capables de modifier définitivement l'ADN génomique (125). D'autres stratégies visent à promouvoir l'intégration du plasmide dans le génome de la cellule hôte. Par exemple, Wang *et al.* ont montré que l'insertion, dans le plasmide véhiculé par le virus, d'une séquence d'ADN homologue à la séquence d'ADN qui code pour l'ARN ribosomique 28S augmente de 30 fois l'intégration du vecteur dans le génome de l'hôte (126).

Nous avons commencé à mettre au point un système de CRISPR/Cas9 capable de générer une coupure de l'ADN à un endroit précis du génome. Pour cela, nous avons besoin de trois éléments essentiels : la protéine Cas9 qui est une enzyme capable de couper l'ADN, les protéines nécessaires à la production du virus ainsi que l'ARN guide qui permet de lier la Cas9 et de reconnaître la séquence d'ADN que l'on cherche à modifier. Le AAV8 va véhiculer les plasmides codant pour la protéine Cas9 et pour l'ARN guide vers le foie. Une fois que ces protéines sont exprimées, l'ARN guide se lie à la Cas9 et l'achemine vers la séquence d'ADN pour laquelle la séquence de l'ARN guide est complémentaire. L'enzyme Cas9 va causer une cassure double-brin de l'ADN cible. La cellule essayera de réparer la cassure par jonction des extrémités non-homologues NHEJ (*Non Homologous End Joining*), aboutissant au *knockout* du gène cible, GLG1 dans notre cas (127). L'efficacité d'édition du gène va dépendre de la séquence de l'ARN guide, la protéine Cas9 et le motif alternatif protospacer adjacent (PAM) utilisés. Certains logiciels peuvent prédire l'efficacité (taux d'insertion/délétion : % indel) et le risque de cibler des sites hors cibles « *off-target sites* ». Une fois la stabilité de l'AAV optimisée, il sera important de vérifier si le *knockout* hépatique de GLG1 chez des souris *Apoe*^{-/-} aura un effet plus prononcé sur le développement de l'athérosclérose, le cholestérol plasmatique et les triglycérides hépatiques. D'autres modèles pourraient également être utilisés tels que les souris *knockout* tissu-spécifique ou bien le modèle *knockout* inductible au tamoxifène ou à la tétracycline. Le système Cre/*loxP* permettra d'obtenir un *knockout* spécifique au foie. Il s'agit de croiser une souris exprimant une Cre recombinase, sous le contrôle du promoteur de l'albumine de souris, dans les hépatocytes avec une souris porteuse d'un allèle dans lequel le gène d'intérêt est encadré par deux sites *loxP*.

La recombinase entraîne l'excision des séquences d'ADN situées entre les sites *loxP* induisant une mutation nulle dans le foie. Le modèle *knockout* inductible est également constitué du système *Cre/loxP* associé à des éléments régulateurs permettant d'induire la mutation par une simple administration du tamoxifène ou de la doxycycline (128). De plus, il sera intéressant de voir si le *knockout* de GLG1 aura un effet sur la régression des plaques d'athéromes. Il sera pertinent de tester l'AAV dans un autre modèle murin, tel que les souris *Ldlr*^{-/-}, afin d'en connaître plus à propos de l'interaction entre GLG1 et PCSK9, LDLR ou apoB dans le métabolisme des lipides.

L'ensemble de nos résultats confirment le rôle de GLG1 dans le métabolisme des lipides et le développement de l'athérosclérose. En effet, la diminution de l'expression de GLG1 a entraîné la réduction des taux plasmatiques de cholestérol total, surtout au niveau des LDL et VLDL, ainsi que la réduction du développement des lésions athérosclérotiques. L'effet sur l'athérosclérose est probablement conséquent à la diminution des lipoprotéines athérogènes dans le plasma. Ceci a été observé malgré la perte de *knockdown* de GLG1 puisque l'effet sur les taux de cholestérol a quand même perduré pendant plus de la moitié de l'étude. Ainsi, plus d'investigations sont nécessaires pour mieux comprendre la fonction de GLG1 dans le métabolisme des lipides et le rôle de l'interaction de GLG1 avec PCSK9, LDLR et apoB. Enfin, GLG1 pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse afin de prévenir le développement de l'athérosclérose et abaisser les taux de cholestérol plasmatique, en particulier au niveau des VLDL et LDL. Par exemple, l'AAV8 pourraient être utilisé pour cibler GLG1 dans les hépatocytes. Des études cliniques avec l'AAV8 pour le traitement de l'hémophilie B ont montré l'innocuité de l'AAV8 ainsi que sa capacité à cibler le foie et entraîner une efficacité à long-terme chez l'homme. L'administration de siRNA ciblant le foie pourraient également être une stratégie pour provoquer la diminution de l'expression de GLG1 au niveau hépatique.

Références bibliographiques

1. Cham BE. Importance of apolipoproteins in lipid metabolism. *Chem Biol Interact.* 1978;20(3):263-77.
2. Vance JE, Vance DE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.* Elsevier; 2008. p. 483-504.
3. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
4. Gautier T, Masson D, Lagrost L. Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme. *EMC-Endocrinol-Nutr.* 2010;7(2):1-16.
5. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations.* Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 328-55.
6. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(3):200-6.
7. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1183-94.
8. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12):1695-727.
9. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res.* 1997;38(11):2173-92.
10. Yu KC, Cooper AD. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2001;6:D332-54.
11. Reeskamp LF, Meessen ECE, Groen AK. Transintestinal cholesterol excretion in humans. *Curr Opin Lipidol.* 2018;29(1):10-7.
12. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, et al. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res.* 2000;41(2):305-18.
13. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1079-86.

14. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(2):151-7.
15. Lagor WR, Millar JS. Overview of the LDL receptor: relevance to cholesterol metabolism and future approaches for the treatment of coronary heart disease. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research.* 2010;3:1.
16. Voet D, Voet JG. *Biochimie. De Boeck Supérieur;* 2016. p. 940-1118.
17. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):431-8.
18. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, et al. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1111-25.
19. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):928-33.
20. Abifadel M, Rabes JP, Devillers M, Munnich A, Erlich D, Junien C, et al. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat.* 2009;30(4):520-9.
21. Poirier S, Mayer G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:1135-48.
22. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(5):413-9.
23. Schulz R, Schluter KD, Laufs U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Basic Res Cardiol.* 2015;110(2):4.
24. Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* 2011;12(12):1300-5.
25. Zhang K, Kaufman RJ. Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nat Cell Biol.* 2003;5(9):769-70.

26. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem*. 2013;288(26):18707-15.
27. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*. 1996;85(7):1037-46.
28. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1454-9.
29. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006;113(21):2548-55.
30. Luthi AJ, Lyssenko NN, Quach D, McMahon KM, Millar JS, Vickers KC, et al. Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2015;56(5):972-85.
31. Gautier T, Masson D, Lagrost L. Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*. 2011;3(4):267-72.
32. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) 2017, May 17 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
33. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
34. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
35. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):Ii15-9.
36. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
37. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95.

38. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
39. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):ii27-32.
40. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology.* 2007;58(5):513-22.
41. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.
42. Choy PC, Mymin D, Zhu Q, Dakshinamurti K, O K. Atherosclerosis risk factors: the possible role of homocysteine. *Mol Cell Biochem.* 2000;207(1-2):143-8.
43. Seidman MA, Mitchell RN, Stone JR. Pathophysiology of atherosclerosis. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease: Elsevier; 2014.* p. 221-37.
44. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2292-301.
45. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):191-203.
46. Silva M, Videira PA, Sackstein R. E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;8:1878.
47. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron.* 2006;37(3):208-22.
48. Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(3):209-15.
49. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25.
50. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2019:ehz455.

51. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344(8934):1383-9.
52. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1301-7.
53. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1001-9.
54. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1495-504.
55. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195-207.
56. Nicholls SJ, Ballantyne CM, Barter PJ, Chapman MJ, Erbel RM, Libby P, et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2078-87.
57. Ray KK, Cannon CP. The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(8):1425-33.
58. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, Robinson J, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1500-9.
59. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1489-99.
60. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-22.

61. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2097-107.
62. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, Cho L, Kastelein JJP, et al. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(22):2373-84.
63. Larsen LE, Stoekenbroek RM, Kastelein JJP, Holleboom AG. Moving Targets: Recent Advances in Lipid-Lowering Therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(3):349-59.
64. Ray KK, Wright RS, Kallend D, Koenig W, Leiter LA, Raal FJ, et al. Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1507-19.
65. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2387-97.
66. Tsujita K, Sugiyama S, Sumida H, Shimomura H, Yamashita T, Yamanaga K, et al. Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention: The Multicenter Randomized Controlled PRECISE-IVUS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(5):495-507.
67. Feingold KR. Triglyceride lowering drugs. *Endotext* [Internet]: MDText. com, Inc.; 2020.
68. Khan R, Spagnoli V, Tardif J-C, L'Allier PL. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;240(2):497-509.
69. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 2012;126(23):2739-48.
70. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
71. Dasegeb B, Kornreich D, McGuinn K, Okon L, Brownell I, Sackett DL. Colchicine: an ancient drug with novel applications. *Br J Dermatol*. 2018;178(2):350-6.
72. Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, Thompson PL. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):404-10.

73. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *New England journal of medicine*. 2019;381:2497-505.
74. Fredrickson DS. An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann Intern Med*. 1971;75(3):471-2.
75. Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, Hegele RA, Santos RD, Wierzbicki AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17093.
76. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta*. 2016;454:143-85.
77. Najam O, Ray KK. Familial Hypercholesterolemia: a Review of the Natural History, Diagnosis, and Management. *Cardiol Ther*. 2015;4(1):25-38.
78. Youngblom E, Pariani M, Knowles JW. Familial Hypercholesterolemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
79. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 2001;292(5520):1394-8.
80. Patni N, Ahmad Z, Wilson DP. Genetics and Dyslipidemia. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
81. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, Bonnefont-Rousselot D, Marques-Pinheiro A, Erik Berge K, et al. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum Mutat*. 2013;34(1):83-7.
82. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JC, Zelcer N, Kastelein JJ, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2014;115(6):552-5.
83. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial

Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2014;35(32):2146-57.

84. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013;381(9874):1293-301.

85. Hartgers ML, Ray KK, Hovingh GK. New Approaches in Detection and Treatment of Familial Hypercholesterolemia. *Curr Cardiol Rep.* 2015;17(12):109.

86. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science.* 1974;185(4145):61-3.

87. Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature reviews Cardiology.* 2019;16(1):9-20.

88. Bruikman CS, Hovingh GK, Kastelein JJP. Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Cardiol.* 2017;32(3):262-6.

89. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.* 1990;24:133-70.

90. Vega GL, Grundy SM. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1986;78(5):1410-4.

91. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(19):6919-23.

92. De Castro-Oros I, Pocovi M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet.* 2010;3:53-64.

93. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-6.

94. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley Jr TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *New England Journal of Medicine.* 2006;354(12):1264-72.

95. Marques-Pinheiro A, Marduel M, Rabes JP, Devillers M, Villegier L, Allard D, et al. A fourth locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps at 16q22.1. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1236-42.
96. Mourelatos Z, Gonatas JO, Nycum LM, Gonatas NK, Biegel JA. Assignment of the GLG1 gene for MGF-160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus, to chromosome 16q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1995;28(2):354-5.
97. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, et al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature.* 1995;373(6515):615-20.
98. Stieber A, Mourelatos Z, Chen YJ, Le Douarin N, Gonatas NK. MG160, a membrane protein of the Golgi apparatus which is homologous to a fibroblast growth factor receptor and to a ligand for E-selectin, is found only in the Golgi apparatus and appears early in chicken embryo development. *Exp Cell Res.* 1995;219(2):562-70.
99. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5600-9.
100. Olofsson A, Hellman U, Ten Dijke P, Grimsby S, Ichijo H, Moren A, et al. Latent transforming growth factor-beta complex in Chinese hamster ovary cells contains the multifunctional cysteine-rich fibroblast growth factor receptor, also termed E-selectin-ligand or MG-160. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 2):427-34.
101. Willmroth F, Beaudet AL. Structure of the murine E-selectin ligand 1 (ESL-1) gene and assignment to Chromosome 8. *Mamm Genome.* 1999;10(11):1085-8.
102. Consortium TU. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research.* 2018;47(D1):D506-D15.
103. Croul S, Mezitis SG, Stieber A, Chen YJ, Gonatas JO, Goud B, et al. Immunocytochemical visualization of the Golgi apparatus in several species, including human, and tissues with an antiserum against MG-160, a sialoglycoprotein of rat Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem.* 1990;38(7):957-63.

104. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 6):687-94.
105. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
106. Huang MC, Zollner O, Moll T, Maly P, Thall AD, Lowe JB, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1 are differentially modified by fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII in mouse neutrophils. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31353-60.
107. Wild MK, Huang M-C, Schulze-Horsel U, van der Merwe PA, Vestweber D. Affinity, kinetics, and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(34):31602-12.
108. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26(4):477-89.
109. Esposito M, Mondal N, Greco TM, Wei Y, Spadazzi C, Lin SC, et al. Bone vascular niche E-selectin induces mesenchymal-epithelial transition and Wnt activation in cancer cells to promote bone metastasis. *Nat Cell Biol.* 2019;21(5):627-39.
110. Miyaoka Y, Tanaka M, Imamura T, Takada S, Miyajima A. A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk). *Development.* 2010;137(1):159-67.
111. Yang T, Mendoza-Londono R, Lu H, Tao J, Li K, Keller B, et al. E-selectin ligand-1 regulates growth plate homeostasis in mice by inhibiting the intracellular processing and secretion of mature TGF-beta. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2474-85.
112. Yang T, Grafe I, Bae Y, Chen S, Chen Y, Bertin TK, et al. E-selectin ligand 1 regulates bone remodeling by limiting bioactive TGF-beta in the bone microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(18):7336-41.
113. Leiva M, Quintana JA, Ligos JM, Hidalgo A. Haematopoietic ESL-1 enables stem cell proliferation in the bone marrow by limiting TGFbeta availability. *Nat Commun.* 2016;7:10222.

114. Luo W, Wang H, Guo C, Wang J, Kwak J, Bahrou KL, et al. Haploinsufficiency of E-selectin ligand-1 is associated with reduced atherosclerotic plaque macrophage content while complete deficiency leads to early embryonic lethality in mice. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):363-7.
115. Yamamoto H, Kuroda N, Uekita H, Kochi I, Matsumoto A, Niinaga R, et al. E-selectin ligand-1 (ESL-1) is a novel adiponectin binding protein on cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(2):425-30.
116. Mensah GA, Wei GS, Sorlie PD, Fine LJ, Rosenberg Y, Kaufmann PG, et al. Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications. *Circ Res*. 2017;120(2):366-80.
117. Sidney S, Quesenberry CP, Jr., Jaffe MG, Sorel M, Nguyen-Huynh MN, Kushi LH, et al. Recent Trends in Cardiovascular Mortality in the United States and Public Health Goals. *JAMA Cardiol*. 2016;1(5):594-9.
118. Getz GS, Reardon CA. Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research. *Methods Mol Biol*. 2015;1339:1-16.
119. Dastani Z, Pajukanta P, Marcil M, Rudzicz N, Ruel I, Bailey SD, et al. Fine mapping and association studies of a high-density lipoprotein cholesterol linkage region on chromosome 16 in French-Canadian subjects. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(3):342-7.
120. Dawber TR, Moore FE, Mann GV. Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health*. 1957;47(4 Pt 2):4-24.
121. Lee SG, Oh J, Bong SK, Kim JS, Park S, Kim S, et al. Macrophage polarization and acceleration of atherosclerotic plaques in a swine model. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193005.
122. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:87-104.
123. Schierwagen R, Maybuchen L, Zimmer S, Hittatiya K, Back C, Klein S, et al. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep*. 2015;5:12931.
124. Yang L, Roh YS, Song J, Zhang B, Liu C, Loomba R, et al. Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology*. 2014;59(2):483-95.

125. Li A, Lee CM, Hurley AE, Jarrett KE, De Giorgi M, Lu W, et al. A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;12:111-22.
126. Wang Z, Lisowski L, Finegold MJ, Nakai H, Kay MA, Grompe M. AAV vectors containing rDNA homology display increased chromosomal integration and transgene persistence. *Mol Ther.* 2012;20(10):1902-11.
127. Kumar N, Stanford W, de Solis C, Aradhana, Abraham ND, Dao TJ, et al. The Development of an AAV-Based CRISPR SaCas9 Genome Editing System That Can Be Delivered to Neurons in vivo and Regulated via Doxycycline and Cre-Recombinase. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:413.
128. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147-59.

Annexes

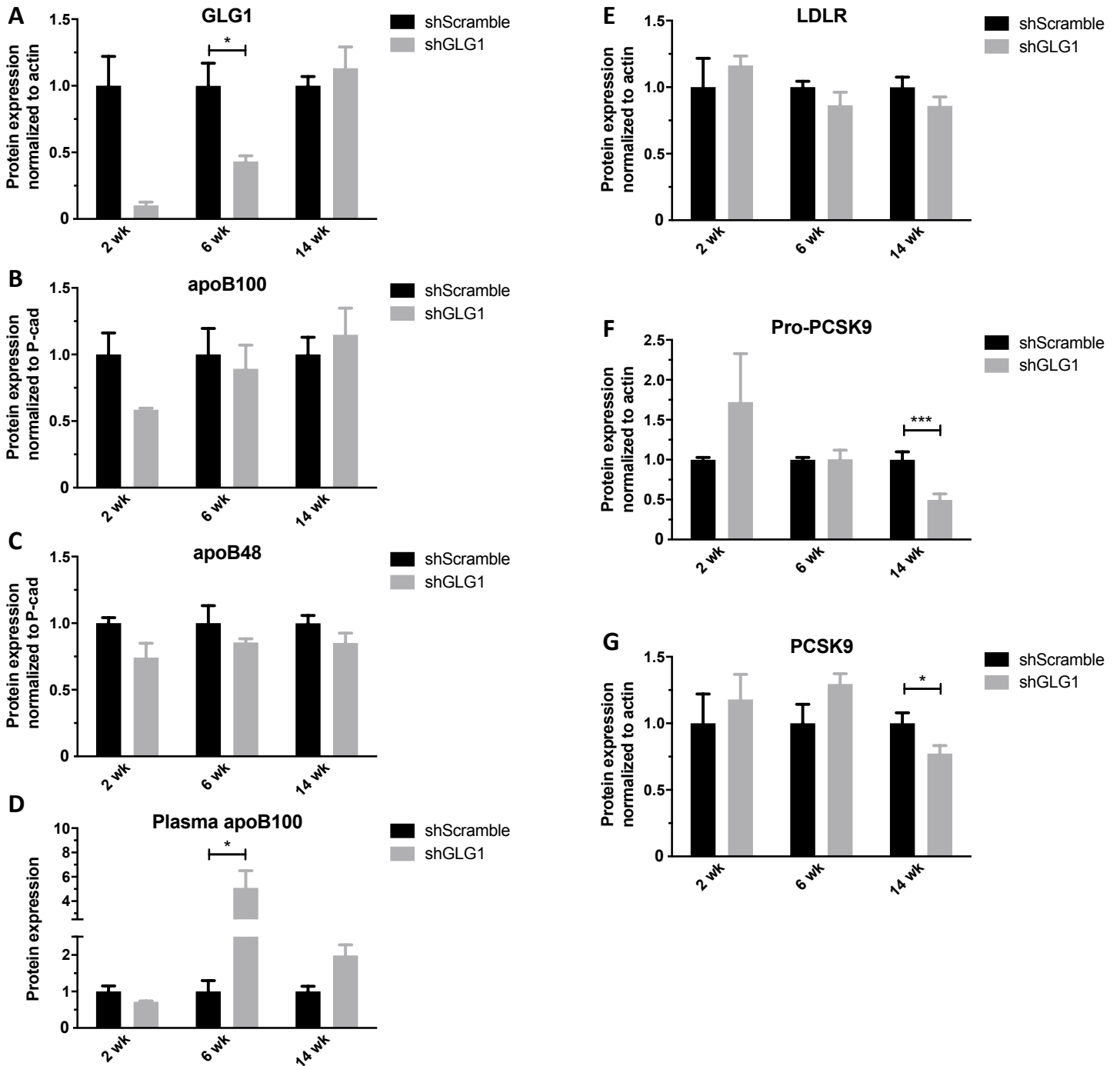


Figure A1. Analyses densitométriques de GLG1 (A), apoB100 (B), apoB48 (C), LDLR (E), pro-PCSK9 (F) et PCSK9 (G) dans le foie des souris et l'apoB100 (D) dans le plasma des souris.

Expression relative à 2 semaines (n=2-3/groupe), 6 semaines (n=3/groupe) et 14 semaines (n=11-13/groupe) des protéines GLG1, LDLR, pro-PCSK9 et PCSK9 normalisées à la β -actine et les protéines apoB100 et apoB48 normalisées à la pan-cadhérine (P-cad).

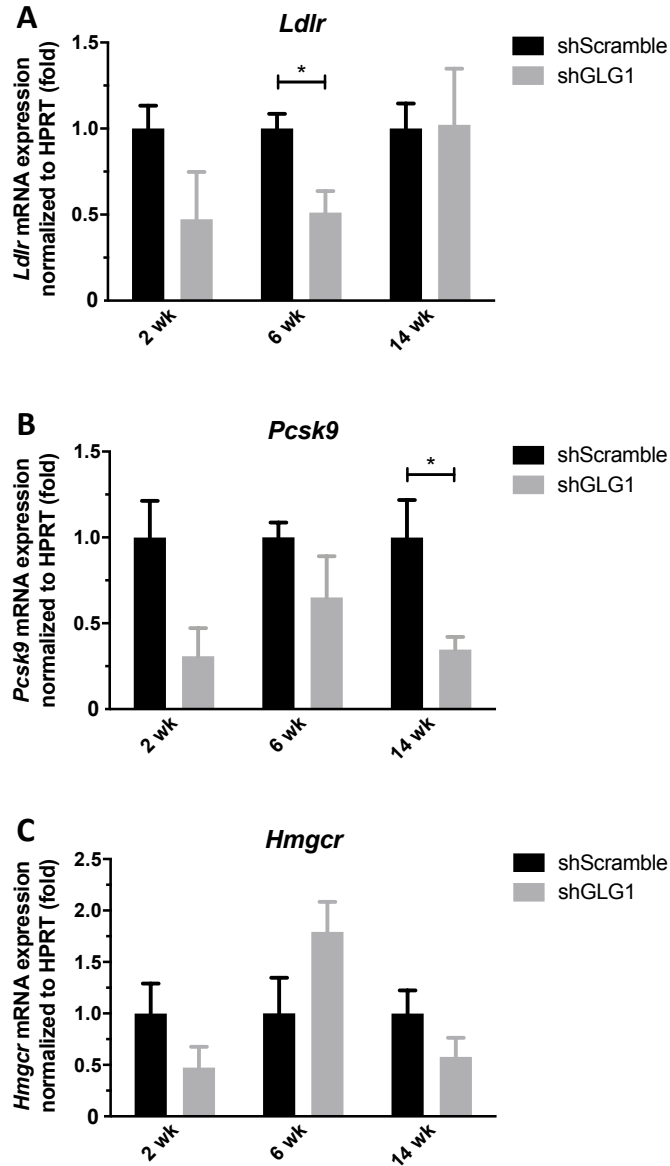


Figure A2. Expression relative de l'ARNm de LDLR (A), PCSK9 (B) et HMGCR (C) dans le foie des souris.

Expression relative de l'ARNm de LDLR (A), PCSK9 (B) et HMGCR (C) normalisée par le niveau d'ARNm de HPRT dans le foie des souris shGLG1 comparée à celle des souris shScramble à 2 semaines (n=2-3/groupe), 6 semaines (n=3/groupe) et 14 semaines (n=11-13/groupe) post-injection.