



**HAL**  
open science

# Aspects génotypiques et phénotypiques des dyslipidémies primitives rares affectant le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides

Mathilde Di Filippo

► **To cite this version:**

Mathilde Di Filippo. Aspects génotypiques et phénotypiques des dyslipidémies primitives rares affectant le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10244 . tel-01127238

**HAL Id: tel-01127238**

**<https://theses.hal.science/tel-01127238>**

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

**THESE**

UNIVERSITE LYON 1 – UNIVERSITE CLAUDE BERNARD  
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

**Diplôme de Doctorat**

Spécialité Biochimie

par

**Mathilde Charcosset Di Filippo**

**Aspects génotypiques et phénotypiques des dyslipidémies primitives rares  
affectant le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides**

Soutenue le 20 novembre 2014

Directeur de Thèse : Professeur Philippe MOULIN

Co-encadrant : Docteur Agnès SASSOLAS

**JURY**

Monsieur le Professeur Philippe MOULIN

Directeur de thèse

Madame le Professeur Laurence DUVILLARD

Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean Marc LACORTE

Rapporteur

Monsieur le Docteur Philippe LESNIK

Examineur

Monsieur le Professeur René VALERO

Examineur

Monsieur le Docteur Hubert VIDAL

Examineur

---

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans l'unité INSERM 1060 CarMeN (Cardiovasculaire Métabolisme Diabétologie Nutrition) dirigée par le **Dr Hubert Vidal** au sein de l'Equipe INgénierie et FONction des Lpides & lipoProtéines (INFOLIP) animée par le **Pr Philippe Moulin** et le **Pr Michel Lagarde** et dans l'U.F. Dyslipidémies-Cardiobiologie, Laboratoire de Biologie Médicale MultiSites du CHU de Lyon, Groupe Hospitalier Est, Centre de Biologie, dirigée jusqu'en 2013 par le Dr **Agnès Sassolas**. Je tiens donc vous remercier de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le **Dr Agnès Sassolas**, vous êtes à l'initiative de ce travail. Vous m'avez encadrée et accompagnée au cours de ces années passées à vos côtés qui ont été d'une richesse incroyable autant sur le plan des connaissances scientifiques qu'humaines. Vous avez su me guider durant les difficultés professionnelles et les épreuves de la vie. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée. Veuillez recevoir par ce travail ma profonde admiration, ma sincère gratitude et mon amitié.

Je remercie bien évidemment le **Pr Philippe Moulin** d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Vos conseils et votre disponibilité sans faille ont permis l'aboutissement de ce projet. Je ne ferai pas d'autre thèse mais serai heureuse de pouvoir continuer à travailler avec vous. Merci pour votre aide et votre soutien bienveillant. Veuillez recevoir le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie le **Pr Laurence Duvillard** et le **Pr Jean Marc Lacorte** pour avoir pris le temps d'apporter votre regard d'expert en lipidologie et de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs. Merci d'avoir si aimablement accepté de juger ce travail. Veuillez croire à ma plus grande estime.

Je remercie le **Dr Philippe Lesnik** pour l'intérêt porté à ce travail et pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Veuillez croire en mon plus profond respect.

Je remercie le **Pr René Valéro** d'avoir accepté de juger ce travail. J'espère que nous pourrons continuer à collaborer via l'exploration de patients. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Je remercie le **Dr Hubert Vidal** d'avoir accepté de juger ce travail et pour votre accueil toujours chaleureux. J'espère pouvoir continuer mes travaux de recherche au sein de l'unité. Soyez assuré de mon profond respect.

Je remercie **toutes les personnes qui ont été indispensables à la réalisation de ce travail**, fruit d'une collaboration multidisciplinaire (biologie, hépatogastroentérologie, endocrinologie, ...), chercheurs et personnels hospitaliers :

- le **Pr Alain Lachaux** et le **Dr Noël Peretti** : pour votre collaboration et votre investissement pour ce travail. Vous m'avez donné l'opportunité d'étudier les hypocholestérolémies familiales, maladies extrêmement rares, grâce à votre recrutement de patients. Je souhaite que notre collaboration se poursuive au-delà de ce travail.

- les **Drs Sybil Charrière, Christophe Marçais** et **Cyrielle Causy** pour votre implication sur l'étude des hypertriglycéridémies, ainsi que les médecins de l'unité d'Endocrinologie adulte (**Drs Laure Groisne, Myriam Moret, ...**)

- le **Dr Marie Elisabeth Samson Bouma**, pour ton investissement dans l'étude des patients présentant une hypocholestérolémie ainsi que **tous les médecins qui ont contribué au recrutement des patients** français, italiens, néerlandais, ...



- le **Dr Dominique Bozon** pour vos connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire (les mutations les plus exotiques ne vous résistent pas), pour vos précieux conseils et également pour votre initiation au Criollo...

- les équipes qui s'occupent des plateaux de Biologie Moléculaire et de NGS : merci aux biologistes (**Véronique, Gilles, ...**) et techniciens : votre investissement dans ces structures est indispensable.

Je remercie bien évidemment toute **l'équipe Dyslipidémies** : **Sabrina, Martine, Chantal, Véronique, Séverine, Marjorie, Muriel**. Vous avez contribué à ce travail, directement ou indirectement. J'apprécie votre soutien quotidien, votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard, je sais que je peux compter sur vous. Une dédicace particulière également à **Oriane Marmontel**, qui m'« assiste » maintenant depuis un an : tu prends ton travail quotidien à cœur et tu t'es lancée également dans l'aventure de LA thèse de sciences... Courage ! Une pensée également pour l'équipe cardiobiologie, notre histoire ensemble commence juste... C'est dans la difficulté que l'union fait la force, Maître GLIMS en est la preuve.

Je remercie également le **Pr Robert Rousson** : votre phrase préférée « et ta thèse ? » m'a incitée à finaliser ce travail. Maintenant, je redoute la phrase suivante... Merci également à tous mes collègues biologistes du CR de Biochimie encore en activité ou déjà partis à la retraite.

Une pensée pour toute **l'équipe du PTPP** avec laquelle j'ai passé quelques années entre pannes, rapports d'intervention, contrôles de qualités... et fou-rires. J'ai beaucoup appris avec vous et passé de bons moments.

Enfin, un grand merci à **Véronique R** (ma voisine de bureau, ou de chocolaterie plutôt), **Isa, Régine, Oriane** (encore), **Laurence** ... Nos pauses déjeuner (et chocolat), souvent studieuses mais toujours amicales sont indispensables, merci pour votre soutien et votre amitié.

**A Christian, Lucas et Angelina** Je vous dois tous ces moments de Bonheur. Christian, merci pour ton soutien indéfectible. Lucas, Angelina, vous êtes mes rayons de soleil. Je sais maintenant ce que je serais sans vous, vous êtes mes trésors, vous êtes ma vie. Promis, la thèse c'est fini (fini la biblio dans la voiture, sur la plage, dans le jardin, les parcs, la nuit), maintenant vivent les vacances sans articles ! Recevez ici tout mon amour.

**A mes parents, ma sœur Gaëlle et mon frère Rémi, ma famille et ma belle-famille** Vous m'avez toujours soutenue et encouragée dans mes choix. Je ne sais comment vous remercier pour votre aide. Recevez toute mon affection.

**A tous mes amis**, et particulièrement Sandrine et nos footings (il va falloir qu'on sy remette, ça me manque !), Jérôme Claire et leur tribu (mes pingouins de Valence préférés), Céline et Marielle et leurs petites familles, David N (dit Dr Di Nabetto)... Merci à tous pour votre amitié.

A ceux qui ne sont plus là et qui ont tellement compté...

## **Aspects génotypiques et phénotypiques des dyslipidémies primitives rares affectant le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides**

Les anomalies du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG), les chylomicrons et les VLDL exposent à des hypocholestérolémies lors d'un défaut de sécrétion et à des hypertriglycéridémies (HTG) majeures entraînant un risque athéromateux et de pancréatites aiguës lors de l'altération de leur clairance.

Nous avons diagnostiqué des patients présentant un défaut génétique de sécrétion des LRTG au décours de maladie de rétention des chylomicrons, d'abetalipoprotéinémie et d'hypobetalipoprotéinémie homozygote, causées respectivement par des mutations sur les gènes *SARIB*, *MTTP* et *APOB*. Nous avons étudié le phénotype des 158 patients publiés avec mutation délétère et mis en évidence des différences portant principalement sur la stéatose hépatique, l'insulinorésistance et l'obésité.

Nous avons également mis au point une méthode d'évaluation de l'activité post héparinique de la lipoprotéine lipase (LPL) par mesure de la lipolyse des triglycérides des VLDL *in vitro*, permettant l'exploration phénotypique des patients présentant une HTG sévère. Nous avons mis en évidence des activités LPL augmentées chez des patients présentant pourtant des antécédents d'HTG sévère et des déficits chez des patients ne présentant pas de mutation identifiable du gène *LPL*, laissant supposer l'existence de facteurs additionnels modulant l'expression ou l'activité de la LPL.

Enfin des interrelations des multiples gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides modulent le phénotype. Elles soulèvent l'intérêt de l'exploration simultanée des principaux gènes impliqués dans les dyslipidémies, telle qu'elle sera effectuée par NGS, pour une meilleure compréhension de leur physiopathologie.

**Mots clés en français:** VLDL, chylomicrons, Sar1b, MTP, MTTP, ApoB, abetalipoprotéinémie, hypobetalipoprotéinémie, stéatose, NASH, lipolyse, LPL, activité LPL post-héparinique

### **Intitulé et adresse de l'unité ou du laboratoire où la thèse a été préparée**

Equipe "INGénierie et FONction des LIpides & lipoProtéines (INFOLIP)" (Equipe 4) Unité INSERM 1060 CarMeN (Cardiovasculaire Métabolisme Diabétologie Nutrition)

U.F. Dyslipidémies-Cardiobiologie, Laboratoire de Biologie Médicale MultiSites du CHU de Lyon, Groupe Hospitalier Est, Centre de Biologie, 59, boulevard Pinel, 69 677 BRON Cédex

## **Genotypic and phenotypic features of rare primitive dyslipidemias with disorder of triglyceride-rich lipoproteins metabolism**

Abnormal metabolism of triglyceride-rich lipoproteins (LRTG), chylomicrons and VLDL, can result in hypocholesterolemia in case of impaired secretion, or severe hypertriglyceridemia (HTG) and increased risk of atheroma and acute pancreatitis if clearance is affected.

We explored patients suffering from genetic defect in the LRTG secretion (chylomicron retention disease, abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia) and identified mutations on respectively *SARIB*, and *MTTP* and *APOB* gene. Then, we analysed the phenotype of 158 previously published patients with deleterious mutation (i.e. reported cases added to our cohort) and were able to highlight some specific differences like hepatic steatosis, insulin resistance and obesity.

Furthermore we developed an assay to evaluate the lipoprotein lipase (LPL) functionality by measuring the triglyceride-VLDL lipolysis in vitro, and provide a reliable phenotypic exploration for patients with past history of severe hypertriglyceridemia. We found an increased LPL activity in some patients with severe hypertriglyceridemia but conversely showed deficits in other patients free from mutation on *LPL* gene. These results lead to hypothesize that additional factors might contribute to modulate the expression or the activity of LPL.

Finally multiple genes of triglycerides metabolism interact together to additionally modulate phenotype. Of high interest is therefore the simultaneous exploration of the key genes involved in dyslipidemia, as provided by the new generation sequencing (NGS), for better understanding of all pathophysiological mechanisms.

**Key words** VLDL, chylomicron, Sar1b, MTP, MTTP, ApoB, abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, steatosis, NASH, fibrosis, lipolysis, LPL, post-héparin LPL activity

## **PREMIERE PARTIE : METABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES:**

### **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES, ENJEUX DU TRAVAIL**

**13**

<b>I. SYNTHÈSE DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES</b>	<b>14</b>
<i>I.1. Protéines indispensables à la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides</i>	<i>14</i>
I.1.1. L'apolipoprotéine B (ApoB)	14
I.1.2. La MTP	19
I.1.2.1. MTTP	19
I.1.2.2. Rôle des protéines de la superfamille PDI	25
I.1.3. Protéines impliquées dans le transport des lipoprotéines entre le RE et le Golgi	26
I.1.3.1. Transport antérograde, rôle de la protéine Sar1b	26
I.1.3.2. Le transport rétrograde	32
I.1.4. Autres protéines impliquées dans la lipidation des chylomicrons et des VLDL, rôle des gouttelettes lipidiques (lipid droplets)	33
I.1.4.1. Perilipine 2	34
I.1.4.2. Cideb (Cell death-inducing DFF45-like effector b)	35
I.1.4.3. ARFRP1 (ADP-ribosylation factor related protein 1)	36
I.1.4.4. FABP (Fatty Acid Binding Protein)	37
I.1.4.5. ApoA-IV	38
I.1.4.6. ApoC-III	39
<i>I.2. Synthèse intestinale des chylomicrons : la voie exogène</i>	<i>41</i>
I.2.1. Lipoprotéines intestinales : chylomicrons	41
I.2.2. Absorption, synthèse et sécrétion des composants des chylomicrons dans les entérocytes	41
I.2.2.1. Triacylglycérides	41
I.2.2.2. Le cholestérol	42
I.2.3. Formation des chylomicrons	42
I.2.3.1. Synthèse d'ApoB48, protéines impliquées dans le mRNA editing	43
I.2.3.2. Reticulum endoplasmique	44
I.2.3.3. Transport entre le reticulum endoplasmique et le Golgi	45
I.2.3.4. Le Golgi	47
I.2.3.5. Sécrétion des chylomicrons	47
I.2.4. Facteurs influençant la sécrétion des lipoprotéines intestinales	47
<i>I.3. Synthèse hépatique des VLDL : la voie endogène</i>	<i>48</i>
I.3.1. Etapes de la synthèse	48
I.3.2. Régulation de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL	52
I.3.2.1. Voie ERAD : dégradation par le protéasome et autophagie	52
I.3.2.2. Voie UPR et stress dans le reticulum endoplasmique	52
I.3.2.3. Régulation par la quantité de lipides disponibles	53
I.3.2.4. Régulation par l'insuline	53
<i>I.4. Comparaison de la synthèse et de la sécrétion des chylomicrons et des VLDL</i>	<i>55</i>
<b>II. CATABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN APOB</b>	<b>57</b>
<i>II.1. Protéines indispensables au catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides</i>	<i>57</i>
II.1.1. La lipoprotéine lipase (LPL)	57
II.1.2. GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1)	60
II.1.3. Apolipoprotéine A-V (ApoA-V)	62

II.1.4. ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III	63
II.1.5. ApoE	64
II.1.6. ANGPTL3 et ANGPTL4 (angiopoietin-like protein 3 et 4)	64
II.1.7. CREB-H	66
II.2. <i>La lipolyse</i>	66
II.2.1. Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière capillaire	67
II.2.2. Margination des LRTG	68
II.2.3. Hydrolyse des LRTG	68
II.2.1. Devenir des LRTG hydrolysés	70
II.2.1.1. Capture hépatique des remants	70
II.2.1.2. Conversion des IDL en LDL	71
III. ENJEUX DU TRAVAIL	73
<b>DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DES TRAVAUX</b>	<b>75</b>
I. HYPOCHOLESTEROLEMIES PAR MUTATIONS SUR LES GENES <i>SAR1B</i> , <i>MTTP</i> ET <i>APOB</i>	76
I.1. <i>Article 1</i>	78
I.2. <i>Article 2</i>	89
I.3. <i>Article 3</i>	100
II. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MESURE D'ACTIVITE LPL	128
II.1. <i>Article 4</i>	129
III. LE SEQUENÇAGE HAUT DEBIT REVELE DES INTERACTIONS GENE/GENE ET UNE MODULATION DU PHENOTYPE DES HYPERTRIGLYCERIDEMIES: A PROPOS D'UN CAS, RESULTATS PRELIMINAIRES	141
<b>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION</b>	<b>146</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>171</b>
I.1. <i>Annexe 1</i>	172
I.2. <i>Annexe 2</i>	179
I.3. <i>Annexe 3</i>	192
I.4. <i>Annexe 4</i>	214
I.5. <i>Annexe 5</i>	215
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>216</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Synthèse et dégradation de l'ApoB par la voie ERAD [17] .....	17
Figure 2 : Modèle du transport antérograde et rétrograde dans les cellules de mammifère [143]. .....	26
Figure 3 : Modèle de l'interaction Sar1b-Sec23 mettant en évidence la localisation des acides aminés différents entre Sar1a et Sar1b [7] .....	27
Figure 4 : ARNm de <i>SAR1B</i> ( <i>SARA2</i> ) et <i>SAR1A</i> ( <i>SAR1</i> ) dans les tissus humains [7]. .....	28
Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la protéine Sar1b humaine. ....	29
Figure 6 : Modèle illustrant la sortie des protéines du RE [148]. .....	30
Figure 7 : Alignement de Sar1b H.s. ( <i>Homo sapiens</i> ) et Sar1p S.c. ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) : déduction des domaines fonctionnels à partir des études publiées. ....	31
Figure 8 : Formation des gouttelettes lipidiques (lipid droplets, LDs) dans les cellules sécrétant des lipoprotéines. [112] .....	34
Figure 9 : Illustration schématique du rôle de la protéine Cideb dans la lipidation et la maturation des VLDL[209]. .....	35
Figure 10 : Modèle de l'assemblage des chylomicrons [206] .....	45
Figure 11 : Modèle de l'itinéraire de FABP1 du cytosol à la membrane du RE. [282] .....	46
Figure 12 : Protéines et facteurs lipidiques affectant l'assemblage et la sécrétion des VLDL. [99] .....	49
Figure 13 : Modèle en deux étapes de l'assemblage des lipoprotéines contenant de l'ApoB dans le RE [112] .....	50
Figure 14 : Assemblage des VLDL et dégradation de l'ApoB [56] .....	51
Figure 15 : La régulation de la production hépatique des VLDL1 par l'insuline chez la souris dépend de FoxO1 [119] .....	54
Figure 16 : Synthèse et sécrétion des chylomicrons et des VLDL .....	56
Figure 17 : Hypothèse du mécanisme d'inhibition de la LPL par ANGPTL4 [464] .....	67
Figure 18 : Hydrolyse périphérique des triglycérides [380] .....	69
Figure 19 : Capture hépatique des remnants de chylomicrons [487] .....	71
Figure 20 : Electrophorèse de l'apoB .....	142

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Facteurs régulant l'expression de la MTTP .....	22
Tableau 2 : Principales protéines impliquées dans la synthèse et la sécrétion des chylomicrons et des VLDL .....	55

## Liste des abréviations

ABL	abetalipoprotéinémie
ACAT	acyl-coenzyme A (CoA):cholesterol acyltransferases
ACF	Apobec-1 complement factor
AG	Acides gras
AGE	Acides gras essentiels
AGL	Acides gras à longue chaîne
ANGPTL	angiopoetin-like protein
ApoA1	apolipoprotéine A1
ApoA-IV	apolipoprotéine A-IV
ApoA-V	apolipoprotéine A-V
ApoB	apolipoprotéine B
ApoC	apolipoprotéine C
ApoE	apolipoprotéine E
ARF1	ADP Ribosylation Factor 1
ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1
ATGL	adipose triglyceride lipase
CD36	CD36 (CD36 molecule (thrombospondin receptor))
CE	esters de cholestérol
CETP	Cholesteryl Ester Transfert Protein
ARNm	ARN messenger
CGI-58	comparative gene identification 58
Cideb	Cell death-inducing DFF45-like effector b
CLSD	dysplasie cranio-lenticulo-suturale
CM	chylomicrons
CMRD	Maladie de rétention des chylomicrons (Chylomicron Retention Disease)
COP (vésicule)	coatamer protein (vesicule)
CREB-H	Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H
DAG	diacylglycérol
DGAT	diacylglycérol transférase
ERAD	Dégradation associée au reticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation)
ERES	Sites de sortie du reticulum endoplasmique (ER exit sites)
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FABP1=L-FABP	Fatty Acid Binding Protein "hépatique"
FABP2=I-FABP	Fatty Acid Binding Protein intestinale
FATP	Fatty acid transporter (ancienne nomenclature), solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
FDB	Familial ligand-Defective apolipoprotein B
FHBL	Hypobetalipoprotéinémie familiale
FIT	Fat storage-inducing transmembrane proteins
GAG	glycosaminoglycane
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1
Ho-FHBL	Hypobetalipoprotéinémie familiale homozygote ou hétérozygote composite
HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycan
HSL	hormone-sensitive lipase
HTG	hypertriglycémie
LCAT	Lecithin Cholesterol AcylTransferase
KO (souris)	souris génétiquement modifiée pour déléter un gène (knock out)

LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	récepteur des LDL
LP	lipoprotéine
LPL	lipoprotéine lipase
LRTG	lipoprotéines riches en triglycérides
MGAT	monoacylglycerol O-acyltransferase
MTTP	Microsomal Triglyceride Transfert Protein
NAFLD	stéatose hépatique non liée à alcool (non-alcoholic fatty liver disease)
NDST1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminy) 1
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NPC1L1	NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1
ns	non significative
PCTV	Vésicule de transport des chylomicrons
PDI	Protéine Disulfide Isomérase, maintenant appelée P4HB
PERPP	Voie de dégradation post endoplasmique et avant sécrétion post-endoplasmic reticulum pre-secretory proteolytic process
PG-VTV	post TGN VLDL transport vesicle : vésicules de transport des VLDL entre le Golgi et la membrane plasmique
PH4B	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (ancienne nomenclature PDI)
PKC $\zeta$	phosphokinase C $\zeta$
PL	phospholipides
PLTP	Phospholipid transfer protein
PNPLA3	patatin-like phospholipid domain containing protein 3
RE	reticulum endoplasmique
SULF2	sulfatase 2
SVIP	small VCP /p97 interactive protein
TAG	triacylglycérol
TCC	triglycérides avec acides gras à chaîne courte
TCL	triglycérides avec acides gras à chaîne longue
TCM	triglycérides avec acides gras à chaîne moyenne
TG	triglycérides
TM6SF2	transmembrane 6 superfamily member 2
VAMP7	vesicle-associated membrane protein 7,
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VTC	Vesicular-tubular Cluster : compartiment entre le RE et le Golgi
VTV	vésicule de transport des VLDL
v-SNARE	vesicle associated soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
WT (souris)	souris non modifiée génétiquement (wild type)



## Introduction

Les lipoprotéines riches en triglycérides incluent les chylomicrons (CM), synthétisés par l'enterocyte après absorption du cholestérol et des acides gras, et les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), synthétisées par l'hépatocyte et impliquées dans le transport endogène du cholestérol et la redistribution des triglycérides produits par le foie. Les mécanismes régulant le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides sont importants à comprendre puisqu'ils sont directement impliqués dans plusieurs pathologies humaines et indirectement dans de nombreuses pathologies chroniques lors de la surnutrition.

Un défaut de synthèse entraîne une hypocholestérolémie et un engorgement en lipides des organes producteurs de lipoprotéines (intestin, foie). C'est ce qu'on observe dans l'abetalipoprotéïnémie (OMIM#200100), l'hypobetalipoprotéïnémie (FHBL 1, OMIM#615558) homozygote ou hétérozygote composite et la maladie de rétention des chylomicrons (OMIM#246700) causées respectivement par des mutations sur les gènes *MTTP*, *APOB* et *SAR1B* [1-10]. Ces maladies entraînent une malabsorption sévère des graisses associée à un retard de croissance dans l'enfance et une stéatose hépatique [11]. La découverte des protéines impliquées dans ces pathologies rares a permis de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires impliqués dans la synthèse des chylomicrons et des VLDL. Par ailleurs, des molécules ciblant deux de ces protéines, l'apolipoprotéine B (ApoB) et la MTTP (Microsomal Triglyceride Transfert Protein), sont désormais proposées comme traitement hypocholestérolémiant [12-16]. Il nous a donc semblé pertinent d'évaluer l'impact de l'absence de ces protéines à long terme sur l'organisme humain. Pour cela nous avons étudié le phénotype de tous les patients présentant ces maladies rares, en associant les malades de notre cohorte et ceux publiés porteurs de mutations délétères.

Une augmentation de la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides ou une diminution de leur catabolisme peut augmenter leur concentration et accroître le risque de pancréatite et celui de développer de l'athérosclérose [17]. L'hyperlipoprotéïnémie de type I (OMIM #238600) est une maladie rare résultant de l'accumulation de chylomicrons. Des mutations sur les gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, impliqués dans la lipolyse des VLDL et des chylomicrons ont été retrouvées lors des hyperchylomicronémies sévères primitives mais dans seulement environ 50% des cas [18]. Il nous a donc semblé indispensable de développer des techniques permettant l'exploration phénotypique de ces patients qui présentent des dyslipidémies majeures inexplicées et en particulier une méthode de mesure de l'activité LPL post héparinique. L'évaluation de cette activité permet ainsi de

déterminer si les patients présentent un défaut d'activité lipolytique impliquant la LPL elle-même.

Le métabolisme des triglycérides est donc situé à l'interface entre la gastro-entérologie (malabsorptions intestinales et stéatose hépatique, risque de pancréatite), l'endocrinologie, la nutrition et la cardiologie. Il fait intervenir des régulations complexes et intriquées, avec de classiques interaction gene-environnement mais aussi des interactions gène/gène sources d'aggravation ou de compensation comme déjà montré pour des normalisations de bilan lipidique chez des patients présentant une mutation hypercholestérolémiant sur le gène *RLDL* et une mutation hypocholestérolémiant sur le gène *APOB* [19, 20].

Dans une première partie de rappels bibliographiques, nous détaillerons le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides et les enjeux de notre travail. Dans une deuxième partie, nous détaillerons nos travaux et leur contexte, et nos résultats seront discutés dans une troisième partie.

**Première partie : Métabolisme des lipoprotéines  
riches en triglycérides: rappels bibliographiques,  
enjeux du travail**

Nous allons tout d'abord rappeler les principaux éléments de la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides, en détaillant les spécificités liées à chaque lieu de production puis nous exposerons les mécanismes impliqués dans leur catabolisme. Nous terminerons cette partie par les enjeux de notre travail.

## **I. Synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides**

Les lipoprotéines permettent la solubilisation des lipides hydrophobes tels que les triglycérides, et leur transport *via* le système sanguin jusqu'aux différents organes et tissus. La synthèse et la sécrétion des lipoprotéines sont assurées par l'intestin (chylomicrons) et le foie (VLDL); les mécanismes impliqués ne sont pas totalement élucidés. La synthèse de ces lipoprotéines implique des protéines et des processus communs dans les deux organes que nous détaillerons dans un premier paragraphe, puis nous expliciterons les éléments spécifiques de chaque type cellulaire dans les paragraphes I.2. et I.3. et les comparerons dans le paragraphe I.4.

### **I.1. Protéines indispensables à la synthèse des lipoprotéines riches en triglycérides**

#### **I.1.1. L'apolipoprotéine B (ApoB)**

Chez l'Homme, il existe un seul gène codant l'ApoB (OMIM+107730), situé sur le chromosome 2 (2p23-2p24) et découvert entre 1985 et 1986 [21]. Ce gène code pour deux transcrits, selon le type cellulaire, grâce au mécanisme de **RNA editing**, récemment revu par V. Blanc et al [22]. Dans les hépatocytes, ce gène de 45 kb est transcrit en un seul ARNm de 15kb qui donne une protéine de 4 536 acides aminés avec une masse de 517-550 kDa : l'ApoB100 [23, 24]. Dans les cellules intestinales humaines, la majorité de l'ARNm de l'ApoB est 'édité' par désamination de la cytidine 6 666 (base 6538 sur la séquence NM\_000388.2, selon la nouvelle nomenclature) en uridine, ce qui conduit à un codon stop prématuré [22, 25]. L'ARN édité est traduit en un polypeptide de 2 152 acides aminés (264 kDa approximativement) [23], appelé ApoB48 car il correspond à 48% de l'ApoB100 (extrémité N terminale). Cette capacité à synthétiser de l'ApoB48 sera détaillée dans le chapitre concernant la synthèse des chylomicrons.

Le gène code pour une proprotéine comportant un peptide signal de 27 acides aminés qui oriente la synthèse de l'ApoB dans le RE [26]. Les structures tridimensionnelles de l'ApoB-100 et de l'ApoB-48 ne sont pas connues au niveau atomique (taille énorme, hydrophobicité) mais des modélisations ont été réalisées et montrent que l'ApoB-100 est

composée de 5 domaines : NH<sub>3</sub>-β $\alpha$ 1-β1-α2-β2-α3-COOH [27, 28]. De plus, une structure a été modélisée pour les 930 acides aminés N-terminaux, par analogie avec celle de la lipoviteline de lamproie [27, 29]. Dans ce modèle, le domaine β $\alpha$ 1 (jusqu'à ApoB20) consiste en un tonneau β (« β-barrel ») (résidus 1-264), un paquet d'hélices α (« α-bundle) (résidus 292-593), suivi des deux feuillets β amphiphatiques appelés feuillet C (sheet C) (résidus 611-782) et feuillet A (sheet A) (résidus 783-930) qui forment une poche de liaison des lipides. Une modélisation a été réalisée en 2007 par A Krisko and C Etchebest, montrant une structure en 8 domaines [30].

L'extrémité N-terminale (3.4%, acides aminés 28 à 179) et les résidus entre 10 et 13% (430-570) sont impliqués dans la liaison de l'ApoB à sa protéine chaperone, la MTTP [29, 31]. La partie N-terminale (20.5%) a la capacité de remodeler les membranes phospholipidiques en complexes protéines-lipides [32]. Le domaine compris entre B51 et B53% est également important pour la sensibilité à la MTTP : la sécrétion des formes tronquées de taille inférieure à 51% est moins influencée par l'inhibition de la MTTP [33]. La liaison ApoB/MTTP est indispensable pour que l'ApoB ait une structure tridimensionnelle correcte pendant l'assemblage/sécrétion des chylomicrons et des VLDL [31]. Le domaine β $\alpha$ 1 est également impliqué dans la liaison aux scavenger récepteurs des macrophages [34] et à la lipoprotéine lipase [35]. Ce domaine possède une fonction de liaison des phospholipides [36] et joue un rôle dans l'organisation du noyau lipidique [28]. Le domaine β1 (acides aminés 827-1880, B20-B41%) comporte principalement des feuillets β amphiphatiques et est impliqué dans la liaison irréversible des lipides [37, 38]. Les deux hélices α2 (ApoB42-ApoB55) et α3(ApoB90-ApoB100) pourraient représenter une région flexible permettant le recrutement du core lipidique [39]. L'ApoB48 comprend deux des domaines de l'ApoB100 : le domaine globulaire β $\alpha$ 1 qui s'associe avec les lipides mais est incapable de former des lipoprotéines et le domaine β1 nécessaire pour la formation de lipoprotéines [40]. L'ApoB100 est le ligand pour le récepteur des LDL (LDLR) cependant cette liaison n'est possible qu'après conversion des VLDL en LDL. Le domaine de liaison au LDLR a été identifié tout d'abord entre les résidus 3386 et 3394 (nomenclature incluant le peptide signal) [28, 41, 42] puis d'autres domaines sont apparus comme importants pour la liaison au LDLR : 2820-3202 et 3243-3498 [30]. L'extrémité C-terminale (20%) de l'ApoB100 inhibe la liaison VLDL Ldlr [42].

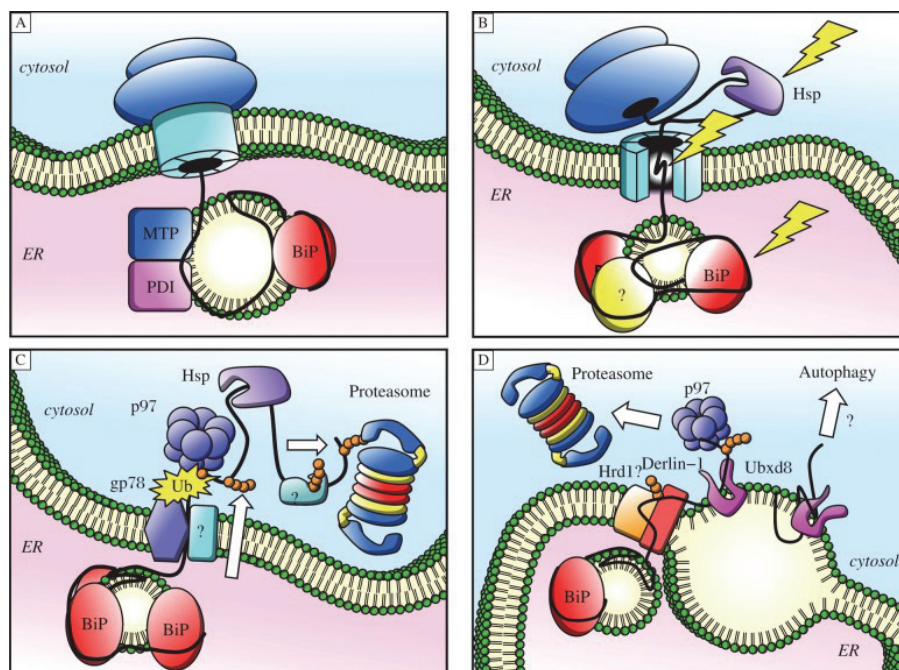
L'ApoB subit plusieurs modifications post-traductionnelles : des ponts disulfure, des N-glycosylations, et des palmitoylations. Les ponts disulfure se forment dans le reticulum endoplasmique et sont indispensables au repliement correct et à la sécrétion de l'ApoB [43-

45]. Il existe 20 sites de glycosylation potentiels, dont 16 résidus asparagine conjugués avec des oligosaccharides [41, 46]. Ces sites de glycosylation sont particulièrement importants pour l'assemblage et la sécrétion des VLDL [46]. L'ApoB des LDL plasmatiques est également palmitoylée [47] et cette palmitoylation est importante pour la sécrétion et le transport des triglycérides [48].

Il existe une régulation transcriptionnelle de l'ApoB : l'extrémité 5'UTR favorise la traduction de l'ApoB alors que l'extrémité 3' l'affecte négativement, probablement en diminuant la stabilité de l'ARNm [49]. La régulation transcriptionnelle en 3' est spécifique des tissus et des espèces. Dans les cellules HepG2 (lignée cellulaire d'hépatome d'humain), il existe plusieurs sites de régulation : un cis element entre -3211 et -1802 qui régule négativement la transcription de l'ARNm de l'ApoB, le promoteur proximal entre -898 et +1 (contenant une TATA box et des sites de liaison pour des facteurs de transcription spécifiques du foie, hepatocyte nuclear factor-3 et hepatocyte nuclear factor-1), l'intron 2 (principale activité enhancer, site de liaison de hepatocyte nuclear factor-1 et C/Ebp), l'intron 3 (activité enhancer). Dans les cellules CaCo-2 (adénocarcinome de colon humain), le promoteur proximal et l'intron 2 modifient l'expression, mais ce n'est pas le cas dans les cellules intestinales de souris. Dans les cellules intestinales il existe d'autres cis elements : un enhancer de 315pb plus de 55kb avant le codon de début de transcription et une séquence régulatrice qui stimule la transcription (enhancer) de 485pb qui lie l'HNF4/ARP-1. De plus la traduction de l'ApoB est diminuée par l'insuline : cette régulation implique la région 5'UTR [50].

L'ApoB est synthétisée dans le reticulum endoplasmique (RE) rugueux. Pendant la traduction du peptide signal de 24-27 acides aminés, la chaîne d'ApoB naissante associée aux ribosomes est transloquée dans le reticulum endoplasmique via un translocon, la protéine Sec61 [51]. L'ApoB s'associe à l'hétérodimère PDI-MTTP et subit une lipidation au fur et à mesure de sa synthèse et de sa translocation dans le RE [52-55]. La sécrétion de l'ApoB est contrôlée, principalement par une régulation de sa dégradation [56], qui touche une quantité importante de l'ApoB synthétisée : des études sur les hépatocytes de rat ont montré que seulement 36% de l'ApoB100 et 60% de l'ApoB48 nouvellement synthétisées sont sécrétées [57]. *In vitro*, trois sites de dégradation ont été décrits [51]. Le premier, faisant intervenir le LDLR, est une voie de recapture de l'ApoB : l'ApoB, quand elle est sécrétée, peut rencontrer un LDLR, et être internalisée et dégradée par le lysosome [58]. Le LDLR peut également interagir avec l'ApoB avant la sécrétion des VLDL [59]. Le deuxième, lorsque l'ApoB est mal repliée et/ou lorsque la quantité le lipide est limitée, est assuré par la voie ERAD

(Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) [17, 51, 60] impliquant des protéines Hsp (Heat Shock Protein). La voie ERAD pour l'ApoB est unique car elle est contrôlée par la quantité de lipides disponibles [61] et l'activité MTTP [62] et se produit au fur et à mesure de sa traduction [63]. Quand les lipides sont abondants, l'ApoB acquiert 8 ponts disulfure [43, 45] et est lipidée par la MTTP : cette liaison de l'ApoB à la MTTP permet son repliement correct [32] (Figure 1A). Lorsque la quantité intracellulaire de phospholipides et de triglycérides ou si l'activité de la MTTP est insuffisante, la lipidation de l'ApoB s'arrête (Figure 1B), la partie cytosolique de l'ApoB est sélectionnée par la voie ERAD (Hsp70, Hsp90/GRP94, P58), ubiquitinée par la E3 ligase gp78 (Figure 1C), rétrotransloquée dans le cytosol *via* le translocon Sec61 et/ou des gouttelettes lipidiques associées au RE par l'action de l'AAA-ATPase p97 [64] et dégradée par le protéasome (Figure 1D) [17, 51, 61, 65-69].



**Figure 1 : Synthèse et dégradation de l'ApoB par la voie ERAD [17]**

La troisième voie est la voie post-endoplasmic reticulum pre-secretory proteolytic process (PERPP). Cette voie permet un contrôle de la qualité de la protéine après sa sortie du RE, lorsque la quantité de lipides est suffisante [51]. Cette voie implique une dégradation lysosomale [51] et un phénomène autophagique [70], l'autophagie étant la principale voie de dégradation dans ce cas [71]. Cette voie est impliquée dans la dégradation du mutant de l'ApoB p.A31P [72].

La délétion homozygote du gene *APOB* entier (après exon 4) chez la souris (souris KO) est létale, indiquant que l'ApoB est essentielle dans le développement embryonnaire des souris [73, 74]. L'ApoB intervient dans la formation de VLDL dans le sac vitellin [75]. L'ApoB semble indispensable au développement neurologique embryonnaire puisque les



embryons dont le développement a été le plus tardif ont des exencéphalies [73, 74]. La délétion homozygote d'une ApoB tronquée à 70% permet la naissance de souris homozygotes viables mais avec une mortalité périnatale importante, également liée à des exencéphalies et des hydrocéphalies [76]. Leur phénotype lipidique montre une diminution des triglycérides, une diminution du cholestérol total de plus de 50% portant sur les fractions LDL et HDL [76].

Les souris hétérozygotes pour des troncatures précoces (exon 4) ont un phénotype normal [73] mais une augmentation de la mortalité périnatale, une tendance à des défauts du tube neural, une diminution de la fertilité chez les mâles [74]. Leur triglycéridémie est normale mais elles présentent une diminution de l'ApoB de 70% et une diminution de 20-37% du cholestérol total portant sur les fractions LDL et HDL [73, 74]; une diminution du cholestérol HDL a également été rapportée chez les souris homozygotes pour l'ApoB70 [76]. Elles ne présentent pas de diminution de l'absorption intestinale [74], mais lorsqu'elles sont nourries avec une nourriture riche en graisses, elles sont protégées de l'hypercholestérolémie induite par l'alimentation [73].

Les souris avec délétion du gène *apob* intestinale (souris knock out (ko) intestinale) présentent dès les premiers jours de vie une cavité abdominale protubérante, une accumulation de graisses dans les enterocytes puis un retard de croissance [75]. Les souris hétérozygotes pour la délétion de l'ApoB intestinale sont normales mais 10% présentent une hydrocéphalie [75]. Ces souris présentent une triglycéridémie normale et une diminution du cholestérol liée à une diminution de la fraction HDL [75].

La réduction d'ARNm de l'ApoB par un antisens réduit la production de VLDL des cellules HepG2 [77], chez la souris [78] et chez les Hommes [12]. Le mipomersen, un antisens anti-ApoB, a été développé pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote et permet, chez l'Homme, une diminution du cholestérol LDL de 25% en moyenne mais avec une grande variabilité de réponse (2-82%)[13].

Chez l'Homme, des mutations sur le gène *APOB* sont décrites dans deux pathologies opposées : l'hypercholestérolémie (FDB, Familial ligand-Defective apolipoprotein B, OMIM #144010) [79] lorsque ces mutations entraînent un défaut de liaison au LDLR et l'hypobetalipoprotéïnémie familiale de type 1 (FHBL1, OMIM#615558) lorsque ces mutations entraînent un défaut de sécrétion de l'ApoB.

Dans l'hypercholestérolémie familiale, la mutation la plus souvent retrouvée est la mutation p.Arg3527Gln (apelée B3500): cette mutation n'est pas dans le site de liaison au LDLR mais, après conversion des VLDL en LDL, elle interagit avec l'extrémité C terminale et empêche la liaison au LDLR [42, 80]. D'autres mutations, dont le caractère délétère a été prouvé, ont été



mises en évidence sur le gène *APOB* dans l'hypercholestérolémie familiale (FDB): p.Arg1164Thr, p.Arg3059Cys, p.Lys3394, p.Arg3507Trp, p.Arg3527Trp, p.Arg3558Cys, p.Trp4396Tyr [80-84]. Certaines de ces mutations sont situées en dehors du site de liaison, montrant l'importance d'autres sites, soit directement, soit pour la conformation de l'ApoB.

Les mutations entraînant une FHBL1 seront détaillées secondairement puisqu'elles font l'objet de notre travail.

### **I.1.2. La MTP**

La MTP (\*157147) est un complexe hétérodimérique composé d'une grosse sous-unité de 97kDa (MTTP) et d'une petite sous-unité de 55kDa (Protéine Disulfide Isomérase, PDI, maintenant appelée P4HB) [85]. Le rôle de ce complexe a été revu à plusieurs reprises [86-89]. La MTTP n'est active que lorsqu'elle est exprimée avec la protéine PDI [29]. Chez le rat, ce complexe est retrouvé dans le reticulum endoplasmique et le Golgi aussi bien des cellules hépatiques que des entérocytes [90, 91].

#### ***1.1.2.1. MTTP***

L'implication de la MTTP dans le métabolisme des lipoprotéines a été mise en évidence grâce à l'étude des patients souffrant d'aβlipoprotéïnémie (ABL) (OMIM#200100). Cette maladie, décrite pour la première fois par Bassen et Kornzweig, se caractérise par une malabsorption lipidique, associée à une acanthocytose, une rétinite pigmentaire, des signes neurologiques (ataxie) et une hypocholestérolémie liée à un défaut de sécrétion de VLDL et de chylomicrons [1]. En 1992, une anomalie de la MTTP a été suspectée grâce à l'étude des biopsies intestinales de ces patients qui a montré l'absence de la grosse sous-unité de la protéine MTTP et une activité MTTP indétectable [3]. Ultérieurement deux études ont montré que la cotransfection de cellules COS1 et HeLa par les gènes *MTTP* et *APOB* leur permet de sécréter des lipoprotéines contenant de l'ApoB ce qui suggère le rôle critique de la MTTP pour l'assemblage des lipoprotéines [92, 93]. Des mutations sur le gène *MTTP* codant la grosse sous unité (MTTP) ont été retrouvées par deux équipes chez des patients présentant une ABL [5, 94].

Le gène *MTTP* (OMIM\*157147) est situé sur le chromosome 4 en position 4q23 et code une protéine de 894 acides aminés, incluant un peptide signal de 18 acides aminés. La protéine mature a un poids moléculaire de 97kDa. Cette protéine est exprimée non seulement dans le foie et les cellules intestinales, mais également dans le cœur, les reins, la rétine, le placenta et le tissu adipeux blanc et brun [89, 95]. Dans les cellules hépatiques, la MTTP est

retrouvée non seulement au niveau du RE, mais également dans le Golgi [91]. Chez la souris, une protéine codée par un variant d'épissage (premier exon alternatif qui code pour 35 acides aminés au lieu de 20) a été retrouvée avec une expression principalement dans le tissu adipeux et une localisation principalement dans le Golgi [96]. Chez l'Homme, il existe également un variant produit par épissage alternatif, codant pour une protéine de 921 acides aminés ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Variation\\_Transcript/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Variation_Transcript/)) mais son rôle n'est pas connu.

Les études structurales ont montré une analogie de séquence avec la lipovitelline [27]. Sa structure a donc été modélisée, par analogie avec celle de la lipovitelline de lamproie et montre l'existence de trois domaines structuraux majeurs : une structure N-terminale en tonneau  $\beta$  ( $\beta$ -barrel) (acides aminés 22-297), une hélice  $\alpha$  centrale (acides aminés 298-603) et un domaine C-terminal (acides aminés 604-894) [29]. Les résidus 98 à 676 de la MTTP ont une forte homologie avec le domaine  $\alpha 1$  de l'ApoB [27]. Le domaine N-terminal (résidus 22-297) lie l'ApoB, l'hélice  $\alpha$  (hélices 13 à 17, les résidus 517-603) contient le site de liaison de l'ApoB et celui de la protéine P4HB sur des résidus très proches mais différents [29, 97]. L'hélice  $\alpha$  centrale (hélices 4-6) et le domaine C-terminal (feuillet  $\beta$ ) seraient impliqués dans l'activité de transfert des triglycérides [98]. Dans ce domaine C-terminal, l'hélice A (résidus 725 à 736) est impliquée dans l'acquisition des lipides depuis les membranes phospholipides et l'hélice B (résidus 781 à 786) dans le transfert des lipides vers la cavité de liaison des lipides [99]. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que les résidus L734 et V782 facilitent l'acquisition et la liaison MTTP/triglycérides, que la liaison des triglycérides est inhibée en cas de mutation sur les résidus 780-786 et que les résidus 725 à 736 permettent l'interaction avec la membrane et l'acquisition de lipides neutres [100]. Plus récemment, Khatun *et al* ont montré que les mutations p.R540H, p.N780Y, p.S590I et p.G746E, retrouvées chez des patients présentant une ABL entraînent une perte des fonctions de transfert des phospholipides et des triglycérides [101].

La MTTP possède au moins trois fonctions indépendantes permettant le transfert de lipides, l'association à la membrane du RE et la liaison à l'ApoB [40]. La **MTTP interagit avec l'ApoB** [102], de façon précoce [31], dans le reticulum endoplasmique [103] en permettant le relargage de la membrane du RE et l'assemblage d'ApoB avec des lipides [87]. La MTTP joue le **rôle de protéine chaperone pour l'ApoB** : elle facilite sa translocation dans une conformation appropriée et ainsi évite sa dégradation co-translationnelle par le protéasome [62] ; en revanche, elle ne serait pas indispensable à la translocation de l'ApoB48 [104]. La MTTP **catalyse le transport des triglycérides, du cholestérol estérifié et des**

**phospholipides** entre les membranes *in vitro* [86] et est indispensable à la lipidation de l'ApoB [37]. L'activité de transfert des phospholipides est suffisante pour l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines primordiales contenant l'ApoB [105, 106]. Cependant l'activité de transfert des triglycérides, acquise au cours de l'évolution, durant la transition entre les invertébrés et les vertébrés [98], facilite la biosynthèse d'une plus grande quantité de particules contenant de l'ApoB et augmente la quantité de triglycérides intégrés dans les VLDL [106]. La MTTP ne serait pas indispensable à la lipidation de la partie N-terminale de l'ApoB (1000 premiers acides aminés de l'ApoB mature) [37, 107]. Par contre, **le niveau d'activité MTTP joue un rôle déterminant pour la production et la sécrétion de lipoprotéines contenant de l'ApoB**. Ceci a été démontré avec plusieurs modèles de cultures cellules hépatiques en utilisant des quantités croissantes d'inhibiteurs de la MTTP mais également avec de cellules normalement incompétentes pour la sécrétion de lipoprotéines contenant de l'ApoB (cotransfection MTTP/APOB) [92, 93, 107, 108]. De plus, **la MTTP permet l'accumulation de triglycérides à proximité de la lumière microsomale, indispensable à l'assemblage des VLDL riches en triglycérides [109] et elle participe à la formation de gouttelettes de lipide sans ApoB** luminales (ApoB-free triglycérides droplets) [110-112].

L'expression de la MTTP est régulée. La région entre -123 et -85 du promoteur de la MTTP est critique pour son expression et contient des séquences consensus de reconnaissance de facteurs hépatiques : HNF-1, HNF4 et AP-1 [113]. Le promoteur humain est régulé positivement par le cholestérol et négativement par l'insuline [113]. De nombreux autres facteurs régulent l'expression du gène *MTTP* :

Régulation par	Mode d'action	Modèle	Effet	Ref
<b>chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor II</b>	Liaison la région DR1 CTGACCTTTCCCTATA (sqce chez rat -51 / -39 du promoteur du gène <i>MTTP</i> )	Cellules L35 dérivées d'hépatome FAO	Incapacité de synthèse et sécrétion des VLDL (inhibiteur)	[114]
<b>IRE1beta</b>	Dégradation post transcriptionnelle (efficace seulement dans intestin, pas dans foie)	Souris WT et KO <i>Irelb</i> <sup>-/-</sup> , Huh7, COS, Caco-2, entérocytes primaires	Inhibition de l'activité MTTP : IRE1b bloque la régulation positive de la MTTP intestinale induite par une alimentation riche en graisses	[115]
<b>PPAR<math>\alpha</math>-RXR<math>\alpha</math></b>	Liaison la région DR1 du promoteur du gène <i>MTTP</i>	Cellules FAO	Synthèse normale de VLDL (activateurs)	[114]
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Activation de la transcription, via liaison DR1 ?	Souris C57BL/6, rat, hepatocytes primaires	Augmentation de l'activité MTTP hépatique mais pas intestinale	[116]
<b>SHP (orphan receptor small heterodimer partner), NROB2</b>	Répresseur de la transcription de l'ARNm de la MTTP par LRH1 : souris 2/3 sites de liaison utilisés: <u>TAGCaGcCCTTcc</u> <u>AACGtriglycéridesACCTTtc</u>	Souris ob/ob	Diminution de l'activité MTTP et de la sécrétion des VLDL	[117]
<b>LRH-1</b>	Liaison au promoteur de la MTTP	Hepatocyte	Augmentation de l'expression de la MTTP	[117]
<b>SREBP2</b>	Liaison au site SRE (-124 à -116 pb)	HepG2	Inhibition de l'expression du gène (mécanisme indépendant de l'action de celui de l'insuline)	[118]
<b>FoxO1</b>	Liaison promoteur MTTP	HepG2, souris transgéniques	Stimulation de l'expression de la MTTP	[119]
<b>Insuline</b>	Suppression de l'expression de la MTTP médiée par FoxO1	HepG2, souris transgéniques	Inhibition de l'expression de la MTTP,	[119]
<b>Foxa2 + PPAR<math>\gamma</math> coactivator <math>\beta</math></b>	Activation de l'expression de la MTTP par liaison Foxa2/Pgc1 $\beta$ sur un site en -473 en l'absence d'insuline	HepG2, souris transgéniques	Augmentation de la sécrétion des VLDL	[120]

**Tableau 1 : Facteurs régulant l'expression de la MTTP**

Dans la région promotrice, le polymorphisme -164 (rs1800804) détermine l'affinité de liaison de SREBP1a : SREBP1a se lie mieux au promoteur de la MTTP en présence de l'allèle T en

comparaison de l'allèle C. L'augmentation de la régulation de l'expression de la MTTP par la nourriture serait donc plus efficace chez les porteurs de l'allèle T [121].

Les cellules HepG2 surexprimant le gène *MTTP* sécrètent plus d'ApoB100 : il n'y a pas d'augmentation de la production mais une régulation négative de la dégradation de l'ApoB médiée par le protéasome [122]. Ceci a été confirmé par une surexpression hépatique du gène *MTTP* par des souris transgéniques : cette surexpression entraîne une sécrétion augmentée de triglycérides-VLDL, de l'ApoB hépatique (100 et 48 chez la souris) et une augmentation de la triglycéridémie ce qui suggère que la MTTP est l'étape limitante pour la sécrétion des VLDL chez la souris alimentée normalement [123].

La délétion homozygote du gène *MTTP* chez la souris (ko *Mttp*<sup>-/-</sup>) est létale dès les stades embryonnaires [110, 124]; il est donc nécessaire d'étudier des souris ko hépatiques conditionnelles [125].

Les souris ko hépatiques conditionnelles (*l-Mttp*<sup>-/-</sup>) ont démontré le rôle critique de la MTTP pour les concentrations de lipides circulants et hépatiques. Chez ces animaux, on observe une diminution de l'activité hépatique de transfert des triglycérides de 80-85%. Ces souris présentent une diminution des concentrations plasmatiques de LDL/VLDL liée à une absence de sécrétion de VLDL [125], une diminution des HDL, une diminution de la sécrétion d'ApoB100 et une diminution de la sécrétion d'ApoB48 [110]. Cependant la diminution des triglycérides n'est pas retrouvée dans l'étude de Chang ; par contre dans cette étude, la sécrétion d'ApoB48 est nettement diminuée [125]. Ceci peut être lié à des différences expérimentales et à l'existence des variants d'épissage de la MTTP qui pourraient être présents dans la première étude alors qu'ils sont également inhibés dans la deuxième étude [96, 110, 125]. Les ALAT ASAT plasmatiques ne sont pas augmentées [126]. En revanche, les souris nourries normalement présentent une accumulation hépatique de cholestérol total (x2), triglycérides (x3) et phospholipides (1,5x), de l'acide oléique, une stéatose modérée avec accumulation de grandes gouttelettes lipidiques, sans inflammation [106, 110, 126]; l'expression de SREBP1 hépatique est diminuée chez ces souris [126]. Le foie de ces souris présente une susceptibilité accrue aux toxines bactériennes et développent une inflammation avec nécrose focalisée en cas d'exposition à des toxines bactériennes [126]. L'accumulation de triglycérides hépatiques est encore plus importante chez les souris ko conditionnelles avec un régime alimentaire occidental [106]. La transfection de ces souris ko conditionnelles avec le gène *MTTP* humain ou de drosophile (qui ne présente pas l'activité de transfert des triglycérides) améliore la stéatose (amélioration dose dépendante) et augmente la quantité de pre $\beta$  et de  $\beta$  lipoprotéines [106].

Les souris ko intestinales conditionnelles (*i-Mttp*<sup>-/-</sup>) présentent : une absence de gain de poids, une stéatorrhée, des gouttelettes lipidiques dans les entérocytes, une accumulation d'acides gras (AG) (x2) et de triglycérides (x12). Au niveau plasmatique, elles présentent une diminution des triglycérides, du cholestérol total (portant également sur la fraction HDL) et AG libres, diminution de la sécrétion d'ApoB48 de 80% et de l'absorption des triglycérides après charge en graisses [127, 128]. L'absorption du cholestérol est diminuée (-70%) mais pas totalement supprimée par diminution d'expression du gène *NPC1L1* [127, 128]. Une augmentation d'expression intestinale d'autres gènes est observée : *LFABP*, *MGAT2*, *DGAT2*. Ces souris n'étant délétées qu'en MTTP intestinale, on observe une augmentation de l'activité MTTP hépatique et une augmentation de la lipogénèse et de la sécrétion hépatique des triglycérides dans des VLDL et de l'ApoB100 [128, 129]. L'expression des gènes *SREBP1c*, *FAS*, *ACC*, *ABCG5*, *ABCG8*, *SR-BI*, *HMGR*, *LDLR*, *SREBP2* est augmentée au niveau hépatique [128, 130]. Chez ces souris il existe une activation de la réponse aux protéines mal repliées (UPR, unfolding protein response) [129]. Chez des souris avec délétion partielle (-60 à -70%) du gène *MTTP* : il existe une diminution de l'absorption intestinale des triglycérides [131].

Les études chez les souris hétérozygote *Mttp*<sup>+/-</sup> ont montré une haploinsuffisance : ces souris n'ont pas de signes cliniques particuliers (croissance normale) mais présentent une diminution de 50% de l'ARNm et de l'activité MTTP dans le foie et l'intestin [124, 132]. Cette diminution n'a pas d'effet sur la concentration de triglycérides plasmatiques mais entraîne une diminution de l'ApoB100 (-28%), une diminution moins importante de la sécrétion d'ApoB48, y compris chez les souris *l-Mttp*<sup>+/-</sup> et augmentation non significative du contenu hépatique en triglycérides (p=0.24) et en cholestérol [124, 125, 132].

L'utilisation de molécules inhibant la MTTP semble intéressante pour le traitement de l'hypercholestérolémie. En effet, les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Apob*<sup>100/100</sup> *lMttp*<sup>fl/fl</sup> conditionnelles présentent après induction une nette diminution du cholestérol total et des triglycérides qu'elles aient une alimentation normale ou une alimentation riche en graisses et ne présentent pas de lésion d'athérosclérose [133]. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la MTTP conduit à une diminution dose dépendante de la sécrétion de lipoprotéines contenant de l'ApoB dans les cellules HepG2, les cellules Caco-2, chez les lapins WHHL et les rats [107, 108, 134-136]. L'inhibition de la MTTP affecte plus la sécrétion d'ApoB100 que celle de l'ApoB48 par les cellules Caco-2 [134]; l'inhibition de la MTTP favorise la dégradation de l'ApoB100 [137]. Chez la souris, l'inhibition de la MTTP entraîne une accumulation de triglycérides intestinaux et hépatiques même lorsque la diminution de triglycérides

plasmatiques est modeste, selon les études, soit en induisant du stress dans le RE soit sans induire de stress dans le RE) [129, 136, 137].

Chez l'Homme, un inhibiteur pharmacologique par voie orale de la MTTP, le lomitapide a eu en 2013 une autorisation de mise sur le marché aux USA pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote [15, 16]. Ce traitement est efficace sur la cholestérolémie (baisse de 50% du LDL-C à 26 semaines et 38% à 78 semaines) [15].

Comme nous l'avons déjà évoqué en début de chapitre I.1.2. , les mutations sur le gène *MTTP* sont retrouvées chez les patients présentant une ABL ; elles seront détaillées secondairement puisqu'elles font l'objet de notre travail.

### ***1.1.2.2. Rôle des protéines de la superfamille PDI***

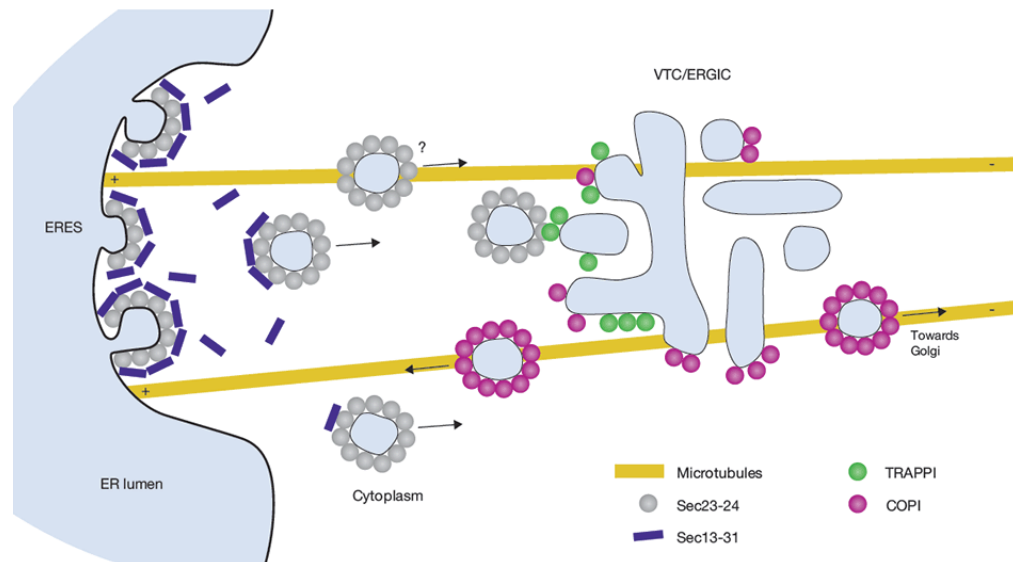
La protéine P4HB (prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide, EC 5.4.3.1) est la protéine fondatrice de la superfamille des PDI (20 membres connus chez les mammifères). Cette protéine est codée par le gène *P4HB* situé sur le chromosome 17q25.3. Elle a deux fonctions portées par des sites distincts: une activité de protéine chaperone impliquée dans la voie ERAD, et une activité d'enzyme thioredoxin-like : elle catalyse le réarrangement de liaisons disulfides préexistantes (activité « shufflase ») et la formation-destruction de liaison disulfure (activité « redox ») [138, 139]. Dans les cellules, on la retrouve soit sous forme de complexe, soit sous forme soluble [138]. Elle intervient pour la sécrétion de l'ApoB de plusieurs façons. Comme vu précédemment, cette protéine forme un hétérodimère avec la MTTP. Le rôle de la protéine P4HB dans ce complexe est mal connu mais ses fonctions enzymatiques n'interviennent pas dans ce complexe [138] ; elle permet de maintenir la solubilité et la rétention de la MTTP dans le reticulum endoplasmique [85]. Chez la levure, lorsque le domaine protéine chaperone est absent, la conformation de l'ApoB peut être altérée [140]. De plus, dans les cellules d'hépatoblastome de rat (McA-RH7777), une surexpression de la protéine P4HB favorise la formation de complexe avec la MTTP, augmente le transport de l'ApoB qui échappe au processus de dégradation ERAD [140]. Il a été montré récemment qu'en association avec IRE1 $\alpha$ -XBP1, elle jouerait un rôle dans l'assemblage des VLDL [141].

Deux autres protéines, PDIA3 (synonyme ERp57) et PDIA4 (synonyme ERp72), appartenant à la superfamille PDI facilitent la dégradation de l'ApoB par la voie ERAD [140].



### I.1.3. Protéines impliquées dans le transport des lipoprotéines entre le RE et le Golgi

Lee *et al* [142] et Zanetti *et al* [143] ont proposé un modèle pour le transport antérograde et rétrograde des protéines entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et détaillé ci-dessous :



**Figure 2 : Modèle du transport antérograde et rétrograde dans les cellules de mammifère [143].**

Les vésicules COPII sont formées au niveau de sites spécifiques du RE, les sites de sortie du RE (ERES ER exit sites). L'hydrolyse du GTP entraîne la fission et la dépolymérisation des cages Sec13-Sec31 alors que le complexe reste à la surface des vésicules. Les vésicules sont transportées à travers le compartiment ERGIC (également connu sous le nom de VTC, Vesicular-tubular Cluster). Les protéines transportées (cargo) peuvent alors soit rejoindre et traverser le Golgi, soit être recyclées et retourner vers le RE dans des vésicules COPI [143].

#### I.1.3.1. Transport antérograde, rôle de la protéine Sar1b

L'importance de ce trafic dans les maladies affectant le métabolisme lipidique a été révélé par la maladie de rétention des chylomicrons (CMRD) ou maladie d'Anderson, liée à des mutations sur le gène *SAR1B* [2, 7]. Dans cette maladie rare, les triglycérides s'accumulent dans le RE, suggérant un blocage dans le transport et la sécrétion des triglycérides [144].

Classiquement, le transport **antérograde** des protéines synthétisées dans le RE vers le Golgi est réalisé par des **vésicules COPII** (coatamer protein II, de 60-80 nm de diamètre) dont le manteau est constitué de protéines (complexes Sec23/Sec24 et Sec13/31 de Sec16), associé à la GTPase **Sar1** qui existent sous de multiples paralogues<sup>1</sup> [145-148]. Les vésicules se forment en des sites spécifiques, les sites de sortie du RE (ERES, ER exit sites) ; les

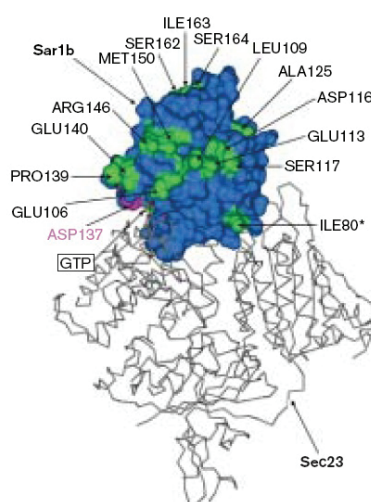
<sup>1</sup> Protéines paralogues : Deux séquences homologues résultant d'une duplication génique



vésicules ainsi formées contiennent non seulement les **protéines cargos** (protéines sécrétées et protéines membranaires), mais également des protéines essentielles pour les étapes suivantes, comme les protéines **SNAREs** (Soluble N-ethylmaleinide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) nécessaires pour la fusion avec la membrane de l'organite accepteur sur laquelle elles interagissent avec d'autres protéines SNAREs [149, 150]. Les protéines sélectionnées pour le transport (Cargo) et la régulation de la formation de ces vésicules ont fait l'objet de revues : elles font intervenir des processus de phosphorylation, et les jeux de protéines (concentrations respectives et paralogues) en présence permettent de délivrer une variété de molécules différant d'un tissu à l'autre [148, 151]. Ce type de transport est notamment impliqué dans la sécrétion de différents récepteurs : du calcium, récepteurs adrénergiques ( $\alpha_2$  et  $\beta_2$ ) et de l'angiotensine II et des glycolipides transférases [152-154].

Le type de vésicules assurant le transport des VLDL et des chylomicrons entre le RE et le Golgi est controversé. Une étude sur cellules McA-RH7777, produisant des VLDL pauvre en triglycérides, montre que les VLDL sont transportées par les vésicules COPII [155]. Cependant, les vésicules COPII ont une taille ne permettant pas de transporter des lipoprotéines et d'autres études montrent que le transport des VLDL et des chylomicrons est réalisé par des vésicules particulières appelées VLDL transport Vesicles (VTV) et pre-chylomicron transport Vesicle (PCTV) [156-158]. La formation de ces vésicules sera détaillée dans les chapitres spécifiques à la synthèse des VLDL et des chylomicrons respectivement.

Chez l'Homme il existe deux protéines paralogues, Sar1a et Sar1b ayant 91% d'homologie [159]. Elles diffèrent de 20 acides aminés (cf. ci-dessous, résidus notés en vert) qui sont localisés à la surface de la protéine comme le montre la figure page suivante :



**Figure 3 : Modèle de l'interaction Sar1b-Sec23 mettant en évidence la localisation des acides aminés différents entre Sar1a et Sar1b [7]**

Modèle basé sur la protéine Sar1 de hamster et la protéine Sec23 de levure. Acides aminés en vert : acides aminés différents entre Sar1a et Sar1b

Le rôle spécifique de ces deux paralogues est mal connu mais semble bien distinct : seule la protéine Sar1b a été impliquée en pathologie humaine. Le rôle spécifique de Sar1b n'est connu que depuis peu. La protéine Sar1b permettrait de former des vésicules COPII de plus grande taille et aurait une meilleure capacité à diminuer la rigidité des membranes que Sar1a [160, 161]. Fryer *et al* ont montré très récemment que la protéine Sar1b participe à la sécrétion hépatique de lipoprotéines contenant de l'ApoB et que cette activité est coordonnée avec une régulation de l'expression de l'ApoB [162]. Au contraire, la protéine Sar1a antagonise l'activité de sécrétion de l'ApoB de Sar1b [162].

La protéine Sar1b est codée par le gène *SAR1B* de 26 409 pb, localisé sur le bras long du chromosome 5. C'est une protéine de 198 acides aminés. Chez l'Homme, l'expression du gène *SAR1B* est abondante dans le foie et le muscle squelettique, une expression modérée dans le cœur, les reins, le placenta et les os et une expression très faible dans les autres tissus testés [7, 163-165]. L'expression des gènes *SAR1B* et *SAR1A* est concomitante dans tous les tissus testés, cependant le gène *SAR1B* s'exprime plus que le gène *SAR1A* dans certains tissus, principalement le foie et le muscle squelettique, mais aussi dans le cœur, les reins, le placenta (Figure ci-dessous).

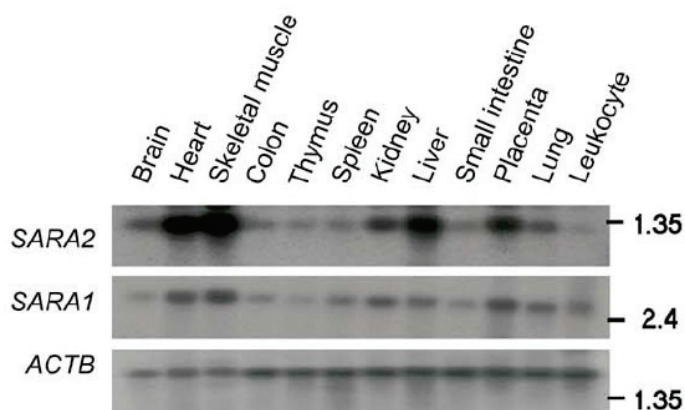
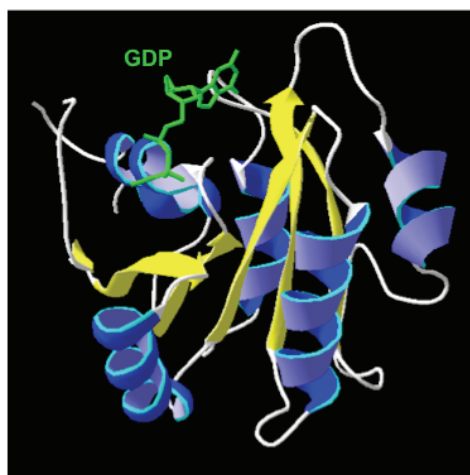


Figure 4 : ARNm de *SAR1B* (*SARA2*) et *SAR1A* (*SARA1*) dans les tissus humains [7].

Enfin, l'expression du gène *SAR1B* augmente pendant les étapes initiales de la différenciation érythroïde ce qui suggère que la protéine Sar1b joue un rôle spécifique pendant cette phase [165].

La structure tridimensionnelle de la protéine Sar1b peut être déduite de celle de la protéine Sar1 de hamster dans sa forme liée au GDP qui a été étudiée par cristallographie aux rayons X par Huang et al [166]. La protéine est formée de six feuillets  $\beta$ , cinq parallèles et un antiparallèle ( $\beta_2$ ) dans l'ordre  $\beta_6, \beta_5, \beta_4, \beta_1, \beta_3, \beta_2$ . Ils forment une feuille plate prise en sandwich entre trois hélices  $\alpha$ . Ce motif forme une poche typique de la superfamille Ras liant

le nucléotide guanine. La face hydrophobe du noyau purine est prise en sandwich par les chaînes aliphatiques de la leucine en position 181 et de la lysine en position 135.



**Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la protéine Sar1b humaine.**

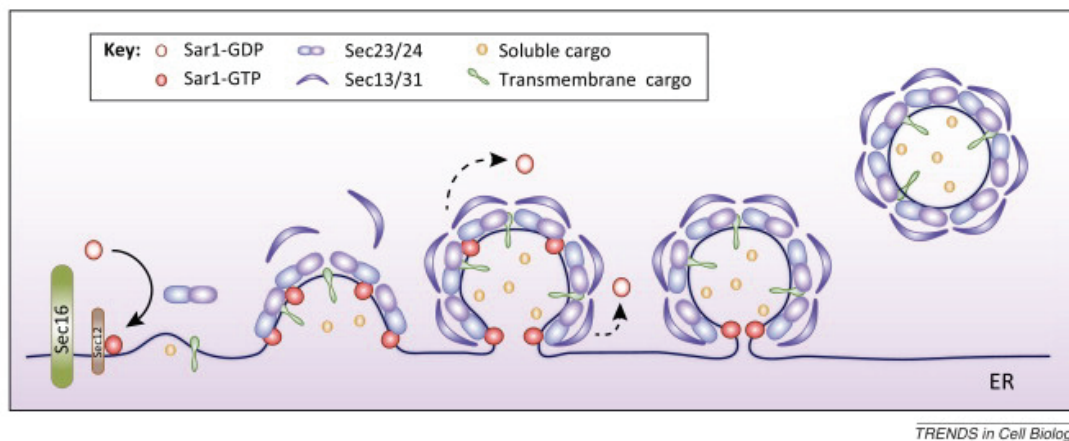
A partir du modèle 1F6B Sar1b de *Cricetulus griseus*, [166], nous avons modifié les résidus I80 et V163 (I80V et V163I) afin d'obtenir la séquence protéique de Sar1b humaine à partir du résidu 13 (publiée dans Sassolas *et al*, cf. annexe 3)

Cette protéine est une GTPase. L'implication de la protéine Sar1 dans la formation des vésicules COP a été étudiée à partir des levures ou dans des cellules eucaryotes sans distinction des 2 isoformes. Nous décrivons donc le déroulement de la formation des vésicules COPII sans préciser la protéine paralogue car à l'heure actuelle, nous ne savons pas si les deux protéines ont le même rôle, des rôles complémentaires ou agissent sous forme d'hétérodimère.

La protéine Sar1 existe sous forme inactive liée au GDP et sous forme active liée au GTP. Elle **intervient dans la formation des vésicules à partir du RE** [167]. Dans le cytosol, Sar1 est sous forme inactive, liée au GDP. Elle est adressée vers la membrane du RE où elle est activée par la protéine Sec12 qui catalyse l'échange GDP/GTP [147, 166-169] (étape 1 Figure 6). La liaison du GTP [168] entraîne l'activation de la protéine Sar1 et permet 1/ un **changement de conformation des deux régions de switch** [166, 170] et **l'ancrage dans la membrane du RE** de la protéine Sar1 après libération de l'ancre (partie NH<sub>2</sub>-terminale) 2/ la **déformation des membranes** [171-173] 3/ l'augmentation de son affinité pour le complexe Sec23/Sec24, formant le complexe prévésiculaire [145, 170] (étape 2 Figure 6), Sec23 accélérant l'hydrolyse du GTP (10 à 15 fois l'hydrolyse intrinsèque) [174]. 4/ le **recrutement** de complexes Sec13/Sec31/p125 formant des cages octaédriques qui constituent le manteau des vésicules COPII et accélèrent l'hydrolyse du GTP [147, 170, 175-178] (étape 3 Figure 6). L'hydrolyse du GTP n'est pas essentielle pour la formation des vésicules mais est indispensable pour l'étape ultérieure [179]. Ces interactions facilitent le **recrutement**

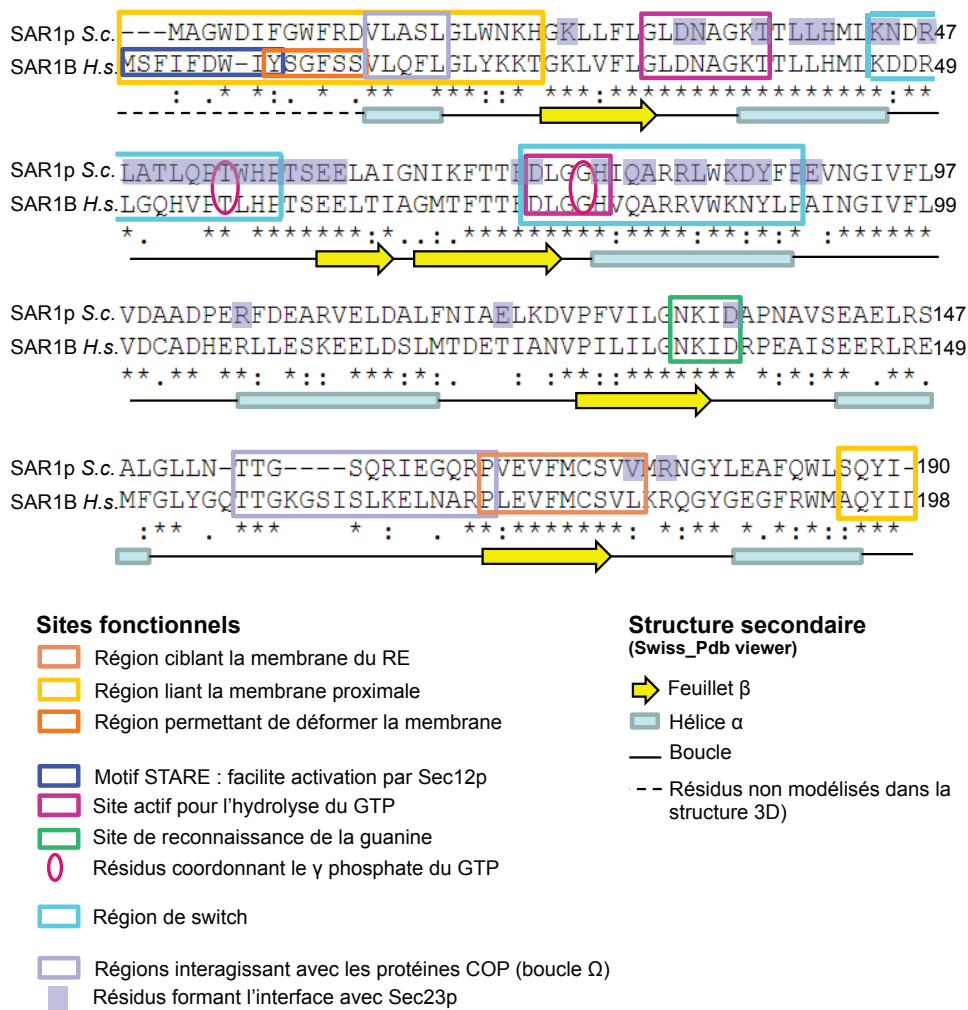
**spécifique sur la membrane du reticulum endoplasmique**, favorise la **stabilité du manteau** et permet la **formation des vésicules** [180]. La courbure générée par Sar1 est stabilisée ou augmentée par le complexe Sec23/Sec24 [173]. La protéine Sar1 diminue la rigidité des membranes lipidiques et participe au processus de constriction [161, 181]; la **déstabilisation** des bicouches lipidiques par la protéine Sar1 activée ainsi que la désactivation de Sar1 du fait de l'hydrolyse du GTP permettent ensuite le **relargage des vésicules** [182] (étape 4 Figure 6). La boucle  $\Omega$  joue un rôle important dans la formation des tubules et la constriction de membranes [183]. La formation des vésicules COPII est régulée par les cycles de Sar1 inactive liée au GDP et Sar1 active liée au GTP [184]. L'hydrolyse du GTP est particulièrement importante car si Sar1 reste sous forme activée, le désassemblage des vésicules COPII est inhibé conduisant à l'accumulation d'intermédiaires de transport entre le RE et le Golgi [185] ; ce recyclage de Sar1 semble jouer un rôle primordial dans le packaging des grosses protéines [176, 186]. L'activité de Sar1 est régulée par de nombreuses protéines : Sec12, Sec 16, Sec24 (cf. revue [151]) et l'ion  $Mg^{2+}$  pourrait également jouer un rôle important dans l'activation/ désactivation de Sar1 et donc dans la formation des vésicules « prébudding » et le relargage des vésicules COP [151, 175].

La figure ci dessous illustre la formation des vésicules.



**Figure 6 : Modèle illustrant la sortie des protéines du RE [148]**

Différents sites fonctionnels ont été identifiés sur les protéines Sar1 d'autres espèces ; nous les avons reportés sur l'alignement ci-dessous.



**Figure 7 : Alignement de Sar1b H.s. (*Homo sapiens*) et Sar1p S.c. (*Saccharomyces cerevisiae*) : déduction des domaines fonctionnels à partir des études publiées**

La protéine Sar1a est impliquée notamment dans la sécrétion des récepteurs du calcium, adrénergiques ( $\alpha_2$  et  $\beta_2$ ) et de l'angiotensine II [152, 154]. La protéine Sar1 interviendrait également spécifiquement dans la sélection des protéines transportées : par exemple, un site spécifique de liaison des GGT a été identifié (« site A » impliquant plusieurs acides aminés dont certains sont spécifiques de Sar1a) [153].

Le rôle déterminant de la **protéine Sar1b** dans la synthèse des chylomicrons et des VLDL a été confirmé par des études *in vitro* et *in vivo* de surexpression de la protéine Sar1b wt (*Sar1b*<sup>+/+</sup>) : Sar1b représente une des étapes limitantes de la sécrétion des chylomicrons et est également impliquée dans la sécrétion des VLDL [187, 188].

Les cellules Caco-2 et les cellules McArdleRH7777 surexprimant *Sar1b* (*Sar1b*<sup>+/+</sup>) sécrètent plus d'ApoB48 et d'ApoB100. Ces cellules sécrètent plus de VLDL et de chylomicrons et les LRTG sont de plus grande taille [162, 187]. L'augmentation de la quantité d'ApoB48 fait intervenir un mécanisme indépendant de la voie de dégradation par le protéasome [187]. La quantité de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique intestinal (MTTP, ApoB,

SREBP1c) et de certaines protéines impliquées dans la formation des vésicules de transit entre le RE et le Golgi (Sec12, Sec23, Sec24, p125) est augmentée dans les cellules Caco2, sans modification d'expression de *Sar1a* [187]. L'expression et l'activité de la MTTP sont augmentées dans les cellules Caco-2 [187]. Les microsomes isolés à partir des cellules Caco2 montrent une coimmunoprécipitation de Sec23/Sec24 avec SREBP1c/SCAP. La surexpression de *Sar1b* par des cellules McArdle RH7777 entraîne une augmentation de la sécrétion d'ApoB48 et d'ApoB100 alors que la surexpression de *Sar1a* ou de *Sar1bH79* a l'effet inverse [162]. La déplétion de ces cellules par des siRNA anti-*Sar1a* ou anti-*Sar1b* entraîne une diminution des ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol ; en outre, la déplétion de ces cellules par des siRNA anti-*Sar1b* entraîne spécifiquement une diminution de l'ARNm *APOB* et *MTTP* [162]. Ceci a été confirmé par étude sur des biopsies hépatiques humaines : la quantité d'ARNm de *SARIA* et *SARIB* est corrélée avec la quantité d'ARNm d'une vingtaine de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol [162].

L'équipe de Lévy *et al* a ensuite examiné l'effet de la surexpression de la protéine *Sar1b* chez des souris transgéniques *Sar1b*<sup>+/+</sup> [188]. Lorsqu'elles sont soumises à une nourriture riche en graisses, les souris *Sar1b*<sup>+/+</sup> deviennent plus grosses et développent une insensibilité à l'insuline. Elles présentent une augmentation des phospholipides (significative) et du cholestérol (non significative, ns) intestinal indépendamment de leur type de nourriture et présentent une **augmentation significative des chylomicrons après charge en graisses**, et une augmentation significative de l'expression du gène *SARIB* dans le colon (distal et proximal), l'ileum et le foie [189]. Leur cholestérol et leurs triglycérides plasmatiques sont augmentés par rapport aux souris wt (ns) et la composition des acides gras est significativement différente. Les effets les plus significatifs sont retrouvés **sur l'insulinorésistance** : augmentation significative de la glycémie, de l'insulinémie, de l'HOMA-IR et hyperglycémie provoquée ; ces effets sont retrouvés après alimentation normale et majorés après alimentation riche en graisses.

### **1.1.3.2. Le transport rétrograde**

Il existe également un transport **rétrograde** entre le Golgi et le RE. Ce transport, assuré par des vésicules COPI, permet le recyclage des protéines de transport et est important pour le transport **antérograde** [190]. La protéine ARF1 (ADP Ribosylation Factor 1), une autre GTPase et la phospholipase D (activée par ARF1) participent à la formation de ces vésicules COP.



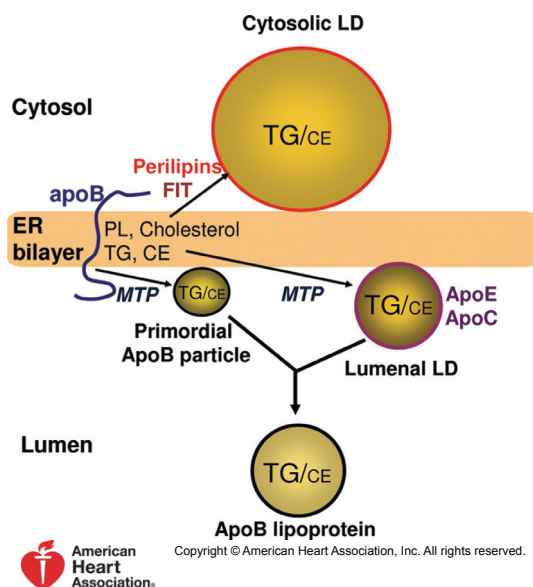
La phospholipase D activée est indispensable au trafic des protéines vers le Golgi dans les cellules de mammifères *in vivo* [172]. Elle intervient en particulier pour le recrutement du complexe Sec23/Sec24 et la formation des tubules [172]. Il est important de noter que la **phospholipase D est activée par la protéine Sar1 liée au GTP** [172, 191]. Cette fonction de la protéine Sar1 **activée** permettrait ainsi de créer un environnement favorable pour l'attachement des autres protéines COPII et la sélection des protéines cargos et SNAREs au niveau des sites d'export du reticulum endoplasmique.

L'assemblage des VLDL est dépendant de ARF1 et de la phospholipase D [192]. La formation de VLDL1 (plus légères et plus riches en triglycérides) diminue en présence du mutant dominant négatif ARF1 et ceci coïncide avec l'inhibition du transport antérograde ([193]. En cas de surexpression ARF1, la sécrétion des VLDL2 (moins riches en triglycérides) augmente [193].

#### **I.1.4. Autres protéines impliquées dans la lipodation des chylomicrons et des VLDL, rôle des gouttelettes lipidiques (lipid droplets)**

La localisation subcellulaire de lipodation de l'ApoB est controversé : certaines études montrent que l'ApoB est lipidée dans le RE alors que d'autres études montrent que des préVLDL ou pré-chylomicrons sont synthétisés dans le RE et que la lipodation a lieu principalement dans le Golgi [91, 155, 194-202]. Les études les plus récentes sont en faveur d'un rôle important du Golgi dans la maturation des VLDL [203].

La source majeure de lipides pour l'assemblage des VLDL sont les triglycérides dérivés d'une hydrolyse et d'une réestérification ; ils sont stockés dans les gouttelettes lipidiques cytosoliques (cytosolic lipid droplets CLD) [204]. Le rôle de ces gouttelettes lipidiques dans l'assemblage des lipoprotéines a fait l'objet de revues [112, 205, 206]. Il existe plusieurs types de gouttelettes lipidiques : les gouttelettes cytosoliques et les gouttelettes luminales retrouvées dans la lumière du RE. La synthèse des gouttelettes lipidiques cytosoliques commence dans le RE par une hydrolyse des triglycérides, une mobilisation des acides gras libres et une resynthèse des triglycérides. Les gouttelettes lipidiques luminales sont observées dans le RE des entérocytes et des hépatocytes. Elles s'accumulent en l'absence d'ApoB mais pas en l'absence de MTTP. La MTTP jouerait un rôle crucial dans leur formation : elle s'associe à leur membrane et transfère des lipides. Les gouttelettes lipidiques cytosoliques sont des particules larges sphériques entourées par une membrane de phospholipides et de périlipine. Le core est composé de triglycérides et de cholestérol estérifié.



**Figure 8 : Formation des gouttelettes lipidiques (lipid droplets, LDs) dans les cellules sécrétant des lipoprotéines. [112]**

Les lipides neutres (triglycérides (TG) et esters de cholestérol (CE)) synthétisés dans le RE bourgeonnent soit dans le cytosol soit dans la lumière du RE. La direction vers laquelle ils sont orientés est régulée par des protéines spécifiques : périlipines et FIT (fat storage-inducing transmembrane proteins) pour la synthèse des gouttelettes lipidiques cytosoliques et MTP pour la synthèse des particules primordiales lumineales contenant l'ApoB et les gouttelettes lipidiques lumineales. (apoE, apolipoprotéine E; apoC, apolipoprotéine C; PL, phospholipide).

Différentes protéines ont été impliquées dans la lipodation des VLDL : la périlipine 2 et Cideb qui jouent un rôle opposé dans le contrôle de la lipodation et dans l'homéostasie hépatique des lipides [201], ARFRP1, FABP1.

#### **1.1.4.1. Périlipine 2**

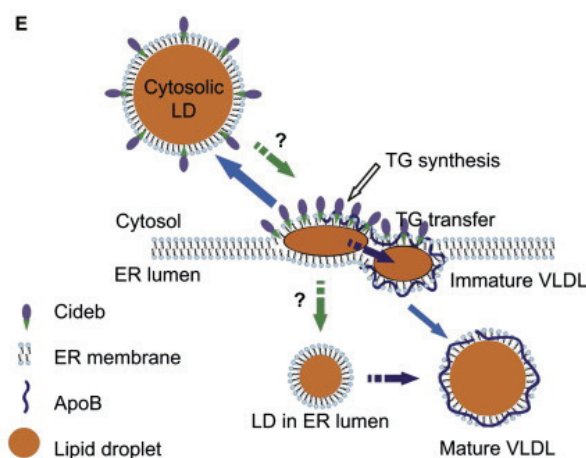
La périlipine 2 est une protéine de 438 acides aminés codée par le gène *PLIN2* situé sur le chromosome 9p22.1. C'est un membre de la PAT protein family. Cette protéine est associée avec les gouttelettes lipidiques ; elle n'est pas retrouvée dans le RE et le Golgi [201]. Elle régule l'assemblage des VLDL et la morphologie des gouttelettes lipidiques (régulateur négatif de la taille des gouttelettes lipidiques) [201, 207]. Un déficit en périlipine 2 protège les souris contre le développement de stéatose hépatique en diminuant le stockage des triglycérides et en favorisant l'assemblage et la sécrétion des VLDL [207]. La surexpression de périlipine 2 augmente l'accumulation hépatique des triglycérides, diminue la concentration en triglycérides plasmatiques et diminue significativement la sécrétion de VLDL-triglycérides [201]. La périlipine 2 est donc un régulateur négatif de la lipodation des VLDL [201]. Elle entre en compétition avec la MTTP pour le même pool de triglycérides synthétisés dans le RE et diminue la disponibilité des lipides disponibles pour la formation des LD dans le RE et des VLDL.



#### ***1.1.4.2. Cideb (Cell death-inducing DFF45-like effector b)***

La protéine Cideb est une protéine de 220 acides aminés codée par le gène *CIDEB* situé sur le chromosome 14q12. Son expression semble régulée par la protéine PGC1- $\alpha$  : la surexpression de la protéine PGC1- $\alpha$  entraîne une surexpression de la protéine Cideb, une diminution de la synthèse hépatique des triglycérides mais une augmentation de la sécrétion des VLDL et une diminution de la stéatose induite par une nourriture riche en graisses [208].

Elle est fortement exprimée dans le foie et joue un rôle important dans le transfert des triglycérides entre les gouttelettes lipidiques et les VLDL [209, 210]. La protéine Cideb est associée à la membrane du RE, aux gouttelettes lipidiques et elle régule la taille des gouttelettes lipidiques [201]. Cette protéine est capable d'interagir avec l'ApoB et elle est indispensable à la lipodation et la maturation des VLDL [209]. Le rôle de la protéine Cideb dans la sécrétion des VLDL a été mis en évidence par blocage de cette protéine soit par des anticorps soit par des miRNA qui entraînent une diminution de la formation des vésicules de transport des VLDL entre le RE et le Golgi [211]. La protéine Cideb est spécifiquement présente dans les vésicules de transport des VLDL et absente des vésicules COP classiques [211]. La protéine Cideb est également présente dans le Golgi et est impliquée dans l'accumulation des VLDL [201].



**Figure 9 : Illustration schématique du rôle de la protéine Cideb dans la lipodation et la maturation des VLDL [209].**

Cideb, grâce à sa localisation du côté cytosolique du RE et à la surface des gouttelettes lipidiques, peut interagir avec l'ApoB et faciliter le transfert des triglycérides synthétisés dans le RE et dans les gouttelettes lipidiques cytosoliques sur les particules de VLDL immatures, permettant ainsi leur lipodation et leur maturation. En l'absence de Cideb, les triglycérides ne peuvent pas être transportés sur les VLDL précurseurs, ce qui entraîne une lipodation insuffisante des VLDL et une accumulation des lipides neutres dans la fraction cytosolique des hépatocytes.

La protéine Cideb est également exprimée dans le jejunum et l'ileum du petit intestin ; la quantité de protéines augmente dans le jejunum de souris alimentées avec une nourriture riche en graisses et elle interagit avec l'ApoB48 [212].

Les souris *Cideb* ko présentent une rétention de lipides dans l'intestin, une diminution de la sécrétion des triglycérides-chylomicrons et des chylomicrons de petite taille alors que la surexpression de la protéine Cideb augmente la sécrétion des triglycérides et diminue l'accumulation des lipides dans les cellules Caco-2 [212]. Elles présentent une stéatose hépatique par accumulation de gouttelettes lipidiques de petite taille, une diminution de la sécrétion des VLDL, une diminution de la quantité de triglycérides dans le Golgi et une surexpression de la périlipine 2 [201, 209]. Par contre, elles sont résistantes à l'obésité et la stéatose induite par une nourriture riche en graisses et elles présentent une meilleure sensibilité à l'insuline [210].

#### **I.1.4.3. ARFRP1 (ADP-ribosylation factor related protein 1)**

La protéine ARFRP1 (ADP-ribosylation factor related protein 1) est une protéine codée par le gène ARFRP1 situé sur le chromosome 20q13.33. Deux transcrits existent codant des protéines de 173 et 201 acides aminés respectivement. C'est une GTPase du *trans*-Golgi membre de la superfamille des protéines Ras. Cette protéine, localisée dans le trans-Golgi est impliquée dans le transport de protéines vers la membrane cellulaire, dans des vésicules de stockage et dans la sécrétion de protéines. Elle contrôle le recrutement d'une cascade de protéines (ARF-like 1 (ARL1), Rab-GTPases) et est impliquée dans le contrôle de la formation des gouttelettes lipidiques et des chylomicrons [213].

Une mutation homozygote de *Arfrp1* chez la souris est létale dès les premiers stades embryonnaires [214]. Par contre des études sur des souris knock out ciblées respectivement sur les entérocytes ou les hépatocytes ont montré que cette protéine est indispensable à la lipidation des chylomicrons et des VLDL dans le Golgi [203, 215]. Les souris KO spécifiquement dans les villosités intestinales (*Arfrp1<sup>vil/-</sup>*) présentent un retard de croissance post-natal, une diminution des acides gras libres, des triglycérides totaux et dans les chylomicrons et une charge en graisses négative [215]. Les entérocytes de souris *Arfrp1<sup>vil/-</sup>* ainsi que les cellules Caco-2 déplétées en ARNm *Arfrp1* absorbent normalement les acides gras mais sécrètent des chylomicrons déplétés en triglycérides et le relargage d'ApoA-I est nettement diminué [215]. Les souris KO spécifiquement dans les hépatocytes (*Arfrp1<sup>liv/-</sup>*) présentent un retard de croissance post-natal, une diminution des triglycérides, de l'apoA1 et de l'apoC-III plasmatiques [203, 213]. Sur le plan hépatique, l'expression du gène *PLIN2* est augmentée, on observe : une accumulation de VLDL dans le Golgi, de triglycérides et de l'ApoC-III et une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques [203, 213]. Le métabolisme lipidique est altéré : on note une diminution des triglycérides-VLDL, un enrichissement des LDL en triglycérides et les fractions les plus denses correspondent à un

mélange de VLDL et d'HDL [203]. Les souris KO spécifiquement dans les adipocytes (*Arfrp1<sup>ad-/-</sup>*) sont lypodystrophiques par défaut de formation des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes [216].

La protéine ARFRP1 est indispensable au stockage du glycogène et à la sécrétion de l'insulin-like growth factor 1 [217]. En revanche, cette protéine n'est pas indispensable à la sécrétion de toutes les protéines [217].

#### ***1.1.4.4. FABP (Fatty Acid Binding Protein)***

Chez l'Homme, il existe au moins neuf protéines cytoplasmiques appartenant à la famille des FABP ; les deux FABP principales sont : FABP1 ou L-FABP exprimée dans le foie et l'intestin et FABP2 ou I-FABP spécifique de l'intestin [218]. Les gènes FABP1 et 2 sont situés sur les chromosomes 2p11 et 4q28-q31 et codent pour des protéines de 127 aa et 132 acides aminés respectivement. Dans l'intestin, FABP1 et FABP2 sont présents du duodénum au colon, mais surtout dans le jéjunum et la protéine FABP1 (L-FABP) est 10 à 40 fois plus abondante que FABP2 (I-FABP) [219, 220]. La répartition des FABP n'est pas homogène : ces deux protéines sont surtout retrouvées dans la partie supérieure des villosités et sont absentes des cryptes chez l'Homme [220].

FABP1 et, à moindre taux FABP2, ont la capacité de générer des PCTV à partir du RE intestinal de rat [221]. Ceci a été confirmé par l'étude de souris *Fabp1<sup>-/-</sup>* : elles ont une capacité de formation de PCTV diminuée à 21% [222]. Par contre les PCTV générées par FABP1 en l'absence de cytosol ne peuvent pas fusionner avec le Golgi [221]. Ces deux protéines lient les acides gras, mais présentent deux différences majeures [223]. Premièrement, FABP2 est plus spécifique et ne lie que les acides gras à longue chaîne (AGL) alors que FABP1 lie également d'autres molécules comme les sn2-monoacylglycérols, les lysophospholipides et les acides biliaires [224]. Deuxièmement, ces deux protéines peuvent transférer les AGL sur les membranes phospholipidiques mais en utilisant deux mécanismes différents : par interactions collisionnelles pour FABP2 et par diffusion aqueuse ou FABP1 [224, 225]. Ceci traduit probablement des rôles différents : FABP1 pourrait réguler la concentration en acides gras libres cytosoliques alors que FABP2 pourrait être impliquée dans la capture ou le ciblage des acides gras vers les membranes subcellulaires [225].

Le rôle différentiel des deux protéines FABP a été mis en évidence dans deux études : FABP1 oriente les acides gras vers la voie oxydative et les monoacylglycérols vers la voie anabolique alors que FABP2 oriente les acides gras vers la synthèse des triglycérides [226, 227]. Les

souris *Fabp1*<sup>-/-</sup> incorporent moins le monoacylglycérol dans les triglycérides alors que les souris *Fabp2*<sup>-/-</sup> incorporent moins les acides gras dans les triglycérides [227].

Les souris ko *Fabp1*<sup>-/-</sup> sont phénotypiquement normales lorsqu'elles sont alimentées normalement [228]. Après 48h de jeûne, elles présentent un défaut de sécrétion des VLDL et une diminution significative d'accumulation de triglycérides hépatiques; la capture des acides gras par les hépatocytes en culture est normale mais atteint un plateau [228]. De plus, elles présentent une accumulation de triglycérides intestinaux en cas de régime riche en graisses et un défaut de sécrétion intestinale des triglycérides après charge en graisses [229]. Les études montrent des résultats contradictoires concernant la prise de poids (surpoids ou amaigrissement) et l'apparition ou non d'une stéatose chez des souris *Fabp1*<sup>-/-</sup> avec alimentation riche en graisses, qui pourraient dépendre des conditions expérimentales : sexe, présentation des graisses dans la nourriture [226, 227, 230, 231]. Leur sécrétion de chylomicrons est normale après charge en graisses [227].

Les souris ko *Fabp2*<sup>-/-</sup> sont phénotypiquement normales lorsqu'elles sont alimentées normalement [227]. Lorsqu'elles sont alimentées avec une nourriture riche en cholestérol, ces souris restent minces bien qu'elles présentent une absorption intestinale normale et une sécrétion augmentée de chylomicrons (p<0.05) [227].

#### ***1.1.4.5. ApoA-IV***

L'ApoA-IV est une protéine de 396 acides aminés (46kDa) codée à partir du locus *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* situé sur le chromosome 11q23-qter.

Chez l'Homme, l'ApoA-IV est synthétisée par l'entérocyte pendant l'absorption des lipides et sécrétée dans la lymphe à la surface des chylomicrons [232]. Différentes fonctions ont été décrites (revues dans [233]) : l'apoA-IV facilite le transfert de l'ApoC-II sur les LRTG et stimule la vitesse maximale (*Vmax*) de la LPL (lipoprotéine lipase)[233]. Elle favoriserait ainsi la clairance des LRTG. Elle intervient également dans le métabolisme des HDL : elle stimule la LCAT (lecithin cholesterl acyltransferase), favorise l'efflux du cholestérol, participe à la conversion des HLD3, module la CETP (cholesteryl ester transfert protein). Plus récemment, l'expression de l'ApoA-IV intestinale a été associée avec l'absorption intestinale active des lipides. L'abondance de l'ApoA-IV est régulée par le statut nutritionnel : elle est augmentée lors d'une alimentaiton riche en graisses et diminuée en cas de malabsorption (ABL).

Au niveau cellulaire, l'ApoA-IV favorise la sécrétion de lipoprotéines plus larges et plus riches en triglycérides [234]. En effet, l'expression de l'ApoA-IV humaine native dans

les cellules McA-RH7777 augmente la sécrétion des triglycérides de 20 à 35% et augmente la taille des VLDL1. Au contraire, l'expression de l'ApoA-IV avec mutation de la séquence KDEL (non retenue dans le RE) entraîne une diminution de la sécrétion de l'ApoB, des triglycérides et une accumulation de triglycérides dans les cellules McA-RH7777 et une diminution de la sécrétion de l'ApoB dans les cellules COS [234, 235]. L'ApoA-IV, qui interagit avec l'ApoB de taille supérieure à 25% quelle que soit sa lipodation, pourrait donc jouer un rôle de chaperone et favoriser la rétention des particules naissantes contenant de l'ApoB dans les compartiments cellulaires où se déroule la lipodation [234, 235].

Des souris ko ont été générées mais présentent également une nette diminution de l'ApoC-III (les deux gènes sont situés sur le même locus) : les résultats obtenus avec ces souris sont donc à interpréter avec prudence ; au niveau intestinal, ces souris ne présentent pas de diminution d'absorption [236]. Le rôle de l'ApoA-IV pourrait se manifester seulement dans des conditions où les capacités de transport intestinal des lipides sont altérées [234].

Au contraire, au niveau hépatique, l'expression de l'ApoA-IV, qui est régulée par le contenu intracellulaire en triglycérides, favorise l'efflux des triglycérides en favorisant l'expansion des VLDL sans augmenter le nombre de lipoprotéines contenant de l'ApoB et diminue le contenu intracellulaire en triglycérides [237]. Chez l'Homme, il semblerait que l'ApoA-IV soit synthétisée par le foie (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOA4>, page consultée le 27/08/2014).

#### ***1.1.4.6. ApoC-III***

L'ApoC-III est une apolipoprotéine échangeable de 99 acides aminés ; la protéine mature comporte 79 acides aminés. Elle est synthétisée principalement par le foie et l'intestin à partir du locus *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* situé sur le chromosome 11q23-qter et sécrétée dans le sang dans les HDL et les VLDL [238].

Les souris et les mini-cochons surexprimant le gène *APOC3* humain ont une hypertriglycémie sévère et certaines présentent une stéatose hépatique [239-242]. Certaines études ont montré une surproduction de VLDL (augmentation du nombre de particules), de taille augmentée, plus riches en triglycérides, en ApoC-III et contenant moins d'ApoE et d'ApoC-II [239, 241]. Les souris ko (*Apoc3<sup>-/-</sup>*) présentent une diminution des triglycérides (70% de la normale) et du cholestérol HDL, sans qu'une diminution de la production des VLDL ne soit observée [243, 244].

Jusqu'en 2010, le rôle de l'ApoC-III était connu principalement dans la lipolyse (cf. chapitre lipolyse II.1.4. ), comme protéine inhibitrice de la LPL et inhibant la clairance

hépatique des LRTG, mais Sundaram *et al* ont montré que l'ApoC-III joue un rôle crucial dans l'assemblage des VLDL et l'incorporation des triglycérides dans le précurseur de lipoprotéine, indépendamment de la MTTP [245, 246]. Leur étude sur cellules McA-RH7777 en présence d'oléate exogène montre que la surexpression d'ApoC-III entraîne une augmentation de l'ARN messager (ARNm) *MTTP*, de l'activité MTTP, des TG-VLDL1 gène-dose dépendante et de la sécrétion d'ApoB48 et d'ApoB100 [246]. L'ApoC-III n'intervient pas dans la formation du précurseur des particules de lipoprotéines mais intervient dans la phase ultérieure, indépendante de la MTTP. Les protéines présentant les mutations les plus fréquemment retrouvées (p.A23T et p.K58E) sont incapables de promouvoir l'incorporation des triglycérides au cours de l'assemblage des VLDL : l'ApoC-III pourrait intervenir dans la lipidation et la maturation des VLDL et la fusion des particules de VLDL avec les gouttelettes lipidiques du RE [246, 247]. Chez l'Homme, une augmentation de l'ApoC-III dans les VLDL est associée à une augmentation de production plutôt qu'à une diminution du turnover des VLDL et les patients hypertriglycéridémiques présentent une surproduction de VLDL contenant de l'ApoC-III et une stagnation sanguine lipoprotéines [248]. Les sujets hypertriglycéridémiques présentent une augmentation de production de l'ApoC-III par rapport aux sujets normaux [249].

## **I.2. Synthèse intestinale des chylomicrons : la voie exogène**

### **I.2.1. Lipoprotéines intestinales : chylomicrons**

L'intestin grêle sécrète à son pôle basal trois classes de lipoprotéines : les chylomicrons, qui sont majoritaires, les VLDL et les HDL [250]. Une synthèse d'ApoB100 existe dans l'intestin sans que sa signification soit connue [251]. Les chylomicrons sont les plus grosses lipoprotéines retrouvées dans le sang circulant (100-500 nm de diamètre) mais elles ont une faible densité (<0,93 g/ml). Leur fonction est essentielle puisqu'il s'agit du transport des lipides apportés par la nourriture, en particulier les triacylglycérols. Les chylomicrons sont composés majoritairement de lipides puisque 85-92% de leur poids correspond à des triacylglycérols, environ 1-3% de cholestérol, moins de 6-12% de phospholipides et moins de 1-2% du poids correspondent à des protéines (ApoB48, ApoAI et ApoA-IV). Ils sont très hétérogènes non seulement en taille mais également dans leur composition. L'ApoB48 est présente en quantité minime mais est indispensable à leur sécrétion.

### **I.2.2. Absorption, synthèse et sécrétion des composants des chylomicrons dans les entérocytes**

L'alimentation quotidienne apporte 60 à 150 g/j de lipides, essentiellement sous forme de triglycérides. Chez le sujet sain, 97 à 98 % des triglycérides ingérés sont assimilés contre seulement 30 à 70 % du cholestérol.

#### ***1.2.2.1. Triacylglycérides***

Dans la lumière du tube digestif, les triglycérides à chaîne moyenne (TCM) et longue (TCL) sont hydrolysés par la lipase pancréatique libérant ainsi les acides gras. Cette hydrolyse est plus rapide et plus complète pour les TCM que pour les TCL. Les TCM et les triglycérides à chaîne courte (TCC) sont également hydrolysés par la lipase intestinale. Les acides gras diffusent à travers la membrane entérocytaire quand leur concentration extracellulaire est supérieure à la concentration intracellulaire ; quand ce n'est pas le cas, l'absorption des acides gras libres est assurée par des protéines membranaires spécifiques : SLC27A1 (FATP selon l'ancienne nomenclature, solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1), CD36 (CD36 molécule (thrombospondin receptor)) [206].

Dans le RE, les monoacylglycérols sont estérifiés avec les acides gras par la monoacylglycérol transférase en diacylglycérol (DAG) [206]. Les DAG sont soit estérifiés



soit avec un acide gras supplémentaire en triacylglycérols (TAG) par la diacylglycérol transférase (DGAT) soit avec la choline et l'éthanolamine en phospholipides par la choline et l'éthanolamine transférase [205, 206]. Dans les entérocytes, il existe au moins deux pools distincts de triacylglycérol (TAG) [252, 253]. Les acides gras à chaîne moyenne et courte ne sont pas ré-estérifiés : ils rejoignent directement le foie *via* la veine porte. Les acides gras à chaîne longue sont largement liés aux protéines FABP et la majorité est convertie en TAG dans les chylomicrons [218].

#### ***1.2.2.2. Le cholestérol***

Le cholestérol estérifié alimentaire est hydrolysé dans la lumière intestinale. Le cholestérol libre est solubilisé par les acides biliaires dans des micelles et est absorbé par les cellules intestinales. La protéine NPC1L1 joue un rôle majeur dans l'absorption du cholestérol par les entérocytes. Dans les conditions normales, des microdomaines appelés rafts sont enrichis en protéine NPC1L1 : la liaison du cholestérol entraîne un changement de conformation, le recrutement de la protéine Numb et de clathrine, endocytose et transport vers les autres organelles [206, 254].

#### **1.2.3. Formation des chylomicrons**

Les mécanismes moléculaires conduisant à la synthèse et la sécrétion des chylomicrons dans les cellules épithéliales intestinales ne sont pas totalement élucidés. Deux éléments apparaissent toutefois. Bien que la synthèse des chylomicrons soit intimement liée à la synthèse de l'ApoB48, cette protéine ne suffit pas à former les chylomicrons et les cellules intestinales dépourvues de cette protéine peuvent synthétiser des chylomicrons contenant l'ApoB100. La formation des chylomicrons est donc une propriété particulière des cellules intestinales [255].

Les éléments connus de ce métabolisme ont été déduits de l'étude des malades souffrants d'ABL, de FHBL ou de CMRD, des modèles animaux ou cellulaires utilisés pour expliquer ces maladies (déficit en MTTP ou mutations de l'ApoB) ainsi que de l'utilisation de substances exogènes [256, 257].

Lorsque les études utilisent des modèles cellulaires, elles ne sont informatives que lorsqu'elles utilisent des cellules polarisées et de préférence intestinales. En effet, les entérocytes sont des cellules polarisées et il semblerait que la synthèse des lipoprotéines contenant l'ApoB soit différente entre l'hépatocyte et l'entérocyte [258]. D'autre part, il faut également tenir compte de la capacité ou non de ces cellules à synthétiser l'ApoB48.



### ***1.2.3.1. Synthèse d'ApoB48, protéines impliquées dans le mRNA editing***

Dans les cellules intestinales, la majorité de l'ARNm de l'ApoB est 'édité' par un complexe composé d'au moins deux protéines : APOBEC-1 et l' APOBEC-1 complement factor (ACF). Après la transcription, le complexe se lie à une séquence longue de 11pb riche en AU, 5pb en aval de la cytidine 6 666 (base 6538 sur la séquence NM\_000388.2 selon la nouvelle nomenclature). Cette cytidine d'un codon glutamine est désaminée en uridine ce qui conduit à un codon stop prématuré (p.Gln2153\*)[22, 25]. L'ARN édité est traduit en un polypeptide de 2 152 acides aminés masse moléculaire approximative 264 k Da [23], appelé **ApoB48** car il correspond à 48% de l'ApoB100 (extrémité N terminale). Cette capacité à synthétiser de l'ApoB48 dans les cellules intestinales est un élément qui apparaît au cours de la maturation fœtale et du développement [259-261].

Chez l'Homme, on le retrouve principalement dans le duodénum, l'iléum et surtout le jéjunum où plus de 90% des ARN d'ApoB intestinaux subissent le « mRNA editing » [262] bien que la quantité de transcrit non édité varie de 2 à 19% selon les individus [259]. Moins de 2% des ARN d'ApoB hépatiques humains subissent le mRNA editing qui produisent donc uniquement de l'ApoB100, contrairement aux cellules hépatiques du rat, de la souris, du chien et des chevaux qui produisent conjointement de l'ApoB48 et de l'ApoB100 [25, 259, 260, 262].

L'Apobec1 intervient sous forme d'une holo-enzyme contenant deux protéines : Apobec-1, l'ARN-spécifique cytidine désaminase et son cofacteur A1CF qui représente la sous-unité liant l'ARN [263, 264]. Ce complexe, qui reconnaît une séquence de 11 nucléotides (6661 à 6671), est nécessaire et suffisant pour désaminer plus de 90% de C en U en position 6666 de l'ARN de l'ApoB afin de former la protéine ApoB48. Plusieurs études ont montré qu'il existe en 3' de la position c.6666 d'autres sites de désamination [265, 266]. D'autres protéines pourraient intervenir dans la régulation de l'activité de ce complexe : CUGBP-2, GRY-RBP, KSRP, hnRNPC1, ABBP1, ABBP2 [267].

C'est un élément d'évolution qui n'est retrouvé que chez les mammifères [268] ; en cas de pénurie de nourriture ou de nourriture pauvre en graisses, l'ApoB48 est plus efficace pour l'absorption des graisses par les cellules intestinales que l'ApoB100 notamment sur les étapes précoces de la formation des chylomicrons [268]. Le rôle précis de cette adaptation au cours de l'évolution est mal connu mais le mRNA editing intestinal semble être un avantage de survie. Des études d'abolition ou de surexpression ont été menées chez les souris.

Les souris ko *Apobec-1*<sup>-/-</sup> sont viables et en bonne santé [269, 270]. Elles sont caractérisées par l'absence complète de synthèse d'ApoB48 [269-271] témoignant l'absence de redondance

avec d'autres cytidine désaminases [22]. Les souris ko *Apobec-1*<sup>-/-</sup> ont été produites par différents laboratoires et les résultats concernant l'absorption intestinale sont contradictoires, montrant soit une absorption identique à celle des WT [269, 270], suggérant ainsi que la sécrétion d'ApoB100 par l'intestin est aussi efficace que celle d'ApoB48 pour l'absorption intestinale, soit une absorption réduite [268]. Ces souris sécrètent moins de lipoprotéines riches en triglycérides conduisant à l'accumulation de triglycérides dans la muqueuse intestinale, et les chylomicrons sériques sont plus gros que chez les souris sauvages [266, 272]. Les entérocytes des souris ko alimentées normalement (chow fed) sont plus riches en triglycérides que ceux de souris WT [268]. Concernant leur phénotype lipidique, leurs concentrations de cholestérol et de triglycérides sont sensiblement identiques à celles des WT, cependant leur concentration d'ApoB est plus élevée et leur concentration de cholestérol HDL plus basse [270, 271]. Les souris *Apobec1*<sup>-/-</sup>/*Mtp*<sup>-/-</sup> *IKO* (souris KO intestinales) ont une mortalité augmentée lorsqu'elles sont alimentées normalement et une mortalité >90% lorsqu'elles ont une alimentation riche en graisses par défaut d'adaptation intestinale, activation exagérée de la voie UPR et augmentation du stress dans le RE [129].

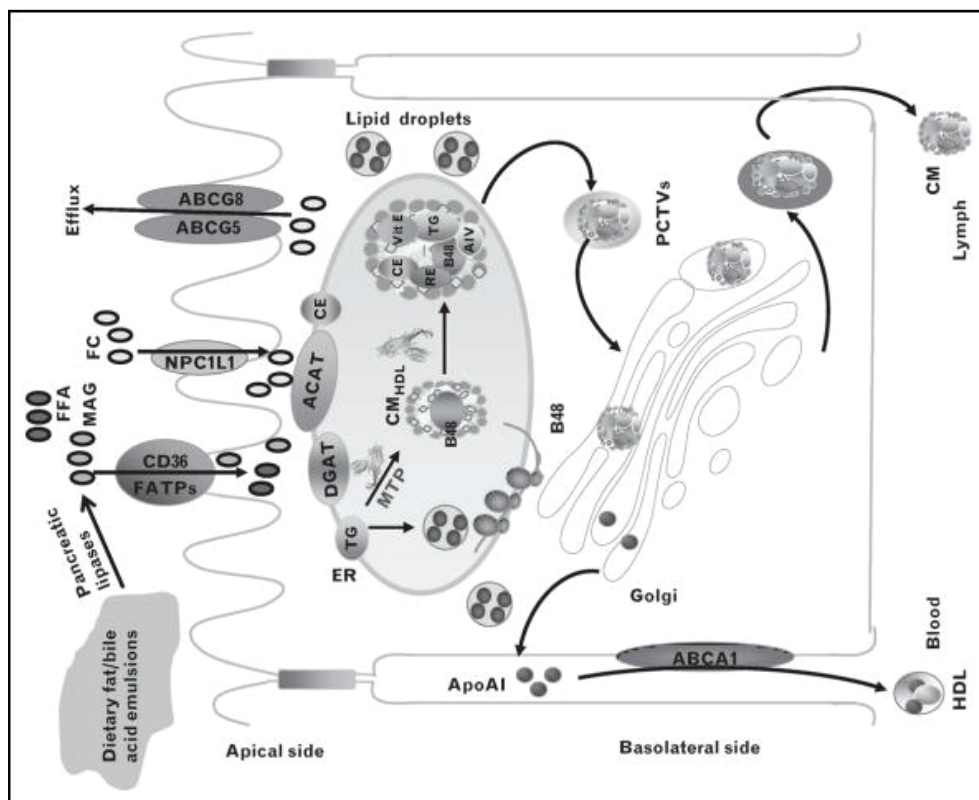
Les souris *Acf*<sup>+/-</sup> sont viables, en bonne santé et fertiles ; par contre les souris ko *Acf*<sup>-/-</sup> ne sont pas viables [273]. De façon inattendue, chez les souris *Acf*<sup>+/-</sup> (50% d'expression de ACF), le mRNA editing de l'ApoB au niveau hépatique est augmenté [273]. Les souris et les lapins avec surexpression hépatique de Apobec-1 présentent des dysplasies hépatiques et des carcinomes hépatiques [274] ; chez ces souris on observe également un hyperediting de l'ARNm sur d'autres sites en 3' de la position habituelle. Ce complexe joue donc un rôle primordial dans la synthèse d'ApoB48 par les cellules intestinales.

### **I.2.3.2. Reticulum endoplasmique**

L'assemblage des chylomicrons commence dans le reticulum endoplasmique [275, 276].

Le modèle le plus actuel consiste en l'expansion du « core » de lipoprotéines primordiales qui ont une densité proche de celle des HDL et des LDL [276]. La MTTP est nécessaire à la synthèse de ces lipoprotéines primordiales et lors de l'expansion du core des lipoprotéines primordiales. L'ApoB interagit avec la MTTP et est lipidée (cf. I.1.1. ). Différentes protéines chaperones seraient utiles : MTP, Bip, Hsp110 pour éviter la dégradation de l'ApoB [276]. Des études suggèrent que les chylomicrons sont synthétisés dans le reticulum endoplasmique granuleux sous forme de particules denses (même densité que les HDL) comportant de l'ApoB48 et des phospholipides (CM<sub>HDL</sub>). Ces particules sont

ensuite converties en lipoprotéines plus larges (CM<sub>L</sub>) par fusion avec des particules riches en triglycérides dépourvues d'ApoB dans le reticulum endoplasmique lisse [205, 206, 277]. La protéine Cideb semble également impliquée dans la lipidation des chylomicrons [212]. L'ApoA-IV est ajoutée à la surface des particules contenant l'ApoB48, permettant la formation de particules plus larges ; l'ajout de l'ApoA-IV stabiliserait et/ou maintiendrait la surface des pre-chylomicrons dans le RE permettant la lipidation du core lipidique [213]. L'acquisition de l'ApoA-IV facilite ensuite le transport des lipoprotéines en dehors du RE [278]. La figure ci-dessous représente cette hypothèse [278].



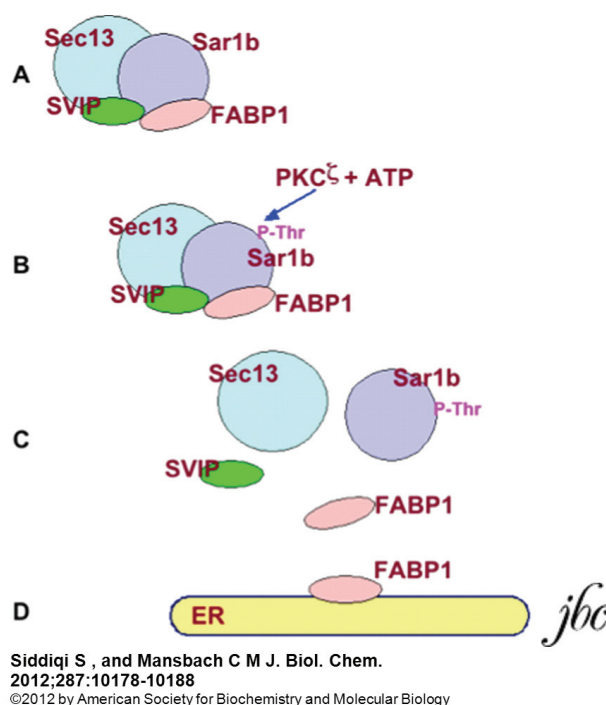
**Figure 10 : Modèle de l'assemblage des chylomicrons [206]**

ACAT acyl-coenzyme A (CoA):cholesterol acyltransferases, CD36 thrombospondin receptor, DGAT diacylglycérol transférase, FATP (SLC27A1 selon la nouvelle nomenclature : solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1), FC free cholesterol, FFAs free fatty acids, MAGs monoacylglycerols.

### ***1.2.3.3. Transport entre le reticulum endoplasmique et le Golgi***

Comme nous l'avons évoqué précédemment, des vésicules de transport spécifiques, **les vésicules transportant les pré-chylomicrons (PCTV : Pre-Chylomicron Transport Vesicle)** assurent le transport entre le reticulum endoplasmique et le Golgi [157]. Il semblerait que cette étape de transport entre le reticulum endoplasmique et le Golgi soit une des étapes limitantes de la formation des chylomicrons [252]. Ce mode de transport entre le RE et le Golgi semble être spécifique des chylomicrons et ces vésicules des 350 à 500 nm de diamètre sont adaptées au transport des chylomicrons (100-500 nm de diamètre)[279].

La **formation** des vésicules (budding) requiert la présence de cytosol, d'ATP, de phosphokinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) et d'un complexe contenant VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7), v-SNARE (vesicle associated soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), ApoB48, FABP1, CD36 et des protéines COPII : Sar1b, Sec23 et Sec24C qui ne sont disponibles qu'en présence de cytosol et ATP [156, 222, 280, 281]. L'initiation de la formation des PCTV requiert la présence de la protéine FABP1 ou FABP2, qui, en l'absence d'ATP et de GTP, peuvent lier la membrane du RE et organiser le complexe prévésiculaire [221, 222]. Dans le cytosol, FABP1 est présente sous forme de multimère (Sar1b, SVIP (small VCP /p97 interactive protein), FABP1, Sec13) qui empêche la liaison de FABP1 avec la membrane du RE ; lorsque la PKC $\zeta$  phosphoryle la protéine Sar1b, la protéine FABP1 est libérée de ce complexe et peut lier le RE [282] (cf. Figure ci-dessous).



**Figure 11 : Modèle de l'itinéraire de FABP1 du cytosol à la membrane du RE. [282]**

Cependant, le trafic et la fusion des PCTV avec le Golgi nécessitent les protéines COPII, Sar1, Sec23/24, Sec13/31, et le complexe de fusion SNARE composé de VAMP7, syntaxin 5, rBet1, vti1a [156, 283, 284]. La présence de la protéine VAMP7 est nécessaire mais n'est pas suffisante pour la fusion des PCTV avec le Golgi [221]. La présence des protéines Sar1 et Sec24C est indispensable pour la fusion sur la membrane du Golgi [221, 284]. Ces vésicules sont **entourées d'une bicouche lipidique** ce qui permettrait de protéger les chylomicrons de l'action de la lipase alcaline intestinale qui se trouve dans le cytosol des entérocytes [156, 157]. Elles contiennent le triacylglycérol, l'ApoB48, la MTP et l'apoA-IV mais également la NADPH cytochrome c réductase et une phosphatase acide. Les PCTV

isolées à partir de cellules Caco2 surexprimant la protéine Sar1b comportent LFABP/FABP1, CD36, Sar1, Sec12/Sec23/24 et p125A [156, 202]. De plus, les PCTV contiennent très peu d'ApoA-I contrairement à l'appareil de Golgi et aux chylomicrons, ce qui laisse supposer que cette protéine, synthétisée dans le reticulum endoplasmique, utilise un autre mode de transport que les PCTV pour gagner le Golgi [156, 157].

Bien qu'elles aient une taille importante, ces vésicules, comme les vésicules COPII contiennent des protéines Sec13, Sec31 et Sar1, laissant supposer **qu'il pourrait s'agir de vésicules COPII** alors que celles-ci sont habituellement de taille plus modeste (50-80 nm de diamètre) [145, 156, 157]. Ceci est contradictoire avec les observations de Kumar *et al* qui ont montré que les mouvements des triglycérides entre le reticulum endoplasmique et le Golgi sont indépendants du GTP [285], nécessaire à la formation des vésicules COPII.

#### ***1.2.3.4. Le Golgi***

Dans le Golgi, les chylomicrons poursuivent leur formation; peu de choses sont connues au sujet de la maturation des chylomicrons dans le Golgi. Physiologiquement, le passage par l'appareil de Golgi est obligatoire puisque c'est le compartiment dans lequel l'ApoB48 des chylomicrons est glycosylée, la composition des lipides est modifiée, l'ApoA-I est incorporée [156, 286, 287]. La MTTP interviendrait également à ce stade de la synthèse des chylomicrons [90]. Récemment, Jaschke *and al* ont montré que la cascade ARFRP1-ARL1-Golgin-Rab est nécessaire dans le Golgi pour la lipidation finale des chylomicrons et à l'assemblage de l'apoA-I aux chylomicrons [215].

#### ***1.2.3.5. Sécrétion des chylomicrons***

Enfin, les chylomicrons sont transportés jusqu'à la membrane basolatérale de l'entérocyte, *via* un système vésiculaire séparé pour l'exocytose dans la lamina propria intestinale [275, 276].

### **1.2.4. Facteurs influençant la sécrétion des lipoprotéines intestinales**

Les facteurs influençant la sécrétion des lipoprotéines intestinales sont multiples. Nous pouvons en particulier citer la transcription de l'ApoB, la quantité d'ApoA-IV et les perfusions de lipides.

La perfusion de cellules intestinales par des solutions lipidiques conduit, en fonction du protocole expérimental utilisé, soit à une mobilisation du pool préexistant de triacylglycérol (cellules intestinales de lapins isolées) soit à une mobilisation du

triacylglycérol nouvellement synthétisé (perfusion *in vivo* et excision du duodénum) [252, 288]. Quoiqu'il en soit, plusieurs études montrent que les perfusions prolongées (2 semaines) de repas riches en graisses augmentent la synthèse et la sécrétion de l'ApoB48, du TAG et du cholestérol estérifié et que cette augmentation dépend du type d'acides gras perfusés avec dans l'ordre décroissant huile de tournesol (riche en acides gras polyinsaturés n-6), l'alimentation mixte, l'huile de poisson (riche en AG polyinsaturés n-3) [288]. Cet effet n'est pas retrouvé après une seule administration. La perfusion par de fortes concentrations d'acide oléique entraîne l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons, une augmentation de la sécrétion de l'ApoB mais n'a aucun effet sur la sécrétion d'ApoA-1 [289]. La sécrétion de l'ApoB augmente avec l'expression de la MTTP [115]. Chez les souris WT une alimentation riche en graisses entraîne une diminution de Ire1b, une régulation positive (upregulation) de la MTTP intestinale et une induction de stress dans le RE [115]. Cette régulation positive (upregulation) est inversement proportionnelle à la quantité d'Ire1b [115].

Des données récentes montrent que l'intestin sécrète continuellement des particules contenant de l'ApoB48 et que en période post-prandiale, ces particules fusionnent avec les gouttelettes lipidiques et sont sécrétées sous forme de larges particules enrichies en triglycérides [290].

### **I.3. Synthèse hépatique des VLDL : la voie endogène**

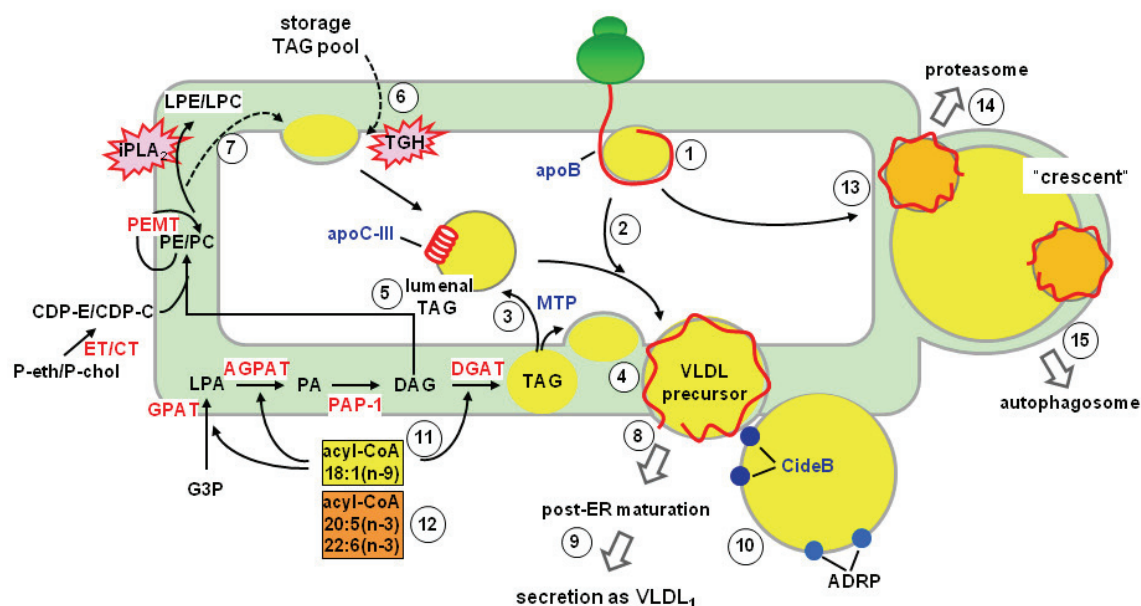
#### **I.3.1. Etapes de la synthèse**

Les VLDL sont des lipoprotéines de 30-80 nm de diamètre, composées d'une molécule d'ApoB-100 et de multiples copies d'autres apolipoprotéines (ApoE, ApoC), de quantités variables de triglycérides et de cholestérol estérifié dépendant de la taille des particules. Le foie synthétise des VLDL en incorporant les triglycérides provenant de 3 origines : 1/ la capture des acides gras liés à l'albumine 2/ la capture des acides gras-triglycérides des remnants de chylomicrons et de VLDL, 3/ de la synthèse de novo (lipogénèse) hépatique [291].

En période post prandiale, il existe une sécrétion de chylomicrons mais également une sécrétion de VLDL et le nombre de particules de VLDL en période post-prandiale est plus important que le nombre de chylomicrons [292, 293]. De plus, la composition des VLDL produites en période post-prandiale est différente de celle des VLDL produites à jeun : les VLDL produits à jeun sont plus riches en lipides insaturés [294].



La synthèse des VLDL est mal connue. Des études sur cellules HepG2 et sur hépatocytes de rat suggèrent que la synthèse commence dans le RE, correspond à l'étape limitante, et se produirait en deux étapes [54, 57, 194].

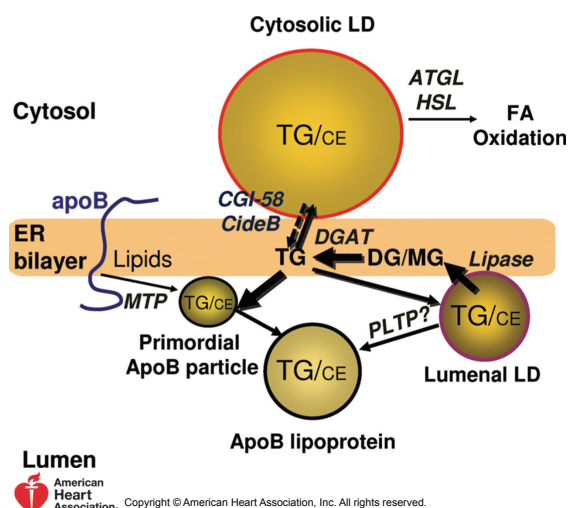


**Figure 12 : Protéines et facteurs lipidiques affectant l'assemblage et la sécrétion des VLDL. [99]**

*ADRP*, adipocyte differentiation-related protein; *AGPAT*, acylglycerol-3-phosphate acyltransferase; *CDP-C*, CDP-choline; *CDP-E*, CDP-ethanolamine; *CT*, CTP:phosphocholine cytidyltransferase; *DAG*, diacylglycerol; *DGAT*, acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase; *ET*, CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase; *G-3-P*, glycerol-3-phosphate; *GPAT*, glycerol-3-phosphate acyltransferase; *LPA*, lysophosphatidate; *LPC*, lysophosphatidylcholine; *LPE*, lysophosphatidylethanolamine; *MTP*, microsomal triglyceride-transfer protein; *PAP-1*, phosphatidate phosphatase-1; *PC*, phosphatidylcholine; *P-cho*, phosphocholine; *PE*, phosphatidylethanolamine; *P-eth*, phosphoethanolamine; *TAG*, triacylglycerol; *VLDL*, very low density lipoproteins.

Pendant la première étape (Figure 12, étape 1), l'ApoB est synthétisée dans le RE rugueux par lipitation co-traductionnelle (cf. précédemment). A cette étape se déroule le premier contrôle de qualité et l'ApoB peut subir une dégradation par le protéasome (voie ubiquitine) ou par autophagie (Figure 12, étapes 14 et 15) (cf. I.1.1. ) [51, 63, 65]. La lipitation de l'ApoB conduit à la formation d'une petite particule appelée « VLDL primordiale » de 10-20 nm [194, 295, 296]. Ces particules sont retenues dans le RE par liaison à des protéines chaperones comme la glucose-regulated protein 78 (gp78 ou BiP), la PDI, ERp72, GRP94/Hsp90 tant que la lipitation ou le repliement de l'ApoB ne sont pas correctes ; certaines protéines jouent également un rôle dans le relargage de la protéine lipidée de la membrane et sont retrouvées associées à l'ApoB dans le Golgi [297]. Ensuite, la lipitation se poursuit par fusion avec une gouttelette lipidique sans ApoB contenant l'apoC-III et appelée « lumenal cytosolic droplets » qui est la source majeure de lipides pour l'assemblage des VLDL (Figure 12, étapes 2-5) [194, 204]. En plus des TG synthétisés *de novo* (catalysés par *GPAT*, *AGPAT*, *PAP-1*, et *DGAT*), les substrats triglycérides utilisés pour

l'assemblage des VLDL dérivent également de l'estérification des acides gras provenant des pools de triglycérides de la lumière du RE ou du métabolisme des phospholipides par la phospholipase A2 calcium-idependante (iPLA2) (Figure 12, étapes 6-7), ainsi que la phospholipase D stimulée par ARF1 [99, 296]. La MTTP ne semble pas être indispensable dans cette étape [298, 299]. Des études récentes ont impliqué la protéine Cideb dans la lipidation des VLDL dans le RE [209].



**Figure 13 : Modèle en deux étapes de l'assemblage des lipoproteins contenant de l'ApoB dans le RE [112]**

Les TG des gouttelettes lipidiques lumineuses (LD) sont hydrolysés par des lipases (carboxylesterase3/ triacylglycerol hydrolase) et les produits plus facilement solubles dans la bicouche lipidique (DAG et MAG) sont ré-estérifiés par les acyltransférases du RE (DGAT) en TG. Les TG ainsi générés sont utilisés pour lipider les particules primordiales contenant de l'ApoB. La PLTP (Phospholipid transfer protein) peut transférer des phospholipides supplémentaires pour la maturation de la lipoprotéine. Les TG qui ne sont pas utilisés pour l'expansion de la lipoprotéine peuvent être stockés dans les gouttelettes lipidiques soit cytosoliques (processus médié par perilipine et FIT (fat storage-inducing transmembrane proteins)) soit lumineuses (processus médié par la MTP). CideB et CGI-58 (comparative gene identification 58) participent à l'assemblage des VLDL selon des mécanismes inconnus actuellement. CE, cholesteryl esters; ATGL, adipose triglyceride lipase; HSL, hormone-sensitive lipase; DGAT, diacylglycerol acyltransferases; DG, diacylglycerol; MG, monoacylglycerol; FA, fatty acid.

Actuellement les mécanismes de fusion des ApoB primordiales avec les gouttelettes lipidiques ne sont pas totalement élucidés [112]. Les protéines qui semblent intervenir en plus de Cideb sont ARFRP1, périlipine 2, ApoC-III mais les mécanismes exacts et leur localisation subcellulaire (RE et/ou Golgi) ne sont pas clairs.

Quand la lipidation et le repliement sont corrects, les particules peuvent être exportées vers le Golgi sous forme de VLDL2 et la maturation des VLDL se poursuit dans le Golgi (Figure 12, étape 8)[57]. Ce modèle en deux étapes distinctes a été établi après étude de cellules d'hépatome de rat cultivées en présence d'acide oléique, cependant, les hépatocytes primaires peuvent également procéder sans les deux étapes distinctes [17].

Le transport des VLDL entre le RE et le Golgi (revu par Tiwari *et al*) est une étape importante [300]. Dans les études les plus récentes sur cellules primitives hépatiques de rat, ce transport est assuré par des vésicules particulières, appelées VLDL transport Vesicles (VTV),



de 100 à 120 nm de diamètre, protégeant l'ApoB [158]. La protéine Sar1 et la machinerie COPII sont nécessaires pour la formation de ces vésicules et très récemment, Fryer *et al* ont montré que la protéine Sar1b est impliquée dans la sécrétion des lipoprotéines hépatiques [155, 158, 162]. Tiwari *et al* ont montré que la protéine CideB interagit avec l'ApoB100, les protéines Sar1 et Sec24 et qu'elle est indispensable à la formation des VTV [211]. Ces vésicules ne contiennent pas VAMP7 [158, 211] ; la fusion des vésicules de transport avec le Golgi implique quatre protéines particulières : Sec22b qui lie l'ApoB dans le RE, GOS28, synthaxin5 et rBet1 [281].

Dans le Golgi, l'ApoB100 subit une glycosylation, une phosphorylation, et un changement de conformation [55, 199, 301]. L'ApoE et l'ApoA-1 sont ajoutées aux VLDL dans ce compartiment [199, 302]. Les VLDL2 sont soit sécrétées directement, soit subissent une nouvelle étape de lipidation, permettant la formation de VLDL1 plus riches en triglycérides en particulier en présence d'acides gras et d'acide oléique [193]. Les VLDL sont ensuite exportées vers la membrane plasmique (transport antérograde) dans des vésicules spécifiques les PG-VTV (post TGN VLDL transport vesicle) dont la formation est dépendante de la présence de GTP [302]. Ces vésicules contiennent les protéines MTTP, VAMP7 et SNAP23 alors que Sec22 et Sar1 sont absentes [302].

La figure suivante récapitule la sytnhèse et la sécrétion des VLDL ainsi que les sites de dégradation de l'ApoB.

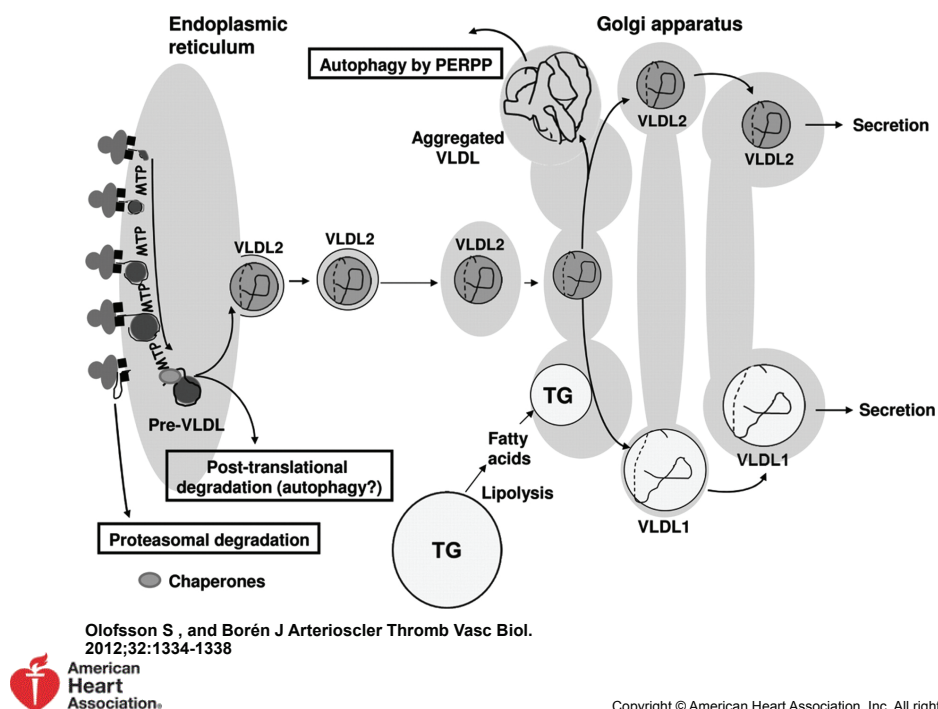


Figure 14 : Assemblage des VLDL et dégradation de l'ApoB [56]

### **I.3.2. Régulation de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL**

Le nombre de particules de VLDL assemblées est déterminé par la quantité d'ApoB disponible qui est régulée non pas par la synthèse de l'ApoB mais par sa dégradation.

#### **I.3.2.1. Voie ERAD : dégradation par le protéasome et autophagie**

Comme nous l'avons vu précédemment (cf.I.1.1. ), la sécrétion de l'ApoB est unique car sa sécrétion est régulée par sa dégradation. L'assemblage des VLDL est régulé par cette étape d'ubiquitination par le protéasome dans la dégradation associée au RE (ERAD) [303]. La quantité de lipides présents régule la dégradation par la voie ERAD, la voie PERPP et par l'autophagie [61, 70, 304].

#### **I.3.2.2. Voie UPR et stress dans le reticulum endoplasmique**

Le reticulum endoplasmique est le site majeur pour la synthèse et l'assemblage des VLDL. L'homéostasie du RE est maintenue par un phénomène adaptatif appelé unfolded protein response (UPR) *via* différents acteurs : inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), protein kinase R (PKR)-like ER kinase (PERK), et l'activating transcription factor 6 (ATF6 $\alpha$ )[141]. Il existe de nombreuses preuves que l'UPR joue un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique hépatique [305]. Des perturbations de l'homéostasie du reticulum endoplasmique peuvent stimuler la lipogénèse, inhiber la sécrétion hépatique des VLDL et entraîner une stéatose hépatique [306, 307]. La sécrétion hépatique des VLDL-triglycérides et de l'ApoB est inhibée en cas de stress dans le RE, ce qui contribue à la stéatose hépatique chez les souris obèses (avec nourriture riche en graisses) [307]

IRE1 $\alpha$  joue un rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie du RE en initiant l'épissage de l'ARNm de *XBP1* pour enlever un intron de 26pb, créer un décalage du cadre de lecture et produire un facteur de transcription (XBP1s) qui régule l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du RE [308]. XBP1 joue un rôle clé dans la lipogénèse hépatique [309]; la délétion de *Xbp1* dans le foie de souris induit une lipogénèse hépatique et conduit à une hypolipidémie par diminution de sécrétion des TG-VLDL [309]. Les souris avec délétion hépatique de *Ire1 $\alpha$* , présentent dans les conditions basales une stéatose hépatique modeste ; par contre, elles développent une stéatose hépatique majeure après induction pharmacologique du stress dans le RE [310]. L'étude de Wang [141] a récemment montré que la délétion de *Ire1 $\alpha$*  spécifiquement dans le foie (la délétion d'*Ire1 $\alpha$*  est létale) n'affecte pas la lipogénèse hépatique mais empêche l'assemblage des VLDL dans le RE,

entraînant une diminution de l'export hépatique des VLDL riches en triglycérides et une augmentation des triglycérides hépatiques. La diminution d'assemblage des VLDL riches en triglycérides est liée à une diminution des triglycérides dans la lumière du RE par diminution de l'activité MTTP due à une diminution de l'expression de la P4HB (PDI) ; la synthèse et la sécrétion d'ApoB sont normales. Ces souris présentent une hypotriglycémie à jeûn et une hypocholestérolémie à jeûn et non à jeûn ; ces changements sont liés à une diminution des VLDL-triglycérides et du HDL cholestérol. La surexpression de *P4HB* (activité de chaperone) permet de restaurer partiellement la sécrétion des VLDL riches en triglycérides alors que la surexpression de *XBP1s* permet de la restaurer totalement, ce qui suggère que d'autres facteurs dépendants de XBP1s sont nécessaires à cette sécrétion. Cette étude [141] révèle également le rôle de la régulation transcriptionnelle de P4HB dans la sécrétion des VLDL riches en triglycérides.

L'activation de l'axe XBP1/PDI/MTTP pourrait être un mécanisme impliqué dans la survenue de l'hypertriglycémie et de la NAFLD chez les rats avec obésité induite par le monosodium L-glutamate [311].

#### **1.3.2.3. Régulation par la quantité de lipides disponibles**

La synthèse et la sécrétion de VLDL est influencée par la disponibilité des substrats qui est elle-même régulée par les enzymes lipogéniques fatty acid synthase (FAS) et acetyl coA carboxylase ACC dont l'activité est contrôlée par SREBP-1c [120, 312].

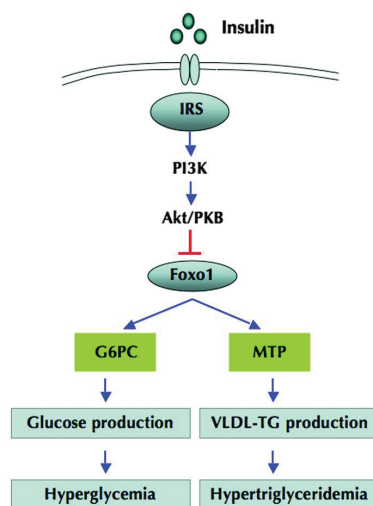
Dans les études avec des modèles cellulaires, la sécrétion des VLDL est influencée par la quantité de lipides disponibles dans le milieu [53]. Dans les études avec cellules primitives hépatiques de rat, plus la quantité d'acide oléique dans le milieu est importante, plus les VLDL exportées du RE contiennent des TAG et plus la quantité d'ApoB augmente [66, 158].

La quantité de stérols dans le milieu régule l'expression de la MTTP et la quantité de protéine présente dans les cellules HepG2 [118].

#### **1.3.2.4. Régulation par l'insuline**

L'insuline joue un rôle central dans la coordination du métabolisme des lipides et plus particulièrement des triglycérides en diminuant la sécrétion de l'apoB et en favorisant la clairance des lipoprotéines [313]. En période post-prandiale, l'insuline favorise la capture des acides gras par les adipocytes et inhibe leur relargage. En période de jeûne, la concentration en insuline baisse et les acides gras sont relargués des adipocytes et délivrés au foie. Le foie réestérifie les acides gras et les sécrète sous forme de VLDL.

L'insuline influence la sécrétion d'ApoB *via* l'activité PI3 kinase et MAP kinase [51, 314, 315]. L'insuline dévie une population de lipoprotéines contenant l'ApoB après le RE vers l'autophagosome dans les hépatocytes [316]. L'activité PI3-kinase et l'autophagy sont nécessaires pour que l'insuline stimule la dégradation de l'apoB [317].



**Figure 15 : La régulation de la production hépatique des VLDL1 par l'insuline chez la souris dépend de FoxO1 [119]**

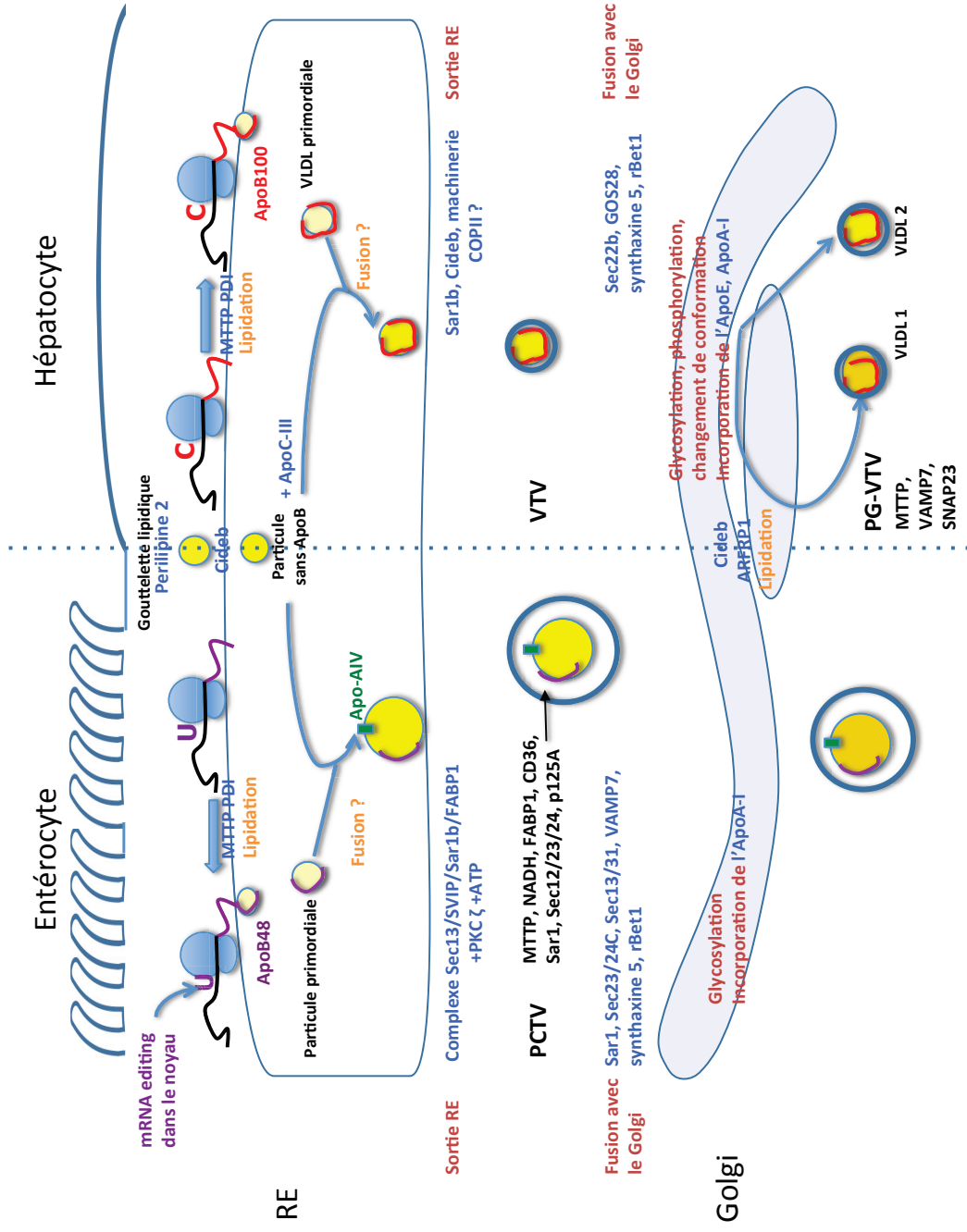
La MTTP est également régulée négativement par l'insuline [118]. L'inhibition de la MTTP et de la sécrétion de VLDL ApoB par l'insuline implique également l'activation de MAPK [318]. En présence d'insuline, FoxO1, Foxa2/Pgc-1 et FoxO6 sont phosphorylées, exclues du noyau et elles ne peuvent plus lier le promoteur de la MTTP ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de VLDL contenant de l'ApoB [119, 120, 319].

#### I.4. Comparaison de la synthèse et de la sécrétion des chylomicrons et des VLDL

La synthèse et la sécrétion des chylomicrons et des VLDL peuvent être résumées grâce au tableau et à la figure suivants :

	Entérocytes	Hépatocytes
<b>mRNA editing</b>	>90% ACF, APOBEC1 [259, 262]	<2% [25, 259, 262]
<b>RE</b>	MTP, Bip, Hsp110 [276, 320]	MTP, Bip, Erp72, Hsp90 [321]
<b>Sortie RE</b>	PCTV : Sar1b, PKC $\zeta$ , ATP, VAMP7, vSNARE, CD36, Sec23, Sec24C [156, 221, 222, 280, 281]	VTV : Sar1b, Cideb, Sec24 ; absence de VAMP7 [158, 162, 211]
<b>Fusion avec le Golgi</b>	Sar1, Sec23/24, Sec13/31, VAMP7, synthaxine 5, Vit1a, rBet1 [156, 221, 222, 283, 284, 322]	Sec22b, GOS28, synthaxine 5, rBet1 [281]
<b>Post-Golgi</b>	?	MTTP, VAMP7, SNAP23 [302]
<b>Golgi</b>	ARFRP1, ArL1, Golgin, Rab [215]	ARFRP1 [203, 213]
<b>Lipidation</b>	MTP, Cideb, ARFRP1, FABP1, FABP2, ApoA-IV [212, 213, 215, 221, 222]	MTP, Cideb, ARFRP1, FABP1, ApoA-IV, ApoC-III [201, 203, 207, 211, 237, 246]

Tableau 2 : Principales protéines impliquées dans la synthèse et la sécrétion des chylomicrons et des VLDL



**Figure 16 : Synthèse et sécrétion des chylomicrons et des VLDL**

Les voies de dégradation (ERAD, PERPP, autophagie) ne sont pas représentées sur cette figure. La localisation subcellulaire de la lipídation n'est pas complètement connue et n'a pas pu être représentée (cf. Tableau 2)

## II. Catabolisme des lipoprotéines riches en ApoB

### II.1. Protéines indispensables au catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides

#### II.1.1. La lipoprotéine lipase (LPL)

La LPL est un membre de la « superfamille des lipases » qui inclut la lipase hépatique (HL), la lipase pancréatique (PL), la lipase endothéliale (EL) et les *Drosophila* yolk protéines 1, 2 et 3 (YP1, YP2 et YP3 respectivement) [323].

Le gène *LPL* est localisé sur le chromosome humain 8p22. Ce gène est composé de 10 exons, correspondant à environ 30kb. La lipoprotéine lipase (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.34) est composée de 475 acides aminés: les 27 premiers acides aminés correspondent au peptide signal [324]. Cette protéine de 55 kDa est synthétisée dans de nombreux tissus principalement par les adipocytes et les myocytes et plus accessoirement par la glande mammaire, les macrophages, les ovaires, les glandes surrénales, certaines cellules neurologiques, l'aorte thoracique, la rate, l'intestin, et les testicules [325, 326]. Les poumons ne synthétisent pas la LPL mais sont capables de la capter de la circulation [327].

La structure tridimensionnelle de la LPL a été déduite de celle de la lipase pancréatique [328]. La LPL est organisée en deux régions structurellement distinctes : un domaine amino-terminal (résidus 28-339<sup>2</sup>) et un plus petit domaine carboxy-terminal (résidus 340-475<sup>2</sup>), connectés par un peptide flexible [329]. Le domaine C-terminal est nécessaire pour la liaison au substrat alors que le domaine N-terminal détermine les propriétés catalytiques de la LPL [326, 330]. La forme active de la LPL correspond à un homodimère lié de façon non-covalente et requiert l'ApoC-II comme activateur/cofacteur [331]. L'homodimère a une orientation tête-bêche et l'activité LPL est déterminée par l'interaction d'un site catalytique sur une sous-unité et une reconnaissance du substrat sur l'autre sous-unité [331, 332]. La dissociation des dimères conduit à une inactivation irréversible de l'enzyme [333]. Cette inactivation est prévenue par la présence d'héparane sulfate et d'héparine [334].

Plusieurs fonctions et domaines ont été identifiés dans les études de relation structure fonction (revues : Wang *et al*, Mead *et al* [326, 335]).

---

<sup>2</sup> Les acides aminés sont nommés selon la nomenclature officielle avec le premier acide aminé commençant à la méthionine 1. Dans les articles, les acides aminés sont nommés sur la protéine mature (ne tenant pas compte du peptide signal de 27 acides aminés)

La LPL hydrolyse les triglycérides présents dans les chylomicrons et les VLDL circulants. Cette réaction produit des acides gras libres et du 2-monoacylglycérol [326]. Le substrat préférentiel est l'une des liaisons ester primaires des triglycérides. En l'absence d'accepteurs d'acides gras libres comme l'albumine, les acides gras libres et les monoacylglycérols s'accumulent au niveau du site d'hydrolyse et inhibent la réaction [336]. La triade catalytique de la LPL humaine contient le site actif à Ser159-Asp183-His268<sup>2</sup>, un trou oxyanion (Trp82<sup>2</sup>, Leu 160<sup>2</sup>), et une structure boucle (résidus 81 à 91<sup>2</sup>) /couvercle (résidus 243 à 266<sup>2</sup>) [328, 337, 338]. L'activité catalytique est liée à un changement de conformation de la structure boucle couvercle [328]. La liaison de la lipoprotéine au substrat entraîne une modification conformationnelle menant l'ouverture du couvercle [338].

La liaison au substrat lipidique fait intervenir le domaine C-terminal de la LPL [338-340]. Des sites de liaison au substrat ont été identifiés plus précisément : un cluster composé de tryptophanes (Trp417-Trp420-Trp421<sup>2</sup>) et une région 442-438<sup>2</sup> et 442-VIFCSREK<sup>2</sup>) [339, 340]. Le domaine important pour délivrer les substrats triglycérides au domaine catalytique est également responsable de la liaison des TRL à la surface de la cellule [341]. L'hypothèse la plus acceptée jusqu'à maintenant est que la LPL interagit avec les apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines et notamment l'extrémité N-terminale de l'apolipoprotéine B, même après délipidation des LDL [35, 342, 343]. L'héparine et les glycosaminoaglycanes inhibent cette liaison LPL-ApoB ce qui modulerait *in vivo* le métabolisme de la LPL [343]. Cependant une autre étude montre que la délipidation des LDL empêche la liaison LPL-LDL ; l'interaction LPL-LDL se ferait donc non pas *via* l'ApoB mais *via* les lipides des LDL et notamment la phosphatidylcholine [344].

Quatre sites principaux de liaison (chargés fortement positivement) aux héparanes sulfates (chargés négativement) sont décrits: ce sont deux sites principaux Arg290-Arg306-Lys307-Arg309<sup>2</sup> et Arg321-Lys323-Arg324-Lys327<sup>2</sup>, ainsi que deux sites secondaires Lys174-Lys175-Arg178<sup>2</sup> et Lys346-Lys430-Arg432-Lys434-Lys440-Lys441<sup>2</sup> [328, 332]. Cette interaction peut entrer en compétition avec l'héparine. L'implication de ces groupements dans la liaison à l'héparine a été confirmée par mutagenèse dirigée [345]. Le site de liaison à l'héparine est situé de manière opposée au site actif suggérant que l'héparine ne joue pas de rôle direct dans l'activité catalytique de la LPL [332]. La forme dimérique est 6000 fois plus affine pour l'héparine et les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycan) que la forme monomérique, expliquant la plus grande abondance de la forme dimérique à la surface de l'endothélium vasculaire.

La LPL requiert la présence d'ApoC-II pour une activité maximale *in vitro* et *in vivo* (voir II.1.4. et II.2. ). Les données de la littérature sont contradictoires sur la localisation des sites



de liaisons de la LPL pour l'ApoC-II : des sites ont été identifiés sur la partie N-terminale et le domaine C-terminal [330, 332, 346, 347].

Le domaine de liaison à GPIHBP1 (cf. II.1.2. ) implique le domaine de liaison des héparanes sulfates (K430, R432, K434, K440, K441<sup>2</sup>) mais également la partie C-terminale de la LPL (résidus 443 à 462)<sup>2</sup> [348-350]. La partie C-terminale de la LPL interagit avec le domaine Ly6 de GPIHBP1 [351].

Enfin, la LPL jouerait d'autres rôles que la lipolyse des triglycérides des VLDL et des chylomicrons. La LPL qui facilite la capture des lipoprotéines est capable d'assurer une fonction non-catalytique de pontage moléculaire ; ainsi elle permet de lier de façon simultanée, à la fois des lipoprotéines et des surfaces cellulaires spécifiques telles que les HSPG, le LRP, le LDL récepteur, le récepteurs aux VLDL, le récepteur de l'apoE de type 2 et gp330 [352, 353]. La liaison de la LPL à ces récepteurs est indépendante du site catalytique et du site de liaison aux HSPG et requiert les acides aminés 407-411<sup>2</sup> et 431-468<sup>2</sup> [326]. Ces interactions peuvent conduire à une accumulation et à une capture cellulaire des lipoprotéines et/ou des vitamines A et E liposolubles sans internalisation des lipoprotéines [326, 352, 354, 355]. Cette fonction de pontage a également été décrite pour des cellules : la LPL serait capable de former des ponts en se liant aux HSPG exprimés à la fois sur les monocytes et les cellules endothéliales [356]. Elle joue également un rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation macrophagique et a des effets pro ou anti-inflammatoires dépendants de l'agent stimulant [355, 357-359].

Il existe plusieurs niveaux de régulation d'expression et d'activité de la LPL : une régulation transcriptionnelle, une régulation post transcriptionnelle et des protéines activatrices et inhibitrices.

Il existe dans le promoteur du gène de la LPL plusieurs motifs (revus dans [329, 355, 360, 361]) dont : octamer (*Oct-1* site) proximal ATTtriglycéridesCAT en -46 localisé entre les CAAT et TATA box, -91 à -83 (5'CCTCCCC-3') qui interagit avec Sp1, Sp3 et SREBP, des cis-element LP- $\alpha$  (-702 à -666) et LP- $\beta$  (-468 à -430) et un silencer entre -54 et -63 kDa. Il existe également des éléments diminuant l'activité promotrice, identifiés en -225 et -81 et entre -263 et -241 [329].

Il existe également une séquence de régulation positive par l'insuline (Insuline Response Element) dans l'exon 10 (région 3'UTR) : les hétérozygotes pour une mutation dans cette séquence ont une LPL masse plus basse (non significatif) [362].

Il existe de nombreux contrôles post transcriptionnels (modification de la stabilité de l'ARNm, de la glycosylation, de la liaison aux HSPG, de la dégradation) par : l'alimentation

ou l'état de jeûne, insuline, différentes cytokines, hormones thyroïdiennes revus dans [326, 360], miRNA.

Différentes protéines régulent l'activité LPL (revues [359]): ApoC-II, ApoC-III, ApoA-V, angiopoetin-like protein 3 (ANGPTL3), ANGPTL4, clivage par différentes convertases (PCSK3 ou furine, PCSK5, PCSK6 ou PACE4) [363-368].

Chez l'Homme, plus de 220 mutations différentes du gène *LPL* affectant plus de 500 patients ont déjà été décrites [369]. Une délétion hétérozygote de la LPL n'entraîne le plus souvent pas d'anomalie du bilan lipidique, cependant une hypertriglycémie mineure à modérée est parfois constatée et peut s'aggraver en hypertriglycémie sévère, en particulier chez les diabétiques, en cas d'éthylisme ou au cours de la grossesse [370]. Des mutations homozygotes ont été décrites, affectant la quantité ou la stabilité des transcrits, prévenant la sécrétion ou la stabilité de l'homodimère, la liaison à GPIHBP1 ou augmentant la sensibilité à sa dégradation [370]. Le déficit familial en LPL (revue [371]) est une maladie rare entraînant une hyperchylomicronémie sévère et une hyperlipoprotéïnémie de type I. Une classification a été proposée : classe I défaut causant une perte totale de LPL, classe II production d'une enzyme catalytiquement inactive et classe III production d'une enzyme inactive ne liant pas les HSPG. La fréquence des homozygotes est estimée entre 1/500 000 et 1/1million. Les symptômes apparaissent habituellement dès la période néonatale (allaitement) ou tôt dans l'enfance : il s'agit de douleurs abdominales et de pancréatites. Cependant, certains patients présentent peu de symptômes jusqu'à l'âge adulte. Le risque principal est donc la pancréatite aiguë. Les autres symptômes sont : des xanthômes éruptifs (triglycérides >20g/L soit 22,6 mmol/L), une lipémie rétinienne sans altération de la vision (triglycérides >40g/L soit 45,2 mmol/L), une hépatosplénomégalie ou une hépatomégalie. Certains patients avec hyperchylomicronémie ont développé de l'athérosclérose [372]. Le diagnostic est habituellement réalisé par détermination de l'activité LPL post-héparinique mais les méthodes habituelles sont délicates ; il existe également des méthodes de dosage de LPL masse (ELISA). La recherche de mutations est également largement employée.

### **II.1.2. GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1)**

Gpihbp1 est une protéine de 228 acides aminés, codée à partir du gène situé sur le chromosome 8q24.3. Cette protéine s'exprime dans le cœur, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Elle est composée d'un peptide signal, d'un domaine acide d'un motif Ly6 riche en cystéine (lymphocyte antigen) (Cys65 à Cys136), d'une partie C-terminale hydrophobe, et

de l'ancre GPI (GPI anchor) qui peut être clivée de la membrane plasmique [349, 351]. Cette protéine est glycosylée et cette glycosylation est importante pour le trafic de GPIHBP1 à la surface cellulaire [373]. Cette protéine est exprimée exclusivement par les cellules endothéliales capillaires, sur la face luminale des capillaires du tissu adipeux brun, du cœur, des muscles squelettiques [374, 375].

Plusieurs revues ont resitué le rôle de cette protéine de découverte récente: Young *et al*, Adeyo *et al* [349, 351]. Cette protéine a été découverte en 2003 par Ioka *et al* du fait de ses propriétés de liaison aux HDL [376]. Les souris ko adultes présentent des hypertriglycémies majeures par accumulation de chylomicrons et de VLDL, une diminution de l'activité LPL post héparinique à T15 min, malgré une quantité de LPL tissulaire normale mais mal localisée [374, 375, 377, 378]. Elles présentent également une diminution des acides gras essentiels (AGE) et une augmentation de l'expression des gènes de la biosynthèse des lipides dans le tissu adipeux et l'effet inverse dans le foie [378]. Les souris *Gpihbp1*<sup>+/-</sup> présentent des concentrations de triglycérides similaires aux souris wt, le phénotype d'HTG apparaît à partir de 4 ou 5 semaines de vie [374, 377]. La protéine GPIHBP1 lie spécifiquement et avidement la LPL dans les capillaires et les chylomicrons grâce au domaine acide [374, 379]; le domaine Ly6 semble également important pour la liaison de la LPL [380-382]. Cette liaison stabilise la LPL et la protège contre la désactivation par ANGPTL3 et ANGPTL4 [383]. GPIHBP1 lie également le motif de liaison de l'héparine de l'ApoA-V *via* son domaine acide [374, 379, 384]. Elle lie la LPL dans les cellules endothéliales et la transporte dans la lumière capillaire où elle sert de plateforme à la lipolyse [374, 375]. En l'absence de GPIHBP1, la LPL est piégée dans l'interstitium entre les cellules parenchymateuses et n'est pas disponible pour la lipolyse des LRTG circulantes [375]. Le complexe GPIHBP1-LPL est responsable de la margination des lipoprotéines riches en triglycérides dans les capillaires [341].

Chez l'Homme, des mutations ont été recherchées par plusieurs équipes chez des patients présentant une hypertriglycémie et non porteurs de mutations sur les gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5* : chez ces patients, des mutations sur *GPIHBP1* n'ont été retrouvées que dans quelques cas. La transmission se fait selon un mode récessif, les hétérozygotes ont presque tous un profil lipidique normal [381, 385-387]. Des mutations à l'état homozygote ou hétérozygote composite ont été décrites chez des patients présentant des hyperchylomicronémies et une activité LPL post héparinique extrêmement basse (cf.discussion) [18, 369, 381, 385-393]. En revanche, l'activité et la masse de LPL dans le tissu adipeux et dans le lait maternel de patientes hétérozygotes composites sont normales

[389]. Enfin, le polymorphisme p.C14F dans le peptide signal a été plus fréquemment retrouvé chez les patients avec hyperchylomicronémie ( $p < 0.001$ ) : ce changement d'acide aminé diminue la capacité de transfert de la LPL à la surface des cellules [386, 393].

### II.1.3. Apolipoprotéine A-V (ApoA-V)

L'ApoA-V est une protéine de 366 acides aminés, codée à partir du locus *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* situé sur le chromosome 11q23-qter [365]. La protéine mature de 343 acides aminés est sécrétée après clivage du peptide signal. Elle est exprimée principalement par le foie et dans le plasma on la retrouve principalement liée aux VLDL aux HDL et aux chylomicrons [365, 394, 395]. L'ApoA-V active la LPL liée aux protéoglycannes et accélère ainsi l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et des VLDL [396-399]. Le mécanisme exact est mal connu mais il implique des interactions entre LPL, ApoA-V, protéoglycannes, et GPIHPB1 [398, 400]. Chez l'Homme, l'interrelation entre défaut d'ApoA-V et défaut de lipolyse a été mise en évidence par l'étude de la cinétique de l'ApoB chez des patients hétérozygotes [401]. Plusieurs domaines actifs ont été identifiés : liaison aux lipides entre les résidus 192 à 238 et 301 à 343, activation de la LPL entre les résidus 192 à 238 et liaison à l'héparine entre les résidus 186 à 227 [402]. L'ApoA-V est retrouvée à forte concentration dans le foie et peut lier les récepteurs de lipoprotéines (LDLR, LRP-1, SorLa)[403, 404]. Enfin son rôle dans la liaison des LRTG aux protéoglycannes a été démontré récemment [405]. Son rôle sur la sécrétion des VLDL et des chylomicrons est controversé : l'ApoA-V diminuerait la sécrétion des triglycérides-VLDL par diminution de la lipodation de l'ApoB, de façon dose dépendante alors que chez la souris surexprimant l'Apoa-V humaine, la production des VLDL et des chylomicrons n'est pas affectée [396, 398, 399, 406, 407]. Chez l'Homme 2/3 hétérozygotes pour des délétions ont une production normale d'ApoB-VLDL [401] ; la production des triglycérides n'a pas été évaluée. Enfin l'ApoA-V pourrait guider les triglycérides vers la formation de gouttelettes lipidiques diminuant ainsi la production des VLDL [408].

Les souris ko *Apoa5*<sup>(-/-)</sup> présentent des triglycérides plasmatiques 3-4 fois supérieurs aux souris WT, des VLDL plus larges, moins bon substrat pour la LPL *in vitro* et ayant une affinité plus faible pour le récepteur des LDL [365, 407]; les souris hétérozygotes *Apoa5*<sup>(+/-)</sup> présentent une augmentation intermédiaire des triglycérides [365]. Les souris surexprimant l'ApoA-V présentent une réduction de 1/3 des concentrations plasmatiques de triglycérides du fait d'une accélération de la lipolyse des triglycérides par la LPL sans modification de la production des VLDL et des chylomicrons [365, 398].

Chez l'Homme, des polymorphismes causant une augmentation des triglycérides de 20-30% ont été décrits en population générale et modulent l'hypertriglycéridémie chez les diabétiques de type 2 [365, 409, 410]. Des mutations sur ce gène ont été rapportées chez des patients présentant une hypertriglycéridémie à l'état homozygote ou hétérozygote avec une transmission parfois considérée comme récessive ou codominante avec une pénétrance variable [18, 369, 401, 402, 404, 410-418]. Cependant des facteurs génétiques (association au polymorphisme p.S19W du gène *APOA5*, à des mutations hétérozygote *LPL* ou aux isoformes E2 et E4 de l'apoE) ou des conditions environnementales (grossesse, traitement oestroprogestatif, âge, diabète, obésité) supplémentaires sont nécessaires à l'expression de l'HTG [401, 402, 411, 413, 417, 419, 420]. Une diminution importante des triglycérides est parfois observée après régime/traitement voire un retour à une triglycéridémie normale après prise en charge ou suppression d'un facteur favorisant, par exemple post partum ou arrêt de contraception [413, 415, 417]. Il est intéressant de noter qu'un patient hétérozygote composite p.[Gln97\*];[Asp332Valfs\*4] sur le gène *APOA5* avec génotype 2/3 présente une dyslipidémie mixte (cholestérol à 16,2 mmol/L pour des triglycérides à 19,9 mmol/L)[404].

#### II.1.4. ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III

L'ApoC-II est une protéine de 79 kDa codée par gène *APOC2* situé sur le chromosome 19q13.2 (cluster *APOC1-APOC2-APOC4*). Elle est synthétisée principalement par le foie mais également par l'intestin [421]. Cette protéine est active LPL humaine adipeuse *in vitro* [422]. Les souris surexprimant *APOC2* présentent une hypertriglycéridémie par accumulation de VLDL. A faible concentration l'ApoC-II active la LPL alors qu'à forte concentration, elle l'inhibe [238, 423]. Les séquences de l'extrémité C-terminale sont essentielles pour la liaison à la LPL [424]. Des mutations du gène *APOC2* ont été décrites [425]. Les hétérozygotes pour des déficits en apoC-II ont un bilan lipidique normal [370].

L'ApoC-III a été détaillé précédemment concernant la synthèse des VLDL. L'ApoC-III inhibe la LPL (partie N-terminale de la protéine) et elle inhibe également la lipase hépatique (HL) [238]. Elle intervient également dans la liaison aux glycosaminoglycanes (GAG) et la clairance des remnants par endocytose médiée par des récepteurs [426, 427].

L'ApoC-I est une protéine de 83 acides aminés codée par gène *APOC1* situé sur le chromosome 19q13.2 (locus *APOC1-APOC2-APOC4*). *In vitro*, elle inhibe la LPL et les souris surexprimant l'ApoC-I ont une hypertriglycéridémie par défaut de capture hépatique [422, 428, 429]. L'ApoC-I inhibe la dégradation protéolytique et la liaison des VLDL au récepteur cellulaire [427].

Récemment, l'étude de Larsson *et al* a montré que l'ApoC-I et l'ApoC-III inhibent l'activité LPL en la déplaçant des particules lipidiques (Intralipides et chylomicrons de rat), rendant la LPL ainsi plus vulnérable à l'action d'ANGPTL4 [430].

### **II.1.5. ApoE**

L'ApoE est une protéine de 317 acides aminés soit 34.2 kDA, codée par le gène *APOE* situé sur le chromosome 19. Au cours de la lipolyse, l'ApoE est échangée entre les VLDL et les HDL. La conformation des isoformes E3 et E4 est différente selon les lipoprotéines et est modifiée au cours de la lipolyse [431, 432].

Le rôle de l'apoE dans la lipolyse elle-même est controversé. *In vitro* l'ajout d'apoE augmente l'hydrolyse des particules riches en triglycérides [433]. L'ApoE permet la liaison des lipoprotéines aux HSPG et cette liaison permet l'internalisation des remnants riches en ApoE [434, 435]. L'exposition de l'ApoE à la surface de la lipoprotéine est fonction de la taille de la particule, de la façon dont l'ApoE arrive sur la lipoprotéine (échangée des HDL ou incluse dans l'assemblage de la lipoprotéine naissante) et de la façon dont la lipoprotéine a déjà été hydrolysée [436-438]. A l'heure actuelle, il y a peu de preuve que l'ApoE soit responsable de variations physiologiques de l'activité LPL [359].

Cette apolipoprotéine est indispensable pour la capture efficace des remnants enrichis en cholestérol [439]. Ceci correspond à son rôle le plus connu. Enfin, l'ApoE des VLDL jouerait un rôle dans la modulation de l'inflammation monocyttaire : le changement de conformation de l'ApoE observé au cours de la lipolyse la rend plus accessible au LPS, en particulier après lipolyse des VLDL produits à jeûn [432]. L'effet des isoformes de l'apoE sur l'inflammation induite par le LPS est différent : l'ApoE3 prévient cette inflammation alors que l'ApoE4 l'exagère. [432]

### **II.1.6. ANGPTL3 et ANGPTL4 (angiopoïétin-like protein 3 et 4)**

Les ANGPTL sont des protéines angiopoïétine like. Elles ont en commun leur structure : une séquence N-terminale, une séquence spécifique, un domaine superhélice (coiled coil) et un domaine large fibrinogène angiopoïétin-like domaine. Après sécrétion, ces protéines subissent un clivage sérique par des proprotéines convertases dont PCSK3, qui reconnaissent une séquence protéique RRKR. Le rôle des protéines ANGPTL3 et 4 a été revu par Lichtenstein [440].

ANGPTL4 est une protéine de 406 acides aminés, codée par le gène *ANGPTL4* situé sur le chromosome 19p13.3. Elle est produite par les hépatocytes, les adipocytes, les

myocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales intestinales, et les macrophages. Avant sécrétion, elle subit une oligomérisation par des liaisons disulfides et, après sécrétion, elle est clivée au niveau du site  $_{161}RRKR_{164}$  en une portion N-terminale nANGPTL4 et une partie C-terminale (cANPTL4) [440]. Une fois sécrétée, ANGPTL4 interagit avec les HSPG et cette interaction est interrompue après administration d'héparine [441, 442]. ANGPTL4 est un inhibiteur de la LPL. Deux mécanismes ont été proposés : une conversion de la LPL active (dimère) en LPL inactive (monomères) par la partie N-terminale d'ANGPTL4, et une inhibition non compétitive de la LPL [367, 443]. Cette inactivation est plus lente en présence de lipoprotéines ou de GPIHBP1 [383, 444]. ANGPTL4 inhibe également la lipase intestinale [445]. Chez l'Homme, les porteurs de la variation p.E40K sur le gène *ANGPTL4* présentent une augmentation du HDL-C et une diminution des triglycérides mais une augmentation du risque cardiovasculaire [446-448].

ANGPTL3 est une protéine de 460 acides aminés, codée par le gène *ANGPTL3* situé sur le chromosome 1p31.1-p22.3). Elle subit avant sécrétion une oligomérisation par des liaisons disulfides et, après sécrétion, est clivée au niveau du site  $_{221}RAPR_{224}$  [440]. La protéine ANGPTL8 pourrait activer la protéine ANGPTL3 [449]. Cette protéine est exprimée presque exclusivement dans le foie [440]. Clivée ou non, elle rend la LPL plus sensible à l'inactivation protéolytique par des proprotéines convertases et en favorisant le clivage de la LPL de la surface cellulaire, inhibe les fonctions catalytiques et non catalytiques de la LPL [368]. Chez l'Homme, des mutations ont été retrouvées et associées à l'hypolipémie combinée familiale (FHBL2, OMIM#605019) par étude de l'exome [450]. Les patients homozygotes présentent une activité 3 fois plus élevée et une masse LPL plus élevée que celle observée chez des témoins [449, 451]. L'étude des patients a révélé que la protéine ANGPTL3 agissait sur les lipoprotéines contenant l'ApoB et l'ApoA1, sur les acides gras et le métabolisme du tissu adipeux [449].

Les souris ko *Angptl3*<sup>-/-</sup> et *Angptl4*<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de l'activité LPL post-héparinique et une diminution des triglycérides plasmatiques alors que la surexpression d'Angptl4 entraîne une augmentation des triglycérides [452]. Les souris *Angptl4*<sup>-/-</sup> présentent également une augmentation du poids corporel et une augmentation de l'accumulation de triglycérides dans l'intestin [445]. L'inhibition d'*Angptl4* chez les souris *Gpihbp1*<sup>-/-</sup> diminue nettement les triglycérides alors que l'inhibition d'*Angptl3* chez les souris *Gpihbp1*<sup>-/-</sup> diminue plus modérément les triglycérides [383].



### II.1.7. CREB-H

La protéine CREB-H (Cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H), codée par le gène *CREB3L3*, est un facteur de transcription qui lie les éléments CRE (triglycéridesACGTCA) et box-B-like de régions promotrices [453]. Cette protéine est hautement et sélectivement synthétisée par le foie et l'intestin grêle; HNF4 $\alpha$  (nuclear hormone receptor) est indispensable à l'expression de CREB-H dans le foie et mais pas dans l'intestin [454]. Son expression est induite dans des conditions de jeûne et supprimée par la réalimentation [455]. Son activation nécessite un clivage séquentiel de la protéine précurseur par des protéases du Golgi libérant la partie N-terminale mûre, qui se localise dans le noyau (appelée CREB-H(N)), et joue un rôle de transactivateur transcriptionnel [456]. Cette protéine est un composant important dans de la réponse inflammatoire systémique au cours du stress dans le RE des cellules hépatiques [454]. Plus récemment, elle a été impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique. L'étude des souris *Creb3l3*<sup>-/-</sup> a montré que ces souris présentaient une concentration en triglycérides et ApoB plasmatiques significativement plus hautes que les souris wild-type [455]. Chez ces souris, l'accumulation de VLDL plus riches en triglycérides est la conséquence d'une diminution de la clairance des triglycérides du plasma (et non d'une surproduction hépatique), par diminution de l'expression de coactivateurs de la LPL (*ApoC2*, *ApoA4* et *ApoA5*) et une augmentation de l'apoC3 [455]. CrebH contrôle l'expression du gène *APOA4* [457]. Chez l'Homme, des mutations à l'état hétérozygote ont été retrouvées sur ce gène des individus présentant une hypertriglycéridémie (> 3,37 mmol/L) (cohorte décrite par Johansen *et al* [458]); aucune mutation n'a été retrouvée dans une population normotriglycéridémique témoin. Toutes les mutations sont localisées dans la région N-terminale active [455].

Des études supplémentaires sont nécessaires pour connaître les mécanismes cellulaires exacts par lesquels CREB-H est activé et régule l'homéostasie des triglycérides en concert avec les autres protéines régulatrices de la transcription.

### II.2. La lipolyse

Le terme de lipolyse désigne l'hydrolyse des triglycérides en acides gras sous l'action de lipases. Nous ne nous intéresserons ici qu'à la lipolyse intravasculaire qui dégrade les triglycérides associés aux lipoprotéines en acides gras.

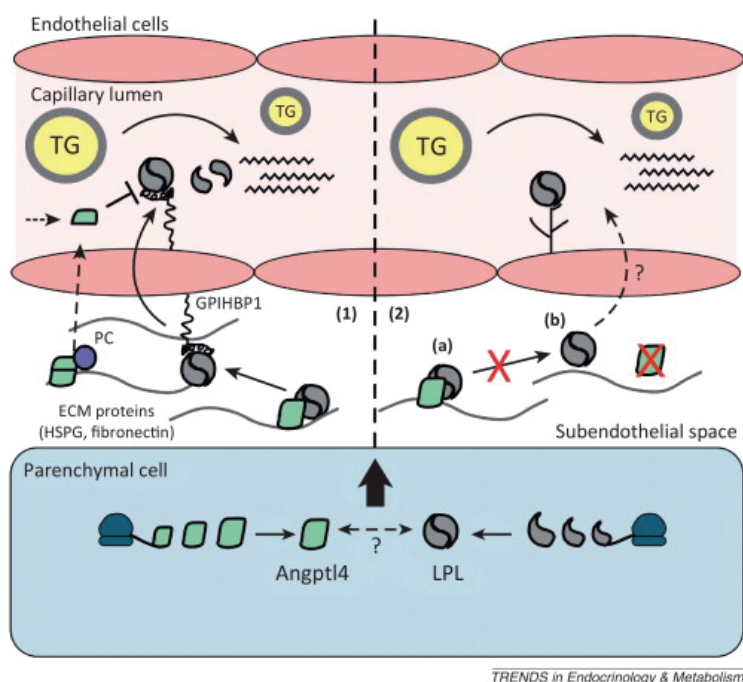
Les chylomicrons transportent les triglycérides vers le tissu adipeux pour stockage et vers les organes vitaux (cœur, muscles squelettiques) pour leur rôle énergétique. Les triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL sont lipolysés sous l'action de la



lipoprotéine lipase dans la lumière capillaire principalement du cœur, du muscle squelettique, et du tissu adipeux [360, 459, 460].

### II.2.1. Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière capillaire

La LPL est synthétisée dans les cellules parenchymateuses mais son site d'action est la lumière capillaire. La sécrétion de la LPL est dépendante du facteur de maturation de la lipase (LMF1), protéine transmembranaire localisée dans le RE impliquée dans la maturation de la LPL et de l'HL [461]. Dans le RE, la LPL peut subir une dégradation par le protéasome en cas de mauvais repliement (selon un principe qui semble équivalent à la dégradation de l'ApoB). En l'absence de LMF1, la LPL ne peut pas former de dimère et subit une dégradation intracellulaire [462]. La LPL est transportée par la protéine GPIHBP1, une protéine GPI-ancrée des cellules endothéliales des capillaires : GPIHBP1 associée à la LPL serait capable de circuler de manière bidirectionnelle à travers les cellules endothéliales [375, 463]. La protéine ANGPTL4 peut inhiber la LPL ; Dijk et Kersten ont proposé récemment que GPIHBP1 et ANGPTL4 entrent en compétition pour la liaison de la LPL avec ANGPTL4, «capturant» la LPL dans l'espace subendothélial via ses liaisons avec la matrice extracellulaire et GPIHBP1 emmenant la LPL à travers l'endothelium [464].



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 17 : Hypothèse du mécanisme d'inhibition de la LPL par ANGPTL4 [464]

Après la sécrétion de la LPL et d'ANGPTL4 dans l'espace subendothélial, le transport de la LPL dans la lumière capillaire pourrait être assuré par deux mécanismes. Le mécanisme principal implique GPIHBP1 capturant la LPL dans l'espace subendothélial et le transportant dans la lumière capillaire. ANGPTL4 est lié à la matrice extracellulaire, retient et inhibe la LPL. En présence de GPIHBP1, une expression élevée d'ANGPTL4 est nécessaire pour dépasser la compétition avec GPIHBP1. ANGPTL4 est sécrétée dans la lumière capillaire sous forme clivée, inhibe l'activité LPL dans l'endothelium en favorisant la conversion en monomères inactifs. Le second mécanisme implique un transporteur non identifié et peut être interrompu en présence d'ANGPTL4. En l'absence de GPIHBP1, ANGPTL4 retient la LPL dans l'espace subendothélial (a). La perte d'ANGPTL4 libère la LPL ce qui permet son transport à la surface endothéliale via un transporteur non identifié (b).

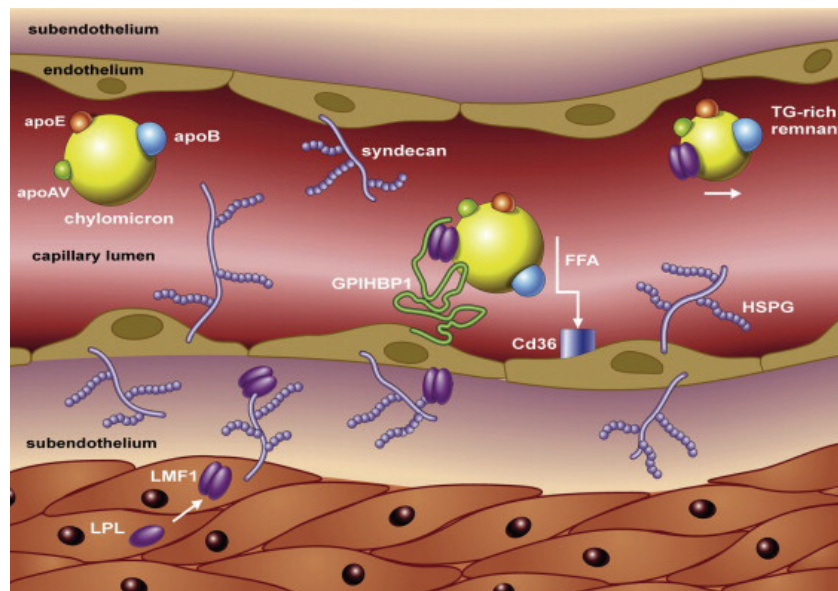
La sécrétion de la LPL est influencée par la liaison aux HSPG : diminution de la dégradation intracellulaire de la LPL, et diminution de l'internalisation et dégradation [465-467]. Les HSPG sont localisés dans des rafts à la surface des cellules endothéliales dans les petits capillaires des tissus sécrétant la LPL, et sont les stations d'ancrages (« docking-stations ») de la LPL [380]. Au niveau de ces sites, les HSPG fournissent une plateforme pour l'interaction avec les LRTG en facilitant leur liaison par la présence de charges négatives [354, 468-470]. Les syndécan HSPG se déplacent latéralement vers les rafts, les molécules GPI ancrées se déplacent également vers ces rafts [471, 472].

### **II.2.2. Margination des LRTG**

Pour que la lipolyse ait lieu, l'ApoC-II à la surface des LRTG est nécessaire [363]. De plus, les lipoprotéines doivent « s'arrêter » sur la face luminale des capillaires : ce phénomène s'appelle la margination. Goulbourne *et al* [341] ont montré que 1/ la margination des TRL dans les capillaires dépendait du complexe LPL-GPIHBP1 2/ implique le domaine de liaison des lipides de la LPL 3/ peut être bloquée par l'héparine 4/ la liaison de la LPL aux HSPG est inefficace pour promouvoir la margination des TRL [341]. Il existe au niveau des « nanovilli » qui s'étendent depuis la surface des cellules endothéliales dans la lumière capillaire des bicouches lipidiques particulières, « lipid bilayer planes », contenant la LPL et GPIHBP1 qui pourraient jouer un rôle dans la capture des LRTG [341]. En période post prandiale, les chylomicrons entrent en compétition avec les VLDL pour le métabolisme des triglycérides par la LPL, et constituent un substrat préférentiel pour la LPL [292, 473]. Les IDL et les LDL sont également des inhibiteurs non compétitifs de la lipolyse [474].

### **II.2.3. Hydrolyse des LRTG**

Une fois que les LRTG sont liés, la LPL hydrolyse les triglycérides, entraînant le relargage des acides gras libres et la transformation des LRTG en remnants.



**Figure 18 : Hydrolyse périphérique des triglycérides [380]**

La LPL peut lier les VLDL, les chylomicrons et les LDL de sujets non hypercholestérolémiques mais elle a une affinité 50 fois plus importante pour les chylomicrons que pour les VLDL [475].

La lipolyse des VLDL post-prandiaux génère deux fois plus d'AG non estérifiés que la lipolyse des VLDL produits à jeûn [431]. Les AG libérés sont ensuite recaptés par des récepteurs, comme CD36, localisés à la surface de la membrane plasmique des adipocytes et des myocytes. Ils sont ré-estérifiés et stockés ou procurent une source d'énergie pour l'oxydation mitochondriale [360, 380]. Les remnants ont alors deux devenir possibles : certains IDL et les remnants de chylomicrons sont captés par le foie alors qu'une partie des VLDL est ensuite convertie en IDL puis en LDL [476]. Au cours de la lipolyse, l'ApoE et l'ApoC-III se détachent des VLDL et sont captées par les HDL et des échanges d'apoprotéines ont lieu entre les HDL et les VLDL [248]. Les VLDL et les chylomicrons s'enrichissent en ApoE au cours de la lipolyse et cet enrichissement pourrait empêcher l'action catalytique de la LPL et orienter les remnants vers une recapture hépatique [248, 434, 477, 478]. La LPL elle-même pourrait se dissocier de l'endothélium au cours de la lipolyse, et circuler possiblement attachée aux remnants [479]. La LPL a été détectée dans le plasma, principalement associée aux VLDL ; les lipoprotéines riches en ApoB porteuses de la LPL, en particulier les chylomicrons, diminuent significativement plus rapidement après une charge en graisses que celles ne portant pas la LPL ; la LPL faciliterait donc la capture des lipoprotéines qui la contiennent [320, 480, 481].

### **II.2.1. Devenir des LRTG hydrolysés**

Après chaque étape de lipolyse, la LPL doit interagir de nouveau avec une lipoprotéine qui aura échappé à la clairance hépatique. Une augmentation des interactions avec les récepteurs hépatiques conduit à un moindre pourcentage de VLDL persistant dans la circulation. Seules certaines classes de VLDL sont destinées à être transformées en LDL [482]. Cela dépend de la taille et de la composition des VLDL. Les VLDL de petite taille (contrairement aux VLDL de grande taille) peuvent également être le substrat de la lipase hépatique. [483]. La majorité (90%) des VLDL sécrétées contient de l'ApoC-III et 40% de ces VLDL avec ApoC-III contiennent également de l'ApoE [248]. Moins de 10% des VLDL sécrétées contiennent ni ApoC-III, ni ApoE [248]. Les lipoprotéines riches en triglycérides sans ApoC-III et sans ApoE sont presque exclusivement lipolysées en IDL ; celles qui contiennent de l'ApoC-III mais pas d'ApoE sont majoritairement converties en LDL ; celles qui contiennent de l'ApoE et qui ont perdu l'ApoC-III au cours de la lipolyse sont rapidement captées de la circulation ; celles qui contiennent de l'ApoC-III et de l'ApoE sont majoritairement captées de la circulation avant d'être transformées en LDL [248]. L'ApoE joue un rôle crucial dans le métabolisme des TRL en le redirigeant vers la captation et l'ApoC-III inhibe cette voie [248].

#### ***II.2.1.1. Capture hépatique des remants***

Cette capture fait intervenir différentes protéines, les récepteurs de la famille du LDLR (LDLR, LRP1), SRB1 et une interaction directe avec les HSPG et plus particulièrement syndecan-1 [469, 484-487].

Le LDLR intervient mais n'est pas le mécanisme principal [380].

Les HSPG qui interviennent dans la capture hépatique des remnants consistent en une protéine, syndecan-1, avec 3 chaînes héparane sulfate attachées : les HSPG hépatiques sont fortement sulfatés [486]. Cette voie est importante puisque des anomalies sont retrouvées en cas de délétion ou de surexpression de gène impliqué dans leur métabolisme. En effet, lorsque l'expression du gène *NDST1* (N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1, enzyme impliquée dans la sulfatation des HSPG) est inhibée au niveau hépatique, les souris présentent une hypertriglycéridémie et une accumulation de remnants ; un polymorphisme de *SULF2* (sulfatase 2), protéine impliquée dans la dégradation des HSPG, a également associé à la clairance post-prandiale des remnants LRTG [380, 488]. De plus, une induction ou une délétion du gène *SULF2* est associée à une diminution ou une augmentation de la clairance des remnants de lipoprotéines [487]. Chez la souris, l'ApoE et l'ApoA-V sont les

lipoprotéines principales intervenant dans la capture des LRTG par les HSPG et la clairance des LRTG par cette voie est athéroprotective [405].

Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que SRB1 jouerait plutôt un rôle de plateforme mais ne permettrait pas la capture et l'internalisation [487].

Le rôle de LRP1 est moins clair : LRP1 interviendrait en particulier pour les remnants enrichis en apoE, en complexe avec les HSPG [485, 486].

La capture implique l'ApoE, la LPL et l'action de l'HL qui ensemble favorisent la clairance hépatique rapide [485, 486]. Les remnants de chylomicrons pénètrent dans l'endothélium fenestré dans le foie et interagissent avec le LDLR ou bien lient les HSPG et sont soit internalisés directement soit *via* LRP1 [470]. La voie dépendant du LDLR a une faible capacité, une grande affinité et conduit à une endocytose rapide (10-15 min) *via* des puits recouverts de clathrine, alors que la voie dépendant des syndécans présente une grande capacité, une affinité moyenne et conduit à une endocytose lente (1-2h) *via* un mécanisme dépendant de la cavéoline [486, 487].

La capture des remnants de chylomicrons est illustrée ci-dessous :

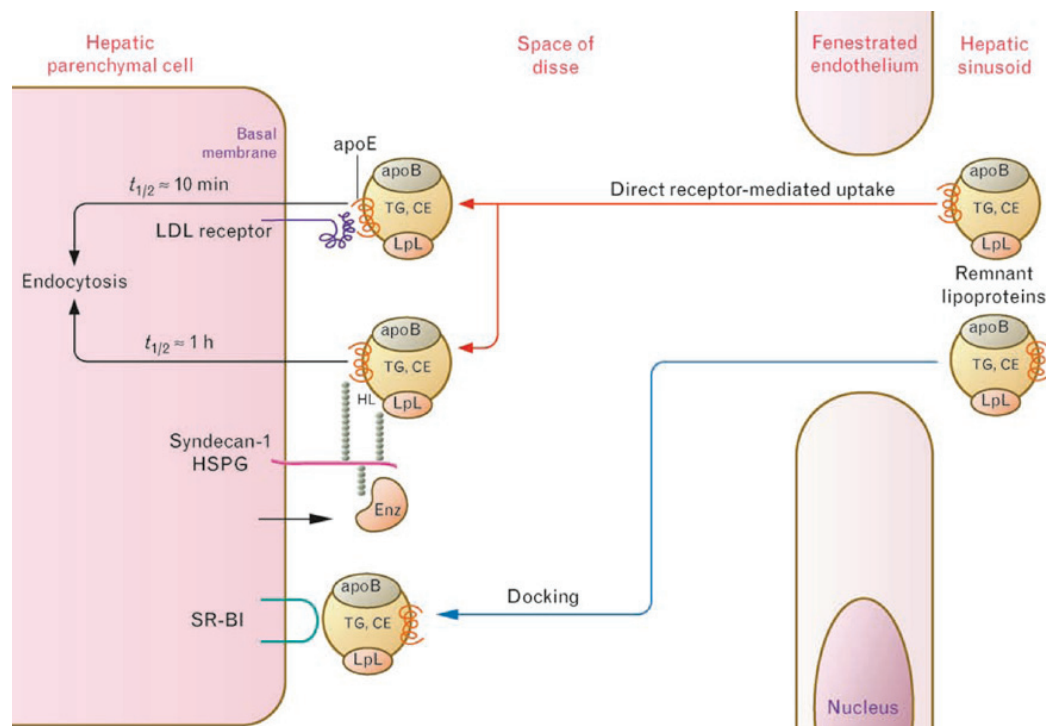


Figure 19 : Capture hépatique des remnants de chylomicrons [487]

### II.2.1.2. Conversion des IDL en LDL

La conversion des VLDL en LDL nécessite des étapes de lipolyse multiples et fait intervenir la LPL. Le rôle de l'HL dans cette conversion est controversé [290].

L'HL est une lipase dont la séquence protéique présente 40% d'homologie avec la LPL. Cette enzyme est une phospholipase et une triglycéride lipase [489]. Elle présente une faible action d'hydrolyse des triglycérides de chylomicrons, mais hydrolyse les triglycérides des remnants de chylomicrons, des IDL et des HDL [490]. Elle joue également un rôle de ligand pour favoriser la capture des lipoprotéines par les récepteurs et les protéoglycanes [490].

La HL jouerait un rôle dans la conversion VLDL-IDL-LDL, mais semble jouer un rôle mineur dans le métabolisme des remnants de chylomicrons ; son rôle est non limitant [292, 459, 483]. L'activité HL est corrélée à la diminution d'ApoB observée après infusion d'héparine [491].

Les LDL ainsi métabolisées seront ensuite captées par le LDLR.

Après ce rappel sur la synthèse et le catabolisme des LRTG, nous allons exposer les enjeux de nos travaux.

### III. Enjeux du travail

Le but de notre travail est de progresser dans la compréhension des maladies rares dues à des anomalies du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Ces patients constituent des modèles cliniques exceptionnels : ils permettent d'étudier l'impact de variants génétiques rares sur l'organisme humain, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et également d'envisager les effets indésirables à long terme des traitements ciblant des protéines impliquées dans le métabolisme des triglycérides.

Une première approche a consisté à étudier le phénotype des patients présentant un défaut génétique de sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides. Nous nous sommes intéressés aux patients atteints d'abetalipoprotéinémie (ABL), d'hypobetalipoprotéinémie (FHBL) et de maladie de rétention des chylomicrons (CMRD) causées respectivement par des mutations sur les gènes *MTTP*, *APOB* et *SARIB*. L'étude de ces patients, qui a initialement permis la découverte de ces protéines, est indispensable pour évaluer leur rôle et l'effet de leur inhibition au long cours chez l'Homme. En effet, les études *in vivo* chez l'animal sont impossibles : la délétion de ces gènes est létale chez la souris [73, 74, 110, 124]. Les études *in vivo* sont donc réalisées chez des souris avec délétions des gènes spécifiques d'organe qui ne permettent pas d'appréhender l'impact de mutations sur l'organisme entier ; en outre le métabolisme des lipoprotéines est différent chez les souris. L'étude du phénotype de ces patients est donc le seul moyen de cerner les rôles exacts des protéines déficientes (impact de ces anomalies sur le métabolisme des autres lipoprotéines, conséquences chez l'Homme), mais également d'évaluer les effets indésirables à long terme des thérapeutiques hypocholestérolémiantes ciblant ces gènes ou protéines. En effet, dernièrement, le lomitapide et le mipomersen, respectivement inhibiteur de la MTTP et de la sécrétion d'ApoB ont obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale [13, 14]; des inhibiteurs sélectifs de la MTTP intestinale sont en cours d'étude chez l'animal [492]. Il nous a donc paru essentiel d'étudier le phénotype des patients présentant ces maladies rares, en associant les malades de notre cohorte et tous les cas publiés avec mutations délétères.

La seconde approche a consisté en l'exploration phénotypique des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère. En effet, l'étude génétique seule n'est pas suffisante pour l'exploration, le diagnostic de ces patients et la compréhension de la physiopathologie : des anomalies génétiques sur les gènes *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* ne sont retrouvées que dans 50% des cas d'hyperlipoprotéinémie de type I, et interviennent en association avec les facteurs environnementaux (vieillesse, diabète, obésité, erreurs diététiques) dans



l'hyperlipoprotéïnémie de type V [18, 493]. De plus, il existe une importante régulation transcriptionnelle (revues : Mead *et al*, Enerback *et al*, Merkel *et al* [326, 360, 361]) et post-transcriptionnelle de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des triglycérides faisant intervenir non seulement les protéines régulatrices vues précédemment mais également les miRNA, et des interactions gène-diététique [494-497]. Du fait de l'existence de ces pathologies génétiques inexplicées et des modulations de l'expression du gène multifactorielles et difficiles à mettre en évidence, il nous a donc semblé indispensable de développer une mesure de l'activité LPL post héparinique, afin d'avoir la capacité de quantifier les capacités lipolytiques de la LPL [329].

Enfin, des modulations de phénotypes sont suspectées devant la variabilité observée chez les patients issus de mêmes familles. Il nous semble donc important d'explorer simultanément les principaux gènes impliqués dans les dyslipidémies. Les techniques de séquençage direct systématique sur plusieurs gènes étant longues à mettre en œuvre, nous avons développé dans le laboratoire une technique de séquençage nouvelle génération (NGS). L'exploration des patients par cette technique permettra non seulement de détecter rapidement et simultanément des mutations sur les gènes *APOB*, *RLDL*, *PCSK9*, *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *LMF1* mais également une meilleure compréhension des variabilités de phénotype en détectant des mutations et/ou polymorphismes associés, sur d'autres gènes. A ce titre nous présentons un exemple montrant la complexité de l'interprétation des résultats offerts par le NGS.

## **Deuxième partie : présentation des travaux**

## **I. Hypocholestérolémies par mutations sur les gènes *SAR1B*, *MTTP* et *APOB***

L'abetalipoprotéinémie (ABL, OMIM#200100), l'hypobetalipoprotéinémie FHBL 1 (OMIM#615558) homozygote ou hétérozygote composite (Ho-FHBL) et de la maladie de rétention des chylomicrons (CMRD, OMIM#246700) ont en commun d'être des maladies héréditaires entraînant une malabsorption sévère des graisses associée à un retard de croissance dans l'enfance. Elles se caractérisent par une absence sélective de chylomicrons après un repas riche en graisses, par une diminution du cholestérol total et par un défaut de vitamines liposolubles.

Le premier travail a consisté à mettre au point la recherche de mutations sur le gène *SAR1B* par séquençage direct et génotyper 15 patients chez lesquels le diagnostic de CMRD était suspecté (article 1). Suite à la publication de Jones *et al* [7], il nous a paru essentiel de confirmer ce diagnostic qui, jusqu'alors, était suspecté sur des critères cliniques (diarrhées, retard de croissance), biologiques (hypocholestérolémie avec triglycérides normaux, absence d'apparition des chylomicrons après charge en graisses, bilan lipidique normal des parents), et les résultats de l'endoscopie : les biopsies intestinales montrant une muqueuse intestinale blanche, surchargée de gouttelettes lipidiques entérocytaires). Notre équipe a ensuite présenté le suivi de cette cohorte ([498], cf. annexe 1) et participé à la proposition de recommandations pour le diagnostic et la prise en charge de cette maladie rare ([499], cf. annexe 2). Nous avons enfin réalisé une revue des cas diagnostiqués au laboratoire et dans la littérature et modélisé l'impact moléculaire des mutations faux sens (Sassolas et al chapitre de livre, annexe 3) : cette étude a permis de déterminer les régions de la protéine Sar1b indispensables pour la sécrétion optimale des chylomicrons.

Nous avons également réalisé le diagnostic moléculaire chez 14 patients présentant une ABL ou une Ho-FHBL. L'ABL (maladie autosomique récessive) et l'Ho-FHBL (maladie autosomique co-dominante) sont parfois difficiles à distinguer puisqu'elles partagent des symptomatologies cliniques et biologiques très proches. L'orientation diagnostique est souvent donnée par les bilans lipidiques des parents. Cependant leurs bilans ne sont pas toujours disponibles ou informatifs. La découverte de mutation permet d'identifier formellement le défaut moléculaire responsable de l'hypocholestérolémie, et d'offrir ainsi un meilleur conseil dans les familles concernant les risques de stéatose hépatique notamment. Dans nos cohortes de patients, les mutations sont recherchées par séquençage direct sur les gènes *MTTP* et

*APOB*. Les grands réarrangements sont étudiés après PCR long range. Le caractère délétère des mutations faux sens est étudié soit par modélisation bioinformatique, soit par des études fonctionnelles (mesure d'activité MTTP sur biopsies ou sur cultures de cellules COS-1 transfectées (article 2). Les mutations introniques en dehors des sites d'épissage sont étudiées à l'aide de minigène. Enfin nous avons étudié et comparés tous les cas d'ABL et de Ho-FHBL décrits avec mutation délétère (article 3) pour clarifier les différences phénotypiques de ces deux pathologies.



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

 ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism 93 (2008) 74–84

Molecular Genetics  
and Metabolism

[www.elsevier.com/locate/ymgme](http://www.elsevier.com/locate/ymgme)

## Anderson or chylomicron retention disease: Molecular impact of five mutations in the *SARIB* gene on the structure and the functionality of Sar1b protein

Mathilde Charcosset<sup>a,i</sup>, Agnès Sassolas<sup>a,e,f,g,h,i,\*</sup>, Noël Peretti<sup>b,c,e,f,g,h,i</sup>, Claude C. Roy<sup>d</sup>, Colette Deslandres<sup>d</sup>, Daniel Sinnett<sup>d</sup>, Emile Levy<sup>d</sup>, Alain Lachaux<sup>b,c,i</sup>

<sup>a</sup> UF Lipides-Dyslipidémies, Laboratoire de Biochimie, CBE, 59 boulevard Pinel, F-69677 Bron Cedex, France

<sup>b</sup> Unité d'Hépatogastroentérologie et Nutrition pédiatrique, Pavillon S, Hôpital Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, F-69437 Lyon Cedex03, France

<sup>c</sup> Université Lyon 1, faculté de médecine Grange Blanche, Lyon F-69003, France

<sup>d</sup> Departments of Nutrition, Gastroenterology, Pediatrics and Pathology, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Que., Canada

<sup>e</sup> INSERM, U870, IFR62 Lyon F-69008, France

<sup>f</sup> INRA, UMR1235, Lyon F-69008, France

<sup>g</sup> INSA-Lyon, RMND, Villeurbanne, F-69621, France

<sup>h</sup> Université Lyon 1, Lyon F-69003, Villeurbanne, France

<sup>i</sup> Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69008, France

Received 13 August 2007; accepted 13 August 2007

Available online 22 October 2007

### Abstract

Anderson disease (and/or chylomicron retention disease—CMRD) is a rare, autosomic recessive disorder characterized by chronic diarrhea, failure to thrive, and hypocholesterolemia in childhood. The specific molecular defect was identified in 2003 and consists of mutations in the *SARIB* gene which encodes for intracellular Sar1b protein. To date, only 8 mutations in six families have been described. We report here 15 new cases of CMRD among 8 families from France and Canada. We identified three unique homozygous mutations of *SARIB* gene in French families originated from Turkey, Algeria and Portugal: a stop codon in exon 6 (c.364G>T, p.Glu122X), a whole deletion of exon 2 (c. 1–4482\_58+1406 del 5946 ins15 bp) and a missense mutation in exon 7 (c.554G>T, p.Gly185Val). The 2 missense mutations found in the 5 French-Canadian families had already been described in the eight previously published mutations: c.409G>A (p.Asp137Asn) and c.537T>A (p.Ser179Arg). In an attempt to explain the functional impairment of mutated proteins, computational analysis and sequence alignment were performed. The nonsense mutation and the whole deletion of exon 2 produced truncated proteins, the missense mutations probably non-functional proteins. All the affected children presented with similar phenotype at onset; the absence of phenotype–genotype correlation was discussed. A determination of the specific mutation in Anderson disease or CMRD is required to ensure diagnosis and allow prompt therapeutic intervention in these children.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Anderson disease; Chylomicron; *SARIB*; Hypocholesterolemia; Computational analysis; Genotype–phenotype correlation

### Introduction

Anderson disease (MIM #607689) (and/or chylomicrons retention disease—CMRD (MIM #246700)) is a rare autosomic recessive disorder usually diagnosed in infants

\* Corresponding author. Address: UF Lipides-Dyslipidémies, Laboratoire de Biochimie, CBE, 59 boulevard Pinel, F-69677 Bron Cedex, France. Fax: +33 4 72 35 72 46.

E-mail address: [agnes.sassolas@chu-lyon.fr](mailto:agnes.sassolas@chu-lyon.fr) (A. Sassolas).

presenting with failure to thrive and chronic diarrhea. The ensuing low plasma lipid levels and low fat—soluble vitamin levels commonly cause subsequent neurological impairment [1–4].

The enterocytes of these patients fail to secrete chylomicrons in lymph and are consequently overloaded with small lipid droplets. The size and distribution of the droplets into the enterocytes and along the jejunal mucosa, are highly heterogenic [2,4–6]. Some have argued that the size and location of these droplets into the enterocytes could help to differentiate Anderson disease from CMRD. However, mutations of the *SARIB* gene (HGNC:10535; MIM \*607690, previous symbol SARA2), which encodes for the Sar1b protein were identified in 2003 as the specific molecular defect present in both Anderson disease and CMRD [7].

The precise function of Sar1b is still unknown. In yeast there is one Sar1 protein (Sar1p). This small GTPase interacts with intracellular proteins to mediate proteins transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus [8,9]. Briefly, the interactions of the inactive Sar1-GDP protein with the Sar1 GEF (Guanine Nucleotide Releasing Factor) Sec12 catalyse the exchange of GDP for GTP on Sar1 with conformational changes of the two switch regions. Sar1-GTP forms a coating protein complex (COPII) with two heterodimers Sec23/24 and Sec 13/31. COPII initiates budding and captures cargo to eject vesicles from the ER to the Golgi apparatus [10]. The interactions between Sar1-GTP and Sec23/24 form a concave complex which initiates the coat complex assembly [11]. Two Sar1 proteins have been identified in humans, namely Sar1a and Sar1b, which differ by 20 amino acid residues. Their respective functions have not been yet elucidated. To date, no variant in *SARIA* gene (encoding for Sar1a) has been described; mutations on *SARIB* gene are responsible for failure of chylomicrons production. Chylomicrons are transported from the ER to Golgi, inside the prechylomicron transport vesicle or PCTV [12]; PCTV share several proteins like COPII (Sec13-31, Sec24 and Sar1) [13]. Siddiqi et al. [13] showed that, even if PCTV formation can occur in the absence of Sar1, PCTV fusion with Golgi does require the presence of Sar1 [14]. To date, the modified sequence in the Sar1b protein is the only recognized abnormality linked to Anderson disease and CMRD, for which only eight mutations have been described [7].

This study is a report of a two-centre experience of three French families and five French-Canadian families with Anderson disease and CMRD. The aims of this work were first to describe three new not yet reported mutations in the *SARIB* gene, second to assess genotype–phenotype associations and third to provide explanation for and predict the functional impairment of mutated proteins, by using computational analysis and sequence alignment.

## Subjects and methods

### Patients

Fifteen patients (8 girls and 7 boys) were recruited from two pediatric gastroenterology units: Edouard Herriot Hospital, Lyon, France (7 patients, 4 born from Turkish, 2 from Algerian and 1 from Portuguese parents) and Sainte-Justine Hospital, Montreal, Canada (8 patients from 5 French-Canadian families). These patients were referred for symptoms of malabsorption syndrome (diarrhea, steatorrhea and failure to thrive). The age at diagnosis ranged 3 months to 11 years for the French patients and 2 weeks to 10 years for the French-Canadian patients. Anderson disease was strongly suspected because of a recessive particular lipid profile (severe hypocholesterolemia with decreased LDL and HDL, associated with normal triglyceride levels) (Table 1). Diagnosis was confirmed by negative oral fat load, evidence of white jejunal mucosa by esophagogastroduodenoscopy and fat loaded enterocytes by biopsy. All the patients exhibited very low levels of fat soluble vitamin E, although neurological and ophthalmological abnormalities were rarely observed at onset of the disease among them (symptoms were present only in Family II: areflexia in one child, carpal tunnel syndrome in another and carpal tunnel syndrome associated with distal sensitive neuropathy in a third one). Informed consent for molecular diagnosis was obtained from the parents. Lipid profile assessment and DNA sequencing were performed for both parents (6 families) or for one parent of the propositus only (2 families). DNA from unaffected children were available in two cases among the whole families population.

Fasting venous blood samples were collected in EDTA tubes for DNA molecular analysis and in a tube without any additive for biochemical studies. Total cholesterol, triglycerides were determined with commercial available kits (enzymatic methods Roche<sup>®</sup> diagnostics, Meylan, France). HDL-cholesterol was determined by direct method on a Hitachi<sup>®</sup> 917 (Hitachi<sup>®</sup>, Mito, Japan) (PEG method; Roche<sup>®</sup> diagnostics Meylan, France) for French patients and after precipitation of very-low and low-density lipoproteins with phosphotungstic acid for French-Canadian patients.

### Molecular diagnosis

DNA was extracted from 5 ml EDTA-anticoagulated blood by resin-chloroform (Nucleon BACC3, Amersham<sup>®</sup>, Buckinghamshire, England) or from buffy coat by precipitation (Wizard Genomic DNA kit, Promega<sup>®</sup>, Madison, USA). Mutations in *SARIB* exons 2–7 were screened by dHPLC and sequenced as follows: the primer sequences were obtained on the PRIMER3 web site (<http://www.genome.wi.mit.edu>) from the *SARIB* gene sequence (Genbank, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NC\\_000005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NC_000005), gi: 51511721). Amplicon sizes included the exon–intron boundaries to detect potential splice site mutations. The PCR amplifications were realized with polymerase Optimase Taq (Transgenomic<sup>®</sup>, Omaha, USA) and with Hot Star Taq (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Germany). Exon 1 was only amplified for Family I because the first ATG codon is in exon 2). PCR amplicons were sequenced with ABI PRISM BigDye ready reaction reagent set (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, USA) on an ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, USA).

### Methods used for Family I

RNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBNC). PBNC from lithium-heparinate-anticoagulated blood were stimulated by phytohemagglutinine (PHA) and maintained by IL2. RNA was extracted from PBNC using the RNA NOW kit (Biogentex<sup>®</sup>, St Quentin Yvelines, France) and amplified with the Gene Amp-RNA PCR core kit and random Hexamers primers (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, USA). A 752 bp fragment was amplified with Hot Star Taq (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Germany) and 2 primers designed to that end. PCR amplicons were sequenced as described above.

Table 1  
Mutations, clinical and laboratory findings at the diagnosis

Family	Origin	Sex	Age at diag	Symptomatology at diagnosis			Lipid profile			Variant	Amino acid change	Status	
				Digestive symptoms	Hepatic signs	ASAT/ALAT	Tendon reflexes	TC	TG				HDL-C
I 1	Algerian	F	6y	diarr	0	NA/2N	+/+	2.01	1.44	0.32	c.1-4482_58+1406del5946 ins15pb	p-Met1_His43del	hom
I 2		M	8y	diarr	0	N/2N	+/+	2.32	0.78	0.40	c.1-4482_58+1406del5946 ins15pb	p-Met1_His43del	hom
I 3		F	m					5.47	0.97	1.51	c.1-4482_58+1406del5946 ins15pb	p-Met1_His43del	het
I 4		M	f					5.75	0.61	1.64	c.1-4482_58+1406del5946 ins15pb	p-Met1_His43del	het
II 1	Turkish	M	3m	diarr, vo	0	2N/N	+/+	1.99 <sup>st</sup>	0.43 <sup>st</sup>	0.57 <sup>st</sup>	c.364 G>C	p-Glu122X	hom
II 2		F	6y	diarr	0	N/N	+/+	1.26	0.50	0.53	c.364 G>C	p-Glu122X	hom
II 3		F	8y	diarr	0	3N/2N	+/+	1.37	0.72	0.39	c.364 G>C	p-Glu122X	hom
II 4		M	11y	diarr	0	2N/2N	d/0	1.36	0.45	0.45	c.364 G>C	p-Glu122X	hom
II 5		M	uc					3.68	0.62	1.29	c.364 G>C	p-Glu122X	het
II 6		F	m					5.01	1.18	1.45	c.364 G>C	p-Glu122X	het
II 7		M	f					5.79	0.90	1.30	c.364 G>C	p-Glu122X	het
III 1	French Canadian	M	3m	diarr	0	4N/3N	+/+	1.30	0.45	0.49	c.409 G>A	p-Asp137Asn	hom
III 2		M	2m	diarr	0	NA/1.5N	+/+	0.86	0.37	0.38	c.409 G>A	p-Asp137Asn	hom
III 3		F	m					3.81	1.37	1.16	c.409 G>A	p-Asp137Asn	het
III 4		M	f					4.17	0.90	0.96	c.409 G>A	p-Asp137Asn	het
IV 1	French Canadian	F	3m	diarr, vo	0	2N/2N	+/+	1.24	0.82	0.41	c.409 G>A	p-Asp137Asn	hom
IV 2		M	f					4.21	2.06	0.88	c.409 G>A	p-Asp137Asn	het
V 1	French Canadian	M	2w	vo	HM	NA/2N	+/+	1.39	0.91	0.36	c.[409 G>A]H[537T>A]	p.[Asp137Asn]H[Ser179Arg]	comp het
V 2		M	3.5m	vo	0	NA/2N	+/+	1.11	0.54	0.45	c.[409 G>A]H[537T>A]	p.[Asp137Asn]H[Ser179Arg]	comp het
V 3		F	m					3.76	0.59	1.28	c.537T>A	p-Ser179Arg	het
V 4		M	f					3.90	1.42	0.88	c.409 G>A	p-Asp137Asn	het
VI 1	French Canadian	F	10y	0	0	NA/3N	+/+	2.82	1.36	0.59	c.537T>A	p-Ser179Arg	hom
VI 2		M	2m	diarr, vo	0	4N/7N	+/+	1.50	0.78	0.56	c.537T>A	p-Ser179Arg	hom
VI 3		F	uc					4.23	0.87	1.42	Normal	Sar1b (198aa)	hom
VI 4		F	m					4.52	0.73	1.57	c.537T>A	p-Ser179Arg	het
VI 5		M	f					5.46	2.07	1.27	c.537T>A	p-Ser179Arg	het
VII 1	French Canadian	F	5m	vo	0	NA/7N	+/+	1.78	1.28	0.56	c.537T>A	p-Ser179Arg	hom
VII 2		F	m					4.21	2.13	0.76	c.537T>A	p-Ser179Arg	het
VIII 1	Portuguese	F	2y	diarr	0	1.5N/2N	++/d	2.36	1.98	0.49	c.554 G>T	p-Gly185Val	hom
VIII 2		F	m					3.74	0.62	1.31	c.554 G>T	p-Gly185Val	het
VIII 3		M	f					5.60	1.34	1.65	c.554 G>T	p-Gly185Val	het

M, male; F, female; ac, affected child; uc, unaffected child; m, mother; f, father; *lipid profile*: TC, total-cholesterol (mmol/l); TG, triglycerides (mmol/l); HDL-C, HDL-cholesterol (mmol/l); *age at diagnosis*: m, month; y, year; w, week; *digestive symptoms*: diarr, diarrhea; vo, vomiting; ASAT/ALAT, ASAT value/ALAT value; N, upper normal value; *tendon reflexes*: upper limb/lower limb, +, present; ++, quick; 0, absent; d, decreased; NA, not available. Mutations in bold were not previously reported: hom, homozygous; het, heterozygous; comp het, compound heterozygous.

<sup>a</sup> First lipid profile while II.1 has parenteral nutrition.



A PCR analysis of large genomic DNA fragments was performed with the Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions and with specific primers designed to that end. This PCR product and the DNA Smart Ladder (Eurogentec®, Seraing, Belgium) molecular weight (band size 200–10,000 bp) were separated in a 0.75% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide. Following separation, DNA fragments were visualized with UV fluorescence to assess the status of each amplified DNA. The presence of the deletion was confirmed using specific amplification of PCR products with a couple of primers and then sequencing with primers located in *Alu* sequences.

### Computational analysis

Bioinformatics analysis were performed with ClustalW, FoldX6.0, PCE, ASA, Swiss-pdb Viewer 3.1 program, Polyphen and SIFT for the two well-described and the new missense mutations found in this study.

### Multiple sequence alignment

Sequences homologous to human Sar1b were assembled in a multiple sequence alignment using *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) [19] with default parameters using sequences found in the *UniProt Knowledgebase* (Swiss-Prot and TrEMBL) [20,21]. The aligned Sar1b sequences were from the species human (Accession No. Q9Y6B6), Chinese hamster (Q9QVY3) mouse (Q9CQC9), bovine (Q3T0T7), pig (Q5PYH3), mouse-ear cress (Q01474) and field mustard (O04267). The aligned Sar1a sequences were from the species human (Accession No. Q9NR31), orangutan (Q5R548), mouse (P36536), bovine (Q3T0D7), pig (Q52NJ3), mouse-ear cress (O04834) and field mustard (O04266). The aligned Sar1 sequences were from the species *Saccharomyces cerevisiae* (P20606), *Pichia pastoris* (Q9P4C8), *Schizosaccharomyces pombe* (Q01475), *Aspergillus niger* (P52886), *Trichoderma reesei* (P78976), *Caenorhabditis elegans* (Q23445) and *Giardia intestinalis* (Q8MQT8).

Multiple sequence alignments were performed with human members of the Sar1/Arf family: Sar1a (Q9NR31), Sar1b (Q9Y6B6), Arf1 (P84077), Arf4 (P18085) Arf6 (P62330) and with one protein of each small GTP binding proteins subfamilies: Arf1 (P84077), Ran (P62826), Rab1A (P62820), RhoA (P61586) and HRAS (P01112).

### Free energy calculation, pI, solvent accessible surface areas

The molecular free energy of each Sar1b homodimer variant was calculated with *FoldX6.0* (<http://foldx.embl.de/index.jsp>) [15–17].

The pI of the A chain of the wild type homodimer and each mutations was estimated with *PCE (Protein Continuum Electrostatics—pK<sub>a</sub> calculations)* an interface to electrostatic calculations using D. Bashford' MEAD program with default parameters ([http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn\\_lg=fr&chzn\\_rsrc=mead-pKa](http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=mead-pKa)).

The solvent accessibility was estimated with *ASA* ([http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn\\_lg=fr&chzn\\_rsrc=ASA](http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=ASA)) [18]. An accessibility of  $\leq 0.20$  is considered to represent the inner core of the protein.

### Modelisation

Molecular models of the variants carrying missense mutations were obtained by computational approaches using the *Swiss-pdb Viewer 3.1 program* (available on <http://www.expasy.org/spdbv>) [22,23] with the Q9Y6B6 structure based upon the template 1f6b of Chinese hamster Sar1b (resolution: 1.70 Å, *R* value: 0.220, homology 98.9%) [24]. This template shows the crystal structure of Sar-1 GDP complex. Molecular models of amino acid variants were constructed by residue replacement using this program. This program gives the “best” rotamer which is the rotamer that totalizes the lowest score. We studied all the possible rotamers and their consequences on structure (steric hindrances, loss of H-bonds with other residues of the protein or the guanine). Distances between the amino acid residues corresponding to the mutants and the guanine were measured with the Swiss-pdb Viewer 3.1 program and Q9Y6B6 model.

Distances between the amino acid residues corresponding to the mutants in yeast and Sec23 were measured with the Swiss-pdb Viewer 3.1 program on 1m2o template (resolution 2.50 Å, *R* value of 0.238) [11]. This template shows the crystal structure of the *S. cerevisiae* Sec23p-Sar1p complex (homology Sar1p *S.c.* and Sar1b: 63.6%).

### Additional computational analysis

The possible impacts of the amino acid substitutions on the structure and the function of Sar1b were additionally provided with two automatic tools *PolyPhen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) [25–27] and *SIFT* (Sorting Intolerant From Tolerant: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) [28,29].

## Results

### Lipids levels

Lipids levels in our patients were similar to published data in the Anderson disease population [2,4,5]. Serum triglycerides ranged within normal values. HDL-cholesterol was very low (twofold less than normal values) in all the affected children. Total cholesterol levels were impaired and differed among families. Interestingly, various levels of total cholesterol were found within the same family while HDL-cholesterol remained similar (Table 1).

### Mutations

Sequencing of genomic DNA was performed for all the affected children, their two parents and healthy siblings when available. We used the same nomenclature as Jones et al. [7] by starting at the first encoding ATG (exon 2); sequences of *SAR1B* gene (NC\_000005, gi: 51511721) and mRNA (NM\_016103, gi: 38176155) are available on GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Three novel variants of the *SAR1B* gene were identified in affected children from *Families I, II* and *VIII* (all affected children are homozygous) and two homozygous or compound heterozygous well-described mutations were found in affected French-Canadian children, as listed in Table 1.

A whole deletion of exon 2 was found in *Family I* (Fig. 1): the affected children were homozygous and their parents were heterozygous. No amplification was obtained in exon 2 for homozygous patients using different primers. We therefore amplified and sequenced a 676 bp fragment of cDNA (instead of 752 bp) and found a total deletion of exon 2 (76 bp). Since exons 1 and 3 were present in genomic DNA and cDNA, and according to the location of used primers, we first concluded that the deletion was less than 11675 bp. In order to determine the exact size of the deletion, two long range PCR were carried out. We found an approximately 6000 bp deletion using agarose gel electrophoresis (Fig. 1a and b). Affected children had only one small band, while normal controls have one large fragment (expected size); the parents had two bands. The sequencing (Fig. 1c) of the smallest fragment (approximately 1800 bp) was performed with other primers to facilitate sequencing. The PCR product revealed a 5946 bp

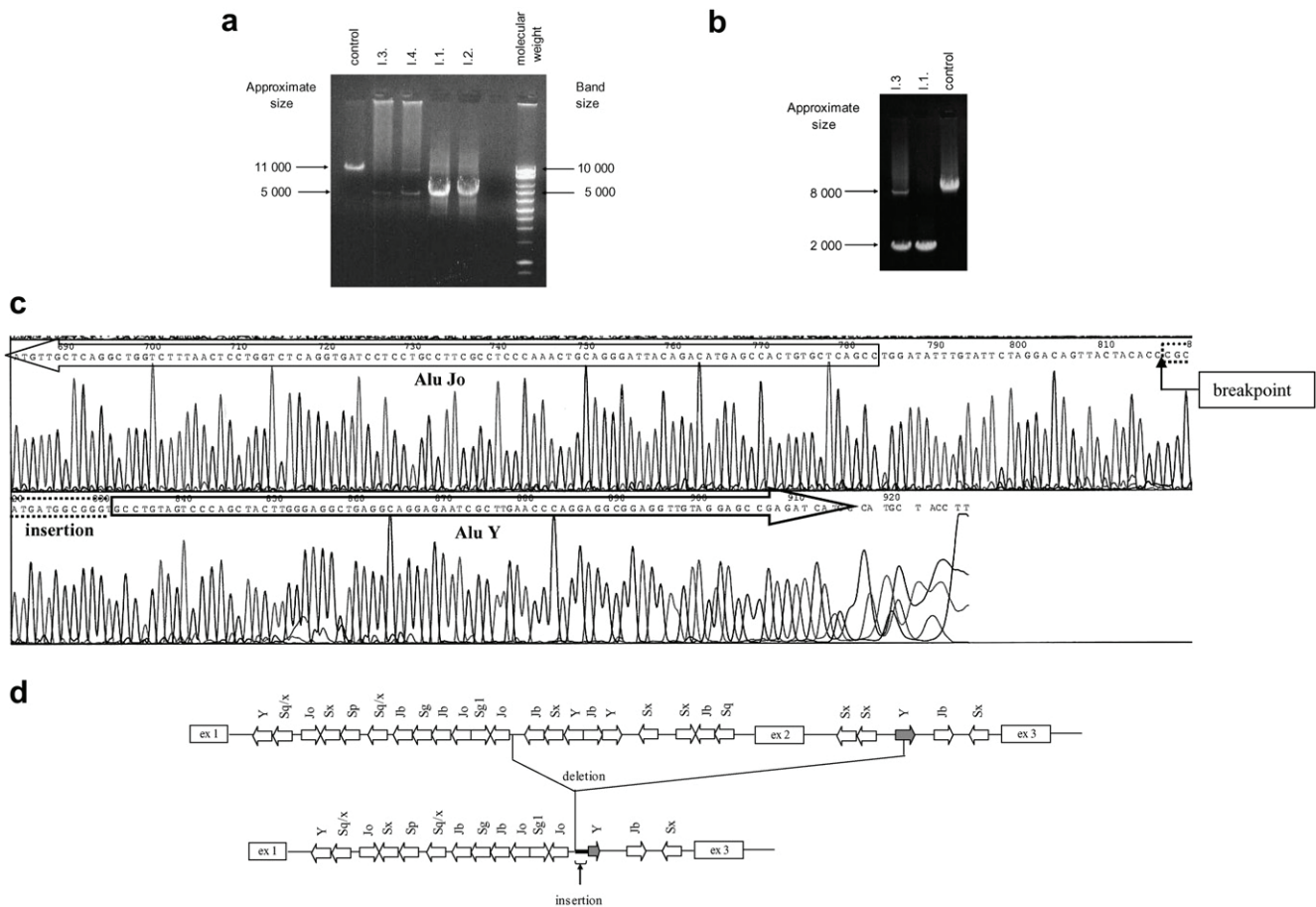


Fig. 1. Characterization of the mutation in Family I: c. 1–4482\_58+1406 del 5946 ins CGCATGATGGCGGGT (named mutation *SAR1B* delexon2). (a) Amplification with primers SARA\_2\_1F and delex2\_1AR (expected fragment size: normal 10,699 bp, heterozygous 10,699 and 4753 bp, homozygous 4753 bp): deletion of 5946 bp. (b) Amplification with primers delex2\_3F and delex2\_1AR (expected fragment size: normal 7806 bp, heterozygous 7806 and 1860 bp, homozygous 1860 bp): deletion of 5946 bp. (c) Sequence (amplification with primers delex2\_3F and delex2\_1AR, sequencing with delex2\_1DR). The sequence contains entire AluJo, short normal fragment, insertion (bold) and only the end of AluY (grey arrow). (d) Model of the insertion/deletion in Family I.

deletion with insertion of a small 15 bp fragment (Fig. 1d). The entire name of this deletion is c. 1–4482\_58+1406 del 5946 insCGCATGATGGCGGGT (named mutation *SAR1B* delexon2). This deletion/insertion totally removed the second exon from *SAR1B* confirming the RT-PCR results.

*Family II* exhibited a stop codon in exon 6: GGA>TGA (c.364G>T, p.Glu122Stop). All cases were homozygous for the mutation. Both parents and one healthy child were heterozygous.

We found a missense mutation in exon 7 of *Family VIII*: GGT>GTT (c.554G>T, p.Gly185Val). The child was homozygous and the parents were heterozygous. This missense mutation was not present in 100 alleles from controls.

Lastly, we found two different well-described homozygous or compound heterozygous mutations in the *SAR1B* gene in affected children from *French-Canadian families*. Both were missense mutations c.409 G>A (p.Asp137Asn) and c.537 T>A (p.Ser179Arg). Two children from *Family V* were compound heterozygous (Table 1). The other patients were homozygous (*Families III, IV, VI* and *VII*).

#### Analysis of predicted effects on protein by alignment

The 3D structure of Sar1b protein [11,24,30] is formed by 6  $\alpha$ -helices and 6 parallel  $\beta$ -strands. The latter leads to a hydrophobic  $\beta$ -sheet sandwiched between 3  $\alpha$ -helices. The alignment of Sar1b with Sar1p (Sar1 protein of *S. cerevisiae*) and Sar1bC.g. (*Cricetulus griseus*) shows highly conserved residues and functional sites (Fig. 2). The site interacting with Sec 12 is located in the NH<sub>2</sub>-terminus segment, i.e. in the  $\alpha$ -helix that will anchor to the ER membranes (residues 1–19) [24,30,31]. The two GTP binding and hydrolysis sites are also located in the same NH<sub>2</sub>-terminus segment of the protein (residues 32–38 and 75–78) [32]. The C-terminus segment includes: the  $\alpha$ -6 helix (residues 187–190, affinity to the ER membrane) [11] and the regulation loop (long surface exposed fragment from 156 to 171 residues) [24]. The guanine recognition site is located between the  $\alpha$ -5 helix and the  $\beta$ -5 strand (residues 134–137) [32]. Both NH<sub>2</sub>- and C-terminus segments and the  $\beta$ 2 $\beta$ 3 strands are in contact with the membrane and are needed for the curvature of the budding [11]. Briefly, the

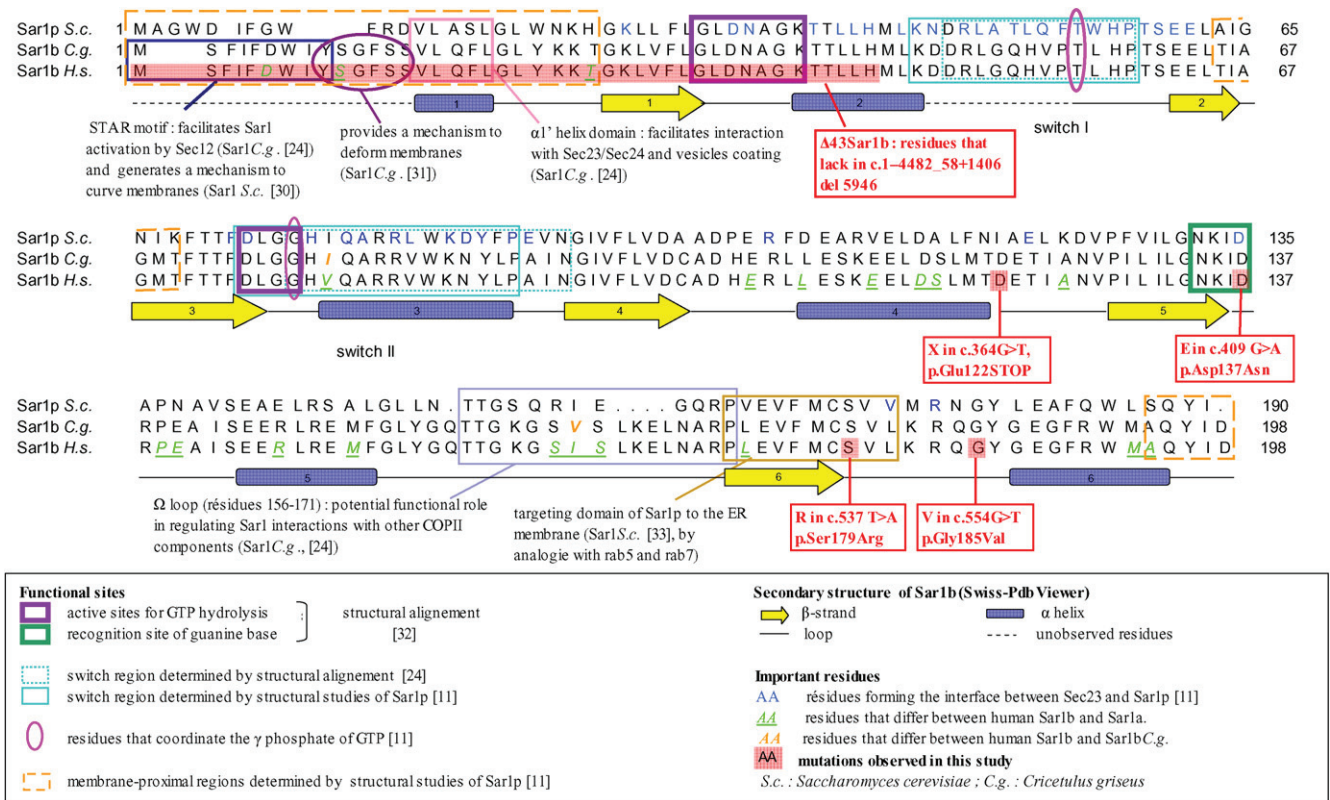


Fig. 2. Alignment of Sar1p *S.c.* (*Saccharomyces cerevisiae*), Sar1b *C.g.* (*Cricetulus griseus*) and human Sar1b: functional domains deduced of published studies and localization of the mutations found in this study.

N-terminus part allows the anchorage of Sar1b-GTP complex on the ER membrane, GTP-binding and hydrolysis, and the C terminus regulates interactions of Sar1b with the membrane.

Fig. 2 shows the location of all the mutations described above in this study. The mutation p.Glu122X (Family II) produces a 122 residues protein lacking the last 76 AA (i.e. lacking guanine recognition site, regulation loop and contact with membrane). The deletion of exon 2 (Family I) may lead to the production of four RNA transcripts encoding for four short proteins (Fig. 3). The largest of these proteins lacks the first 43 AA segment (p.Met1\_His43del or  $\Delta 43$ -Sar1b) which represents one

active site for GTP hydrolysis, domains that facilitate Sar1 activation by mSec12, deformation of RE membranes and interaction with COPII components. The three missense mutations concern highly conserved residues: p.Gly185Val near the  $\alpha$ -6 helix, p.Asp137Asn in the recognition site of guanine base (essential for GTPase activity) [32] and p.Ser179Arg in the targeting domain of Sar1 to the ER membrane [33].

### Computational analysis

We found three missense mutations (one is novel) which are neighbouring surface residues near the guanine pocket

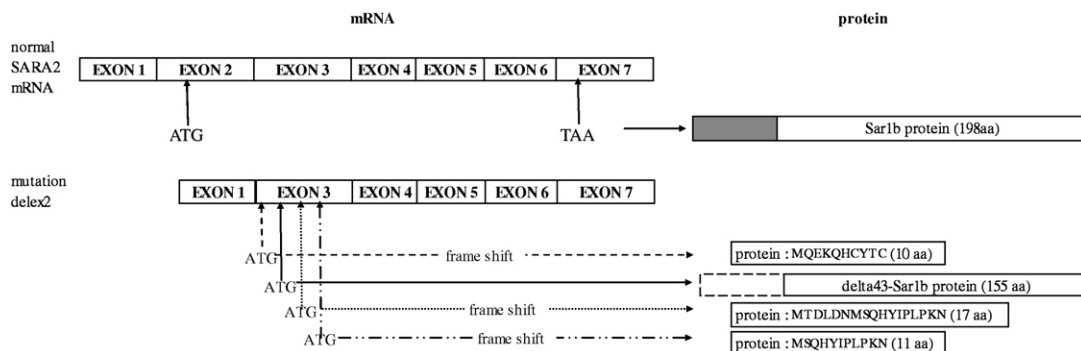


Fig. 3. *SAR1B* mRNA (up normal *SAR1B* and below mutation delex2: partially deleted region of *SAR1B* in Family I). The deletion of exon 2 may result in four ATG in the third exon encoding for four proteins: a  $\Delta 43$  Sar1b protein and three very short proteins resulting of frame shift.



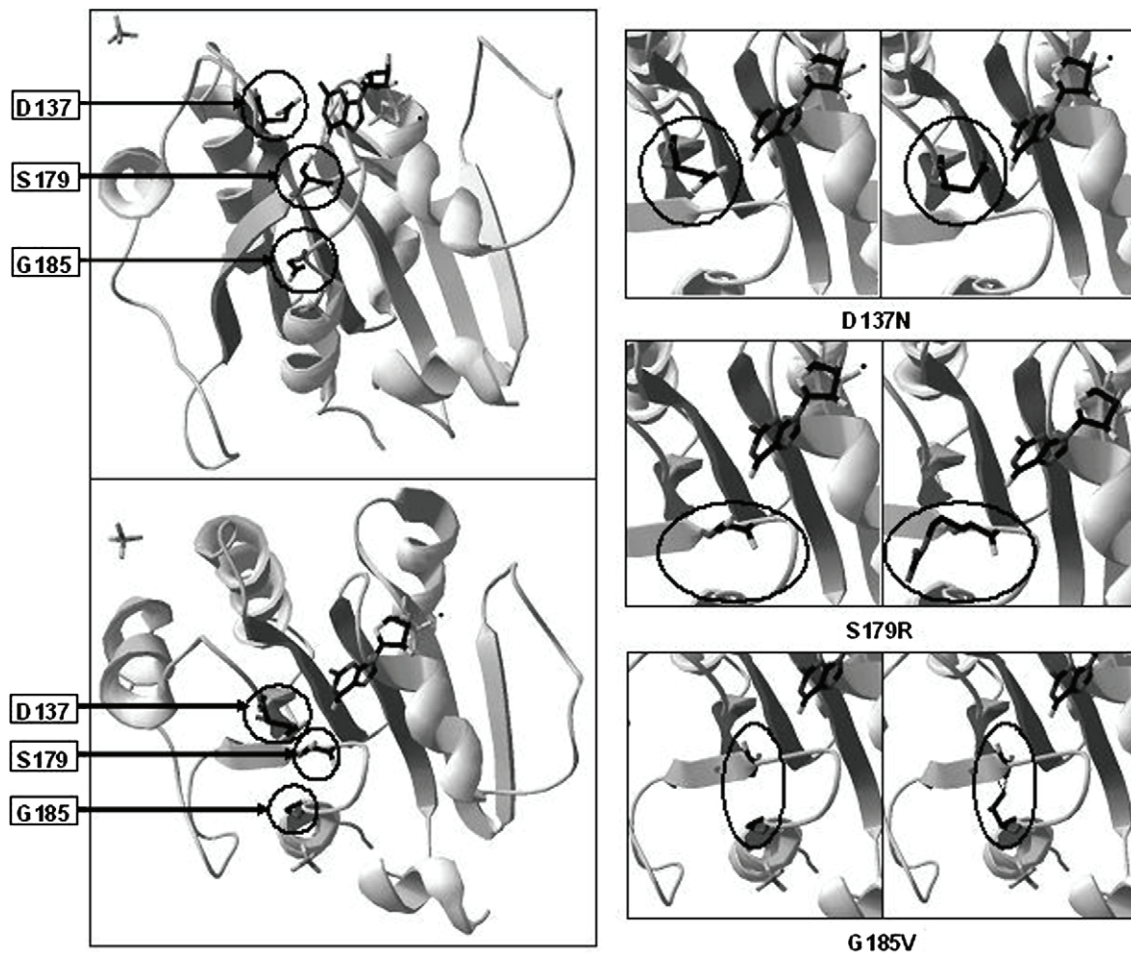


Fig. 4. 3D localisation of missense mutations observed in this study. This model was based on template Huang crystal structure of Sar1-GDP (X-ray, 1.7 Å) [24] and obtained with the Swiss-PdbViewer 3.7 program available on <http://www.expasy.org/spdbv/> [22,23]. On the left, two views of 3D Sar1b protein and the residues implicated in missense mutations. On the right, representation of the mutated residues (left picture, wild type; right picture, variant).

(Fig. 4). These mutations were studied with different programs: FoldX6.0, PCE, ASA, Clustal W and the Swiss-pdb Viewer 3.1 (Table 2).

The three missense mutations affect conserved residues from other species in Sar1b, in human Sar1/Arf family (Supplementary data S1 and S2) and the p.D137N substitution concerns a conserved residue (Supplementary data S2) in the guanine recognition site (NKxD<sup>137</sup>) of human small GTP binding proteins [7,32]. All the missense mutations change chemical and/or structural properties (Table 2).

Our novel missense mutation (p.G185V, *Family VIII*) concerns a residue far from the guanine and the binding interface with the Sar1 GTPase Activating Protein Sec23. However, this substitution of the amphipatic  $\alpha$ 6-helix cap modifies a highly conserved residue in Sar1/Arf family (Supplementary data S1 and S2) and affects the stability of the protein and the solvent accessibility (Table 2). This change of the glycine residue for a valine leads to steric hindrances with residues on the  $\beta$ -6 strand (Met177, Cys178) and/or Gln184 for the nine possible rotamers (Fig. 4 and Supplementary data S3).

The well-described p.D137N replaces an acidic with an uncharged polar residue. This mutation modifies the pI of the protein (Table 2) and affects a residue near the guanine (2.69 Å), suppressing an H-bond with the guanine and affects the H-bond with S179 (Supplementary data S4). Moreover, this residue is located near the binding interface with Sec23 (Table 2). The well-described p.S179R mutation substitutes an uncharged polar for a basic residue. This mutation modifies the stability of the protein, exposes a buried residue (Table 2) and leads to the loss of H-bond with residues of Sar1b protein and guanine (Supplementary data S5).

## Discussion

To date, only eight mutations of *SAR1B* gene were described in 8 families by Jones in 2003 [7]: three frameshift (75-76 delTG, 555-558 dupTTAC, 349-1 G>C) and five missense mutations (109 G>A, 409 G>A, 537 T>A, 536 G>T, 542 T>C). Our study of 8 families identified three new homozygous mutations of *SAR1B* (a stop codon 364 G>T, a 5946 bp deletion-deleting exon 2, a missense

Table 2  
Computational analysis of the three missense mutations

Mutations	Energy (kcal/mol) <sup>a</sup>	pI <sup>b</sup>	Accessibility <sup>c</sup>	Residue conservation <sup>d</sup>			Distance to the guanine (Å) <sup>e</sup>	Distance of Sar1p residue to Sec23p (Å) <sup>f</sup>	Consequence of mutation on H-bonds <sup>g</sup>	Polyphen prediction <sup>g</sup>	SIFT prediction <sup>h</sup>
				Sar1b proteins	Sar1 proteins	Sar1/ Arf family proteins					
Wild type	-27.6695	9.70									
Mutations											
D137N	-31.0135	6.50	D 0.029 N 0.031	+	+	+	D 2.69 N 2.50	D135: 5.68 N135: 6.21 (Leu746)	Probably damaging : disruption of binding site	Affect protein function	
S179R	-24.8617	10.70	S 0.082 R 0.220	+	+	s	S 2.43 R 3.96	S172: 8.15 R172: 11.37 (Leu746)	Probably damaging (predication basis : alignment)	Affect protein function	
G185V	-24.6919	9.70	G 0.074 V 0.196	+	+	+	G 9.53 V 8.98	No consequence	Probably damaging (predication basis : alignment)	Affect protein function	

<sup>a</sup> Computations were done with FoldX6.0 (<http://foldx.embl.de/index.jsp>).

<sup>b</sup> Electrostatic calculations using D. Bashford' MEAD program: <http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/cgi-bin/PCE-pKa>.

<sup>c</sup> Computations were done with ASA ([http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn\\_lg=fr&chzn\\_rsrc=ASA](http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=ASA)). An accessibility of  $\leq 0.20$  is considered to represent the inner core of the protein.

<sup>d</sup> [http://www.ebi.ac.uk/cluster/](http://www.ebi.ac.uk/cluster/cluster/) residue conservation: +, identical; c, conserved substitution; s, semi conserved substitution.

<sup>e</sup> Swiss Pdb Viewer 3.7 Q9Y6B6 based upon the template 1f6b of Sar1b C.g. (resolution: 1.70 Å, R value: 0.220, homology 98.9%).

<sup>f</sup> Swiss Pdb Viewer 3.7 based upon the structure of Sec23-Sar1p complex (1m2o) at resolution 2.50 Å and with an R value of 0.238.

<sup>g</sup> PolyPhen <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.

<sup>h</sup> Sorting Intolerant From Tolerant: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.

mutation 554 G>T) and two well-described by Jones [7] (409 G>A, 537 T>A). As reported for the eight previously described mutations [7], our mutations are located within different regions of the *SAR1B* gene (exon 2, 6, 7) and could produce various gene or protein lesions. We observe diverse phenotypes among our patients although they all had failure to secrete chylomicrons.

Patients in *Family I* had higher total cholesterol levels than in Families II, III, IV, V and VII although they carried out a highly deleterious mutation. The hypothetical more functional protein is a  $\Delta 43$ -Sar1b (p.Met1\_His43del), which lacks one GTP hydrolysis site, one membrane proximal region (anchor) and seven residues forming interface between Sar1 and Sec23. Nevertheless  $\Delta 43$ -Sar1b may be partially functional, since the guanine recognition site and one GTP hydrolysis site are still present.

Affected children in *Family II* exhibited very low total cholesterol levels (except for II.1 with parenteral nutrition) and a mild neurological impairment. In this family (with p.Glu122X mutation) the C-terminus parts of the Sar1b protein is lacking; however the presence of the N-terminus part allows interaction with mSec12, so that fixation, but not binding of mutated Sar1b on the membrane is preserved.

In an attempt to explain a more severe phenotype of Family II than Family I, we suggest: first that the Sar1b [E122X] mutant may play a negative role by interfering with mSec12 as described for Sar1[T39N] [24]; second, that the C-terminus part is as important as N-terminus for chylomicrons pathway (in contrast with alignment and published data (Fig. 2)). Third, we propose that other accessory pathways may be activated in these patients, which partially compensate for the lack of the Sar1b function (see below).

The computational analysis provided new insight regarding the probable functional consequences of the mutations, especially for the missense variants. PolyPhen, SIFT and our results strongly suggest that the three missense mutations might be deleterious. These results are in agreement with the damaging character described by Jones [7] for both p.Asp137Asn (*Families III, IV, V*) and p.Ser179Arg (*Families V, VI, VII*) well-described mutations. The p.Gly185Val (*Family VIII*) mutation affects a residue close to the  $\alpha 6$ -helix [7,34] and was predicted to modify not only the  $\alpha 6$ -helix (cap of this helix),  $\alpha 6/\beta 6$  parallelism (steric hindrances) but also the conformation of the regulation loop. Moreover, mutated residues of these missense variants reported here are all conserved in Sar1 proteins from other species.

Genotype–phenotype correlations are not obvious in our patients with Anderson disease. Interestingly, missense mutations are frequent (6/8 families) but phenotypical data are not different from nonsense mutations; conversely, the same missense mutation is associated with different lipid profiles between families (*Families III–IV* and *VI–VII*) and even among the same family (*Families III* and *VI*); lastly, only one case in *Family II* had a neurological impair-

ment and only one in *Family V* suffered from hepatomegaly. Some arguments might help to explain the lack of genotype–phenotype correlation: since the missense mutations were predicted to produce very non-functional proteins (see above), Anderson disease might be represent a more complex trait rather than a simple autosomal recessive disorder, as lessons from several Mendelian diseases suggest it [35–38]. Among the three possible mechanisms proposed by Dipple et al. (thresholds, modifier genes and biological networks) to determine Mendelian phenotypes, we believe that modifiers genes as transcriptional factors might be predominant in the ER-to-Golgi transport, although no available data exist yet about Anderson disease. However sterols decrease Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) activation blocking incorporation of SCAP (SREBF chaperone) in COPII vesicles [39] whereas an acute depletion of cellular cholesterol concentration has been shown to decrease COPII transport [40]. Other modifier genes of cholesterol homeostasis might have interfered in cholesterol levels and hepatic injuries of our patients (Microsomal Triglycerid Transfert Protein or MTP, ATP Binding Cassette G5/G8 or ABCG5/8, apoB...) but none was analyzed. Of high interest is to hypothesize that a biological network [41] might exist to permit tolerance for genetic changes and allow COPII or PCTV to transport proteins and chylomicrons. Indeed, whereas nul variant of Sar1p is lethal for yeast [42], mutations in human Sar1b lead to a mild disease suggesting that Sar1a might be able to partially supply Sar1b; both Sar1a and Sar1b activities depend on the same factors (Sec 12 and Sec 23) to initiate the GTPase activity. Sec 13/Sec 31A, B and Sec 24A, B, C, D are essential for COPII budding [43], present in PCTV [13] and the Sec24 isoforms were described as in part functionally redundant for signal-mediated ER export [44]. Other proteins (Liver Fatty Acid Binding Protein or L-FABP, Vesicle-Associated membrane protein 7 or VAMP7) contribute to the transport and fusion of PCTV from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus [14,45]. Mutations and polymorphisms in all these proteins might affect the functionality of this “network” and explain phenotypical differences in patients; rare polymorphisms (cSNP) were described for *SAR1A* and *SAR1B* genes (Pubmed SNP available on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) but none has been found in our patients and only one in controls (synonymous L45L, data not shown).

Sequencing of the *SAR1B* gene provides an accurate diagnosis of Anderson disease. Since it is a short gene (7 exons), molecular diagnosis is quick and safe. Invasive and expensive esophagogastroduodenoscopies and biopsies can therefore be avoided. Moreover, an analysis of the polymorphisms of different proteins of the PCTV pathway may provide a better understanding of disturbed metabolism and variable cholesterolemia in Anderson disease and be an interesting way to elucidate lipids trafficking in normal enterocytes.

## Acknowledgments

The authors thank Sylvie Di Filippo for preparing the manuscript, Christophe Malcus for blood mononuclear cells culture, and Sylvie Labarge for clinical assistance. We are grateful to David Nabet, Chantal Jacobs and the members of the Hôpital Debrousse Gene Lab for RT-PCR technical assistance and the members of UF Lipides-Dyslipidémies for encouragement and technical assistance. We thank Rita Menassa for bioinformatics assistance.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ymgme.2007.08.120.

## References

- [1] C.M. Anderson, R.R.W. Townley, J.P. Freeman, P. Johansen, Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood, *Med. J. Aust.* 11 (1961) 617–622.
- [2] C.C. Roy, E. Levy, P. Green, A. Sniderman, J. Letarte, J.P. Buts, J. Orquin, P. Brochu, A. Weber, C. Morin, Y. Marcel, R. Deckelbaum, Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease, *Gastroenterology* 92 (1987) 390–399.
- [3] E. Lévy, Y. Marcel, J. Deckelbaum, R. Milne, G. Lepage, E. Seidman, M. Bendant, C. Roy, Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease, *J. Lipid Res.* 28 (1987) 1263–1274.
- [4] D. Strich, R. Goldstein, A. Phillips, R. Shemer, Y. Goldberg, A. Razin, S. Freier, Anderson's disease: no linkage to the apoB locus, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16 (1993) 257–264.
- [5] M.E. Bouma, I. Beucler, L.P. Aggerbeck, R. Infante, J. Schmitz, Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 398–410.
- [6] A. Dannoura, N. Berriot-Varoqueaux, P. Amati, V. Abadie, N. Verthier, J. Schmitz, J. Wetterau, M.E. Sansom-Bouma, L. Aggerbeck, Anderson's disease. Exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 2494–2508.
- [7] B. Jones, E.L. Jones, S.A. Bonney, H. Patel, A. Menskamp, S. Eichenbaum-Voline, M. Rudling, U. Myrdal, G. Annesi, S. Naik, N. Meadows, A. Quattrone, S. Islam, P. Naoumova, B. Angelin, R. Infante, E. Lévy, C. Roy, P. Freemont, J. Scott, C. Shoulders, Mutations in a Sar1GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders, *Nat. Genet.* 34 (2003) 29–31.
- [8] C. Barlowe, L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, R. Schekman, COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum, *Cell* 77 (1994) 895–907.
- [9] K. Matsuoka, L. Orci, M. Amherdt, S. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, T. Yeung, COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemical defined liposomes, *Cell* 93 (1998) 263–275.
- [10] T. Kirchhausen, Three ways to make a vesicle, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2000) 187–198.
- [11] X. Bi, R.A. Corpina, J. Goldberg, Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of COPII vesicle coat, *Nature* 419 (2002) 271–277.
- [12] S. Kumar, M. Mansbach, Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) G378–G386.
- [13] S.A. Siddiqi, F. Gorelick, J. Mahan, C. Mansbach, COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 415–427.
- [14] S.A. Siddiqi, J. Mahan, S. Siddiqi, F. Gorelick, M. Mansbach, Vesicle-Associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 943–950.
- [15] J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, L. Serrano, The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W382–W388.
- [16] J.W. Schymkowitz, F. Rousseau, I.C. Martins, J. Ferkinghoff-Borg, F. Stricher, L. Serrano, Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 10147–10152.
- [17] R. Guerois, J.E. Nielsen, L. Serrano, Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 369–387.
- [18] T.J. Richmond, Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins, *J. Mol. Biol.* 178 (1984) 63–89.
- [19] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [20] B. Boeckmann, A. Bairoch, R. Apweiler, M.C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M.J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout, M. Schneider, The Swiss-Prot Protein Knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 365–370.
- [21] The UniProt Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* (2007) 35, D193–D197.
- [22] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [23] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [24] M. Huang, J. Weissman, S. Béraud-Dufour, P. Luan, C. Wang, W. Chen, M. Aridor, I.A. Wilson, W.E. Balch, Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export, *J. Cell Biol.* 155 (2001) 937–948.
- [25] S. Sunyaev, V. Ramensky, P. Bork, Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms, *Trends Genet.* 16 (2000) 198–200.
- [26] S. Sunyaev, V. Ramensky, I. Koch, W. Lathe III, A.S. Kondrashov, P. Bork, Prediction of deleterious human alleles, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 591–597.
- [27] V. Ramensky, P. Bork, S. Sunyaev, Human non-synonymous SNPs: server and survey, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3894–3900.
- [28] P.C. Ng, S. Henikoff, Predicting deleterious amino acid substitutions, *Genome Res.* 11 (2001) 863–874.
- [29] P.C. Ng, S. Henikoff, Accounting for Human Polymorphisms Predicted to Affect Protein Function, *Genome Res.* 12 (2002) 436–446.
- [30] M. Lee, L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazzola, R. Schekman, Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle, *Cell* 122 (2005) 605–617.
- [31] A. Bielli, C. Haney, G. Gabreski, S. Watkins, S. Bannykh, M. Aridor, Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 919–924.
- [32] A. Nakano, M. Muramasu, A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 2677–2691.
- [33] C. d'Enfert, M. Gense, C. Gaillardin, Fission yeast and plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast, *EMBO* 11 (1992) 4205–4211.



- [34] C.C. Shoulders, D.J. Stephens, B. Jones, The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b, *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004) 191–197.
- [35] C.R. Scriver, P.J. Waters, Monogenic traits are not simple, *TIG* 15 (1999) 267–272.
- [36] K.M. Dipple, E.R. McCabe, Phenotypes of patients with “simple” mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers and systems dynamics, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1729–1735.
- [37] K.M. Dipple, E.R. McCabe, Modifier genes convert “simple” mendelian disorders to complex traits, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 43–50.
- [38] C.R. Scriver, Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanation in the era of genomics, *J. Pediatr.* 140 (2002) 502–506.
- [39] P.J. Espenshade, W.P. Li, D. Yabe, Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11694–11699.
- [40] A. Ridsdale, M. Denis, P.Y. Gougeon, J.K. Ngsee, J.F. Presley, X. Zha, Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins, *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 1593–1605.
- [41] K.M. Dipple, J.K. Phelan, E.R. McCabe, Consequences of complexity within biological networks: robustness and health, or vulnerability and disease, *Mol. Genet. Metab.* 74 (2001) 45–50.
- [42] A. Nakano, D. Brada, R. Schekman, A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast, *J. Cell Biol.* 107 (1988) 851–863.
- [43] M. Aridor, J. Weissman, S. Bannykh, C. Nuoffer, Balch WE, Cargo selection by the COPII machinery during export from the ER, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 61–70.
- [44] M.W. Wendeler, J.P. Paccaud, H.P. Hauri, Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum, *EMBO Rep.* 8 (2007) 258–264.
- [45] I. Neeli, S.A. Siddiqi, S. Siddiqi, W.S. Lagakos, B. Binas, T. Gheyi, J. Storch, C.M. 2nd Mansbach, Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* (2007) Apr 20 [Epub ahead of print].

## Molecular and functional analysis of two new *MTTP* gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia<sup>S</sup>

Mathilde Di Filippo,<sup>1,\*†</sup> Hervé Créhalet,\* Marie Elisabeth Samson-Bouma,<sup>§</sup> Véronique Bonnet,\* Lawrence P. Aggerbeck,\*\* Jean-Pierre Rabès,<sup>§,††,§§</sup> Frederic Gottrand,\*\* Gérald Luc,<sup>†††</sup> Dominique Bozon,\* and Agnès Sassolas\*<sup>†</sup>

Hospices Civils de Lyon,\* Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de biochimie et biologie moléculaire, Bron F-69677, France; Université de Lyon,<sup>†</sup> INSERM U1060, INSA de Lyon, INRA U1235, Université Lyon-1, Villeurbanne F-69621, Oullins F-69600, France; INSERM U698,<sup>§</sup> Université Diderot, CHU X. Bichat Secteur C. Bernard, Paris 75877, France; INSERM UMR S-747,\*\* Université Paris Descartes, Paris 75006, France; Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines,<sup>††</sup> UFR de Médecine Paris Ile-de-France Ouest, Guyancourt 78280, France; AP-HP,<sup>§§</sup> GH Hôpitaux Universitaires Paris Ile-de-France Ouest, Hôpital Ambroise Paré, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Boulogne 92104, France; CHRU Lille,<sup>\*\*\*</sup> Hôpital Jeanne de Flandre, Département de Pédiatrie, Université Lille Nord de France, Faculté de médecine, INSERM U995, IFR114, Lille 59000, France; and Hôpital Universitaire de Lille,<sup>†††</sup> Service de Médecine Interne, Université Lille Nord de France, Lille 59000, France

**Abstract** Abetalipoproteinemia (ABL) is an inherited disease characterized by the defective assembly and secretion of apolipoprotein B–containing lipoproteins caused by mutations in the microsomal triglyceride transfer protein large subunit (MTP) gene (*MTTP*). We report here a female patient with an unusual clinical and biochemical ABL phenotype. She presented with severe liver injury, low levels of LDL-cholesterol, and subnormal levels of vitamin E, but only mild fat malabsorption and no retinitis pigmentosa or acanthocytosis. Our objective was to search for *MTTP* mutations and to determine the relationship between the genotype and this particular phenotype. The subject exhibited compound heterozygosity for two novel *MTTP* mutations: one missense mutation (p.Leu435His) and an intronic deletion (c.619-5\_619-2del). COS-1 cells expressing the missense mutant protein exhibited negligible levels of MTP activity. In contrast, the minigene splicing reporter assay showed an incomplete splicing defect of the intronic deletion, with 26% of the normal splicing being maintained in the transfected HeLa cells. The small amount of MTP activity resulting from the residual normal splicing in the patient explains the atypical phenotype observed. **Our investigation provides an example of a functional analysis of unclassified variations, which is an absolute necessity for the molecular diagnosis of atypical ABL cases.**—Di Filippo, M., H. Cr halet, M. E. Samson-Bouma, V. Bonnet, L. P. Aggerbeck, J.-P. Rab es, F. Gottrand, G. Luc, D. Bozon, and A. Sassolas. **Molecular and functional analysis of two new *MTTP* gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia.** *J. Lipid Res.* 2012. 53: 548–555.

**Supplementary key words** dyslipidemias • familial hypocholesterolemia • chylomicrons • lipoprotein/assembly • hepatosteatosis • genetics • gene expression • genotype-phenotype correlation • splicing

Manuscript received 29 August 2011 and in revised form 10 January 2012.

Published, JLR Papers in Press, January 11, 2012  
DOI 10.1194/jlr.M020024

Abetalipoproteinemia (ABL; OMIM#200100) is an autosomal recessive hypocholesterolemia usually detected during infancy due to failure to thrive, severe diarrhea, and a lipid malabsorption syndrome. Sixty years ago, Bassen and Kornzweig described this disease for the first time (1), and forty years later, the role of the microsomal triglyceride transfer protein large subunit (MTP) was discovered (2–5). MTP forms a heterodimer with protein disulfide isomerase (PDI), also named prolyl 4-hydroxylase  $\beta$  polypeptide (P4HB), which is responsible of the assembly of apolipoprotein B (ApoB)–containing lipoproteins in the liver and the intestine. Since the discovery of the first mutations, many mutations have been identified in the microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene (*MTTP*) in patients (3–6). The identification of mutations in the *MTTP* gene in DNA from patients is important for establishing the diagnosis of ABL in the context of two other hereditary hypocholesterolemias, homozygous familial hypobetalipoproteinemia (HHBL; OMIM#107730) and Anderson’s disease, also known as Chylomicron retention disease (OMIM#246700), which are due to mutations in the *APOB* and *SAR1B* genes, respectively.

To date, mutations in the *MTTP* gene have been established in about 50 cases of ABL (7–12). In some instances,

Abbreviations: ABL, abetalipoproteinemia; ANGPTL3, angiopoietin-like 3; MCT, medium-chain triglyceride; MTP, microsomal triglyceride transfer protein large subunit; *MTTP*, microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PDI, protein disulfide isomerase; P4HB, prolyl 4-hydroxylase  $\beta$  polypeptide.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr

<sup>S</sup>The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of three figures.

Copyright   2012 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

the prediction of altered MTP function is readily made on the basis of premature stop codons, mutations in canonical splice sites, or frameshift mutations. In other cases, the functional consequences have been difficult to predict (13–15), even if the mutations cosegregate with a clinical phenotype. The measurement of MTP activity (2, 3, 6, 11, 13, 16, 17) and the consequence of intronic mutations (9, 11) have been studied in only a few cases due to the necessity of additional intestinal or hepatic biopsies.

ABL patients are usually diagnosed during infancy, and they exhibit marked lipid malabsorption, very low levels of cholesterol and triglycerides, the absence of ApoB in the plasma, the absence of chylomicrons after fat loading, and essential fatty acid and fat-soluble vitamin deficiencies (particularly vitamin E); moreover, parental lipoprotein profiles are normal. Hepatic steatosis has not been reported uniformly (although it is frequent), and hepatic fibrosis or cirrhosis has been reported in a few cases (18, 19). We report here an atypical case of ABL presenting in childhood with severe liver injury, hypocholesterolemia associated with a low (but not absent) levels of plasma ApoB, and a subnormal level of plasma vitamin E. Furthermore, the patient exhibited normal development into adulthood. ABL was suspected because of the presence, at the ultrastructural level, of large amounts of free lipid droplets accumulated in the cytoplasm of enterocytes and hepatocytes in intestinal and liver biopsies.

The patient was found to be compound heterozygous for two novel mutations in the *MTTP* gene, one intronic (c.619-5\_619-2 del, from her mother) and the other a missense mutation (p.Leu435His, from her father). The possible functional impact of these two mutations was not readily apparent. Because no additional biopsy material was available from the patient, two different assays were established. COS-1 cells were transfected with wild-type and several mutant *MTTP* cDNAs to evaluate the impact of the missense mutation on MTP activity, and HeLa cells were transfected with wild-type and mutant minigenes to evaluate possible defects in splicing.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient diagnosis and follow-up

A four-year-old girl was referred for an anicteric chronic hepatitis fortuitously discovered 10 months earlier. The level of blood transaminases were consistently elevated and ranged from 5 to 7 times the normal values associated with bilirubinemia in the absence of inflammation or hepatic insufficiency. Upon clinical examination, the liver was moderately enlarged and firm, but there was no other sign of chronic liver disease. The patient's growth was normal. The patient's parents altered her diet to avoid fatty foods following episodes of diarrhea in the first months of life. The levels of total cholesterol and ApoB in the plasma were found to be low, whereas the level of triglyceride was normal (Table 1). The parents were not related, and they had normal levels of blood lipids.

A perendoscopic jejunal biopsy, performed as previously described (20), showed a white mucosa. Electron microscopic examination of the biopsy showed enterocytes with many small or very large free lipid droplets scattered throughout the cytoplasm

(Fig. 1A, B). Examination by ultrasound showed that the liver was moderately enlarged and slightly hyperechogenic. A percutaneous liver biopsy showed extensive fibrosis (F3 score according to the METAVIR scoring system (21)) that was associated with a massive micro- and macrovesicular steatosis. Large amounts of free lipid droplets were observed in the cytoplasm by electron microscopy (Fig. 1C). Abetalipoproteinemia was suspected, although retinitis pigmentosa and acanthocytosis were absent and the blood vitamin E level was only slightly decreased. The fecal fat content, measured over a three-day period, was also normal (mean, 2.8 g/24 h; normal, <3 g/24 h). However, when the child consumed a normal fat diet (33% fat), diarrhea occurred and steatorrhea was 24 g/day. After an oral fat load (Table 1), the level of serum triglycerides increased slightly and a small amount of chylomicrons appeared in the plasma, suggesting that some intestinal lipid absorption occurred accompanied by low levels of intestinal lipoprotein secretion.

A diet limited in saturated fatty acids (22% of total energy) and enriched with medium-chain triglycerides (MCT) was initiated and resulted in the elimination of diarrhea and progressive improvement in liver function. Transaminases were 2 to 4 times normal at the age of 7 years, 2 to 3 times normal at 14 years, and normal by 18 years of age. Levels of essential fatty acids and fat soluble vitamins were also normalized, and the patient presented normal growth and puberty. At the age of 14 years, the patient no longer adhered to the MCT diet, and 36% of total energy intake was composed of fat. Hepatitis recurred (transaminases increased to 150 to 200 times normal) but resolved when the MCT diet was reinstated.

The patient is now 22 years of age and is in good health. Fat soluble vitamins are in the normal range without any supplementation. The levels of transaminases are < 1.5 times normal, and hepatic steatosis persists (16% of hepatic parenchyma as determined by magnetic resonance imaging). There are no neurological, ophthalmological, or retinal abnormalities.

Blood samples and intestinal and liver biopsies were obtained from the patient using the procedures and the experimental methods approved by INSERM (RBM 0256) and by a bioethics committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Paris Bichat-Claude Bernard, Paris, France, CCPPRB Bichat-C. Bernard-2003/05). Informed, written consent was obtained from the patient's parents.

### Mutation analysis

Following the extraction of genomic DNA from the blood (Nucleon Bac3, GE Healthcare®, Chalfont St. Giles, UK), each of the coding exons and the flanking intronic junctions of the *MTTP*, *APOB*, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) and angiotensin-like 3 (*ANGPTL3*) genes were amplified by PCR. The amplicons were sequenced directly with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI PRISM 3130 or 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### In silico analysis

Analysis of the mutations was performed with Alamut v2.0 (Interactive Software), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), and SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_aligned\\_seqs\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html)). Several algorithms were used for computational scoring of 3' splice site based on different concepts using default parameter settings [Neural Network Splice Prediction (NNSplice) (22); MaxEntScan (23); Splice site Finder Like; GeneSplicer (24); Human Splicing Finder (HSF) (25)].

### Protein expression

To evaluate the p.Leu435His protein expression, two different assays were performed. First, to measure wild-type and mutant



TABLE 1. Biological data for patient and parents

	TC	TG	HDLC	LDLC	ApoB	ApoA1	Vit E	Vit A	Vit D	ALT	AST	ALB	BMI
	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>g/l</i>	<i>g/l</i>	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	<i>nmol/l</i>	<i>UI/l</i>	<i>UI/l</i>	<i>g/l</i>	<i>kg/m<sup>2</sup></i>
Reference interval <sup>a</sup>	2.58–4.39	0.34–1.25	>1.03	1.81–3.10	0.5–1.2	1.1–2.0	11–35	1.4–3.0	34–130	<30	<30	35–50	
Patient													
Diagnosis (4 years old)	1.68	0.58	0.85	0.57	<0.18	ND	9.9	1.7	159	287	272	32	14
Oral fat load T0	2.27	1.15	2.17		0.20	0.93							
Oral fat load T 90	2.06	1.50	1.86		0.20	0.99							
Reduced fat diet (22 years old)	2.24	0.64	1.70	0.26	ND	ND	18.9	3	96	49	41	45	17.8
Father	5.42	0.97	1.42	3.57									
Mother	4.64	1.84	1.52	2.77	1.01	1.19				18	14		

Oral fat load with 15 g of fat performed at 5 years of age: T0, before fat ingestion; T90, 90 min after ingestion. ALB, albumin; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; HDLC, HDL cholesterol; LDLC, LDL cholesterol; ND, not determined; TC, total cholesterol; TG; triglyceride; Vit, vitamin.

<sup>a</sup>Normal values for four-year-old child.

MTP activities, we transfected COS-1 cells with the *MTTP* and *P4HB* cDNA. Second, to compare the production of wild-type with p.Leu435His, we transfected COS-1 cells with wild-type and mutated *MTTP* cDNA C-ter tagged with GFP.

### MTP activity

A 2,699 bp fragment containing the entire *MTTP* coding sequence, extending from c.-5 to c.\*9 (NM\_000253.2) and a 1,582 bp fragment containing the entire *P4HB* coding sequence (from c.-14 to c.1527; NM\_000918.3) were obtained by RT-PCR from 1  $\mu\text{g}$  of human liver total RNA (Cat. No. 636531; Clontech, Mountain View, CA) with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit (Cat. No. 05081963001; Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

The *MTTP* cDNA was inserted with the In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Cat. No. 639616; Clontech) into the *Kpn* I site of the pBudCE4.1 expression vector (Cat. No. V532-20; Invitro-

gen, Carlsbad, CA) downstream of the human elongation factor  $\alpha$ -subunit promoter. The *P4HB* cDNA was inserted into the *Hind* III site of the same vector, downstream of the human cytomegalovirus immediate-early promoter, allowing the production of the two proteins from the same plasmid.

The p.Leu435His (c.1304T>A), p.Leu435Glu (c.1303\_1305delinsGAA), p.Leu435Val (c.1303C>G), and p.Cys194Stop (c.582C>A) mutants were constructed from the wild-type sequence with the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Cat. No. 200521; Stratagene, Agilent Technologies, Cedar Creek, TX) according to the manufacturer's instructions.

Transient expression of MTP and P4HB in COS-1 cells (Cat. No. CRL-1650 ATCC) was carried out by transfecting 6  $\mu\text{g}$  of plasmid per T25 flask in the presence of 9  $\mu\text{l}$  of FuGENE® HD (Cat. No. 4709691001; Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

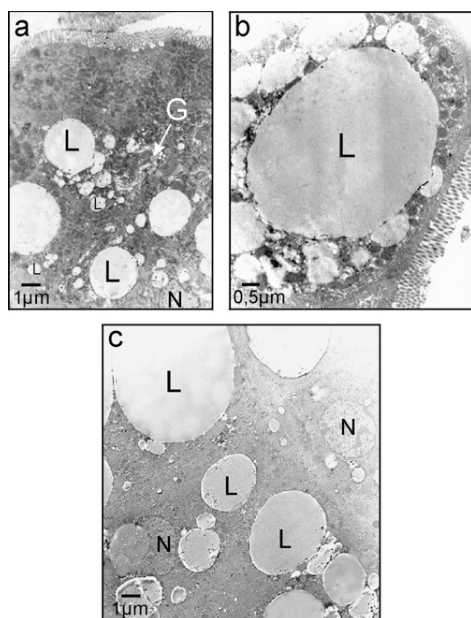
COS-1 cells were harvested by trypsinization 48 h posttransfection and disrupted by sonication. Triglyceride transfer from donor to acceptor vesicles was measured by a fluorescent-labeled method using a commercial kit (R100 MTP activity; Chylos Inc.) according to the manufacturer's instructions and previously described fluorescent methods (26–28). The results are expressed as percentage transfer per milligrams of total protein per hour. The method was evaluated with intestinal and hepatic biopsies, and the MTP activities were in agreement with previous published results (data not shown).

### Visualization of MTP in transfected cells

A fragment containing the *MTTP* cDNA, extending from c.1 to c.2682 (NM\_000253.2) of each sequence (wild-type, p.Cys194Stop, p.Leu435His) was amplified from the previously obtained pBudCE4.1 vector. The *MTTP* cDNA was inserted with the In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit into the *Kpn* I site of pAcGFP1-N1 expression vector (Cat. No. 632469; Clontech) between the immediate early promoter of the CMV (PCMV IE) and the AcGFP1 cDNA, allowing the fusion of the MTP and the GFP proteins. COS-1 cells were electroporated with 0.5  $\mu\text{g}$  of MTP-AcGFP1 plasmid per 80,000 cells (MicroPorator from DigitalBio Technology and Neon Transfection System 10  $\mu\text{L}$  Kit, Cat. No. MPK1096 from Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (1050 V, 30 ms, 2 pulses). Intracellular fluorescence was observed with a Nikon Eclipse TE 2000-U microscope 48 h after transfection.

### Minigene splicing reporter assay

A 371 bp *MTTP* fragment (the last 147 bases of intron 5, 140 bp of exon 6, and the first 84 bases of intron 6) was amplified from the patient's DNA and inserted (In-Fusion Advantage PCR



**Fig. 1.** Ultrastructure of intestinal and liver biopsies after a 12 h fast. The enterocytes (a, b) and hepatocytes (c) were engorged with numerous small or very large lipid droplets (L) free in the cytoplasm. The Golgi apparatus (G) is empty (b). Hepatic intercellular spaces were sometimes enlarged with fibrosis (c). The cell nucleus is labeled N.

Cloning Kit) into the *Nde I* restriction site of the pTB minigene vector (29). The transfection of normal and mutant minigenes into HeLa cells and RT-PCR procedures were as previously described (30).

The fluorescence of the ethidium bromide bands obtained following gel electrophoresis of RT-PCR products was integrated under unsaturated conditions (Quantity One<sup>®</sup> 1-D Analysis Software Cat. No. 170-9600; Bio-Rad) to derive band intensities.

### Metabolic labeling of intestinal biopsies

Intestinal biopsies from normal individuals and from the patient were placed into organ culture and metabolically labeled with [<sup>35</sup>S] methionine as described previously (31). After homogenization and solubilization, the labeled intestinal biopsy extracts and the corresponding media were immunoprecipitated with polyclonal antibodies against ApoB (rabbit polyclonal antibodies to ApoB were the gifts of Dr. A. Mazur of Institut National de la Recherche Agronomique, Champanelle, France) and MTP (31). For semi-quantitative analysis, densitometric analysis was performed using the PC version of NIH Image software (Scion Image) after photography with a computer-assisted camera (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad). The values were normalized with respect to the amount of TCA precipitable incorporated material in the biopsies.

## RESULTS

### Identification of mutations

Sequencing was performed on the genomic DNA of the patient and her parents. Two novel variants of the *MTTP* gene were identified in the patient. The first, inherited from her father, is a change from T to A at position c.1304 in exon 10 (supplementary Fig. IA) (nucleotide numbering starts at A of the ATG initiating codon, and exon 1 is the first coding exon), which changes the amino acid Leu 435 to a His. The second, inherited from her mother, is a 4 bp deletion in intron 5: c.619-5\_619-2 del (supplementary Fig. IB). This deletion of a repeated motif (TTTA) is upstream the acceptor site. These mutations were found neither in our panel of 100 normal alleles from unrelated subjects nor in the 1000 genomes database (32).

The patient is also heterozygous for a well-described polymorphism p.Gln95His inherited from her father. The frequency of this allele is between 5.4% and 6% in a healthy adult Caucasian population (England) and in a sample of 270 unrelated French Canadian men (6, 33) and 6.2% in a cohort of abetalipoproteinemia (6).

The patient had no mutation in the *APOB*, *PCSK9*, or *ANGPTL3* gene.

### Analysis of c.1304 T>A, p.Leu435His

The missense mutation (p.Leu435His) is located in exon 10 and affects a highly conserved residue in the middle  $\alpha$ -helical domain of MTP. The substitution changes a hydrophobic to a hydrophilic, basic residue [Grantham distance: 99 (0–215)]. This missense mutation is predicted by Polyphen to be “probably damaging” with a score of 0.99 and by SIFT to “affect protein function.”

To determine whether the p.Leu435His missense mutation produces a protein that is functional, we expressed, in COS-1 cells, the wild-type MTP as well as the p.Leu435His

and several other mutants (p.Leu435Glu, p.Leu435Val, and p.Cys194Stop). These mutations were tested in COS-1 cells to evaluate the sensitivity and specificity of our MTP activity assay: p.Leu435Glu was expected to be as severe as p.Leu435His because it changes the hydrophobic Leu to a hydrophilic acidic Glu, whereas p.Leu435Val was expected to be a mild change (Leu and Val are both hydrophobic and closely related amino acids). The introduction of a premature stop codon at the position p.Cys194 was expected to lead to the complete abolition of MTP activity as the ApoB and PDI binding sites are absent from the mutant. Further, the homozygous p.Cys194Stop mutation has been reported in an ABL patient (8).

As shown in Fig. 2, cells expressing p.Leu435His (the patient’s mutation), p.Cys194Stop, or p.Leu435Glu had negligible levels of MTP activity (0.30% to 1.9% TG transfer/30  $\mu$ g protein/h) compared with cells expressing p.Leu435Val or the wild-type protein (24.1% to 27.2% TG transfer/30  $\mu$ g protein/h respectively). The activity of the p.Leu435His MTP is not significantly different from the p.Cys194Stop truncated protein and, thus, must be considered as having negligible MTP activity compared with the wild-type protein. RT-PCR of the *MTTP* and *P4HB* transcripts in transfected COS-1 cells showed that the level of expression from each vector was comparable for the wild-type and the different mutant transfected cDNA (supplementary Fig. IIA, B). Fluorescent-tagged MTP showed an identical cellular distribution (supplementary Fig. IIC). The p.Leu435His mutant, therefore, was functionally defective.

### Analysis of c.619-5\_619-2del

*Splicing predictions.* All the algorithms predicted an effect on splicing with a decrease in the score for the acceptor site of intron 5 ranging from –10% for SSF-like to a complete abolition for GeneSplicer (–44% for MaxEnt Scan, –38.9% for NNSplice, –79% for HSF). As all the algorithms predicted an effect on splicing, experimental analysis of splicing was performed. HeLa cells transfected with wild-type or mutant minigenes were analyzed (size and sequence) by RT-PCR to determine the presence of abnormal transcript processing of the mutant.

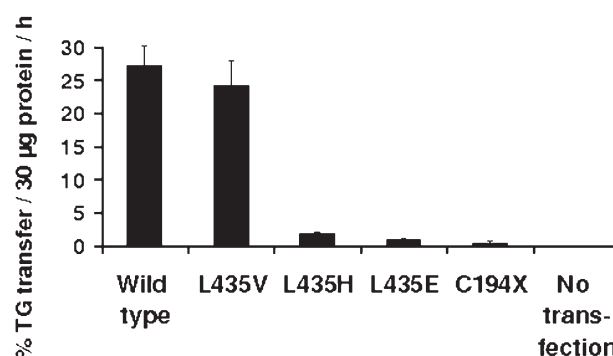


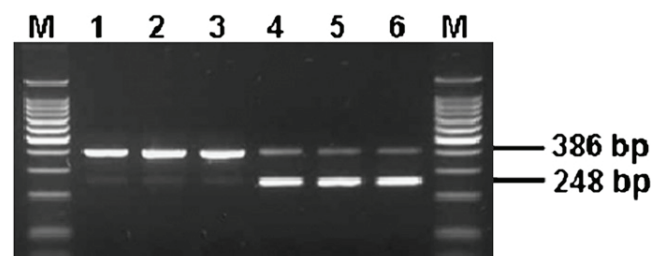
Fig. 2. Triglyceride transfer activity of normal and mutant MTP in COS-1 cells over a period of 48 h. Cell homogenates were used to measure triglyceride transfer from donor to acceptor vesicles using fluorescent-labeled method membranes. Columns and bars represents means  $\pm$  SD (n = 2).

**Minigene splicing reporter assay.** Transfection of the wild-type minigene into HeLa cells produced, as expected, a 386 bp RT-PCR fragment (Fig. 3, lanes 1, 2, and 3). In contrast, transfection of the mutant c.619-5\_619-2del minigene produced two different RT-PCR fragments: a small amount of a fragment of normal size (386 bp) and a large amount of a 248 bp product (Fig. 3, lanes 4, 5, and 6). The sequence of the 386 bp PCR product includes exon 6 of *MTTP*, whereas exon 6 is skipped in the 248 bp product (supplementary Fig. III). This result shows that c.619-5\_619-2del mutation produces two differently spliced transcripts: one containing exon 6 and the other without exon 6. Skipping exon 6 would result in a protein containing the first 206 MTP amino acids, followed by 26 aberrant amino acids and a premature stop codon. In vivo, this mutant mRNA might be targeted for nonsense mediated decay and degraded. By densitometry of the agarose gel, the amount of normal splicing for the mutant minigene is estimated to be 26% of that of the wild-type (Fig. 3). These data indicate that the c.619-5\_619-2del is a splice site mutation that can lead to the skipping of exon 6. However, the effect of this mutation on splicing was not complete, and about 26% of the transcript was correctly spliced in our assay.

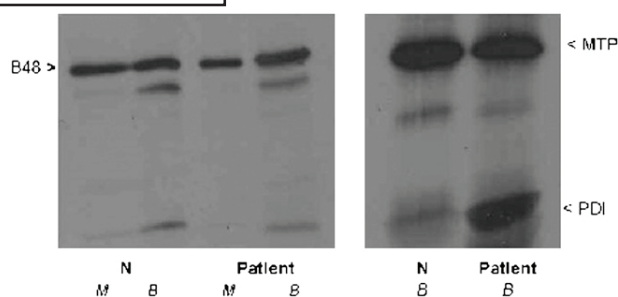
#### Biosynthesis of ApoB and MTP in intestinal organ culture

Immunoprecipitation with polyclonal antibodies to ApoB of the medium and the total homogenate of the organ culture of intestinal biopsies from the patient showed the synthesis of an ApoB48 identical in size to that of normal control subjects (Fig. 4). Analysis by densitometry with correction for the amount of incorporated TCA-precipitable radioactivity showed that there was an intracellular retention of ApoB48 (1.6-fold more) and a decreased ApoB48 secretion (1.3-fold less).

Immunoprecipitation with polyclonal antibodies to MTP of the total homogenate of the organ culture of intestinal biopsies from the patient showed the synthesis of a large subunit of identical in size to that of normal control subjects. However, by densitometric analysis, there was 2.49-fold less MTP synthesized in the patient's biopsy compared with that of the normal control subject after correction. A protein band corresponding to the molecular mass of PDI coimmunoprecipitated with the MTP was observed in the patient and in the normal control subject (identical in amount compared with that of the normal subject after correction).



**Fig. 3.** Size separation of RT-PCR products as determined by 2% agarose gel electrophoresis. M: molecular weight marker. Lanes 1, 2, and 3: normal minigene. Lanes 4, 5, and 6: mutant (c.619-5\_619-2del) minigene.



**Fig. 4.** Intestinal biosynthesis of ApoB48 and MTP in organ culture. ApoB48 was synthesized by the duodenal biopsy (B) and secreted in the medium (M) with the same molecular weight as normal control (N). MTP from the patient had the same molecular weight as normal control (N). PDI was coimmunoprecipitated: the binding of MTP with PDI was intact in the intestinal biopsy.

#### DISCUSSION

In this article, we describe two new mutations in the *MTTP* gene: p.Leu435His and a 4 bp deletion in intron 5: c.619-5\_619-2 del. Because the impact of these mutations was unclear and the phenotype was atypical, cellular functional tests were used to further understand this new case of ABL.

The diagnosis of ABL is made readily if the following criteria are present during the first months of life: severe diarrhea, failure to thrive, undetectable vitamin E, severe hypocholesterolemia and hypotriglyceridemia with undetectable amounts of plasma ApoB, and the absence, postprandially, of chylomicrons in the serum. Our patient presented with a mild phenotype and lacked the major criteria for the diagnosis of ABL. Surprisingly, the patient was referred only for anicteric chronic hepatitis with major liver steatosis at four years of age. The other causes of hypobetalipoproteinemia were ruled out because of the patient's lipids profile and the normal lipid values of the parents (34–40). Furthermore, no mutation was found in the *APOB*, *PCSK9*, or *ANGPTL3* gene. The diagnosis of ABL was finally suspected because of hypocholesterolemia and the typical aspect of intestinal and liver biopsies suggesting a defect in the assembly of ApoB-containing lipoproteins.

Seven atypical cases of ABL have been reported (13–15, 19, 41, 42). For five of these patients (Table 2), a molecular diagnosis of the mutation in *MTTP* was established. However, a functional assay of the mutation was performed in only one case (13). Two of the cases (cases 1 and 2 in Table 2) are very surprising. Both patients have deleterious mutations; however, the first patient exhibits a mild phenotype (42) and the other is almost asymptomatic (13). Two other patients (cases 4 and 5 in Table 2) are homozygous for the same p.Ser590Ile mutation (14, 15). Unfortunately, the functional impact of this mutation has not been established. Only case 3 (19) in Table 2 resembles our case clinically and biologically. This patient exhibits compound heterozygosity for a splice site and a missense mutation, along with liver dysfunction and slightly decreased level of vitamin E.



TABLE 2. Atypical mild cases of ABL reported in the literature

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
Reference	(42)	(13)	(19)	(15)	(14)
Mutation	[c. 61+2T>C]+ [c.419-420insA]	Homozygous p.Asn780Tyr	[c. 61+1G>C]+ [p.Ile564Thr]	Homozygous p.Ser590Ile	Homozygous p.Ser590Ile
Age at diagnosis (year)	13	27	1.25	52	24
Age at present (year)	32	27	5	52	44
Context of diagnosis	NA	During a routine medical examination	Hepatomegaly + liver dysfunction	During a routine medical examination	NA
Malabsorption	+	0	NA	+	+
Liver impairments	ALT, AST, GGT increased	Mild fatty liver	Hepatomegaly, steatosis, fibrosis	NA	NA
Neurologic impairments	Reduced reflexes	0	0	0	0
Ophthalmologic impairments	Minor xerophthalmia and abnormal dryness of membrane of the eyes	0	0	Atypical retinitis pigmentosa	Retinopathy
Vit E (μmol/l)	14 (RI: 12–36) on replacement therapy	<2.4	10 (RI: 18–34)	23 (RI: 12–46)	NA
TC (mmol/l)	0.90	0.87	1.25 to 2.36	0.85	NA
TG (mmol/l)	0.50	0.03	0.11 to 1.14	0.06	NA
HDLc (mmol/l)	0.50	0.59	NA	0.68	0.56
LDLc (mmol/l)	0.07	NA	NA	0.16	NA
ApoB (g/l)	0.06	0.006	<0.007	NA	NA
MTTP activity	NA	Negligible	NA	NA	NA

+, present; 0, absent; HDLc, HDL cholesterol; LDLc, LDL cholesterol; NA, not available; RI, reference interval; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; Vit, vitamin.

The p.Leu435His mutation affects an amino acid in helix 8 of the predicted  $\alpha$ -helical domain of MTP (43). Although this helix is not included in the major binding site for PDI and ApoB (43–45), the MTP activity of the mutant protein is very low and similar to that of “severe” mutations. The p.Leu435His mutation leads to a nonfunctional protein probably by affecting the MTP folding. Misfolded MTP may be targeted for degradation in the intestine or the liver; however, this recognition of misfolded proteins cannot be observed in heterologous expression systems (transfected COS-1 cells).

The c.619-5\_619-2del is probably responsible for the mild phenotype, as it produces two transcripts. One is normal-sized and contains exon 6 of the *MTTP*. The other transcript is aberrantly spliced and lacks exon 6. The phenotype may result from the correctly spliced RNA, which is able to produce an active MTP. Although there may be some variability in the amounts of correctly spliced RNA between HeLa cells and the liver or the intestine, the marked effect of the intronic deletion observed in HeLa cells most likely reflects what might be expected in other cell types. A possible molecular mechanism for this splicing anomaly, predicted by the *in silico* analysis, is the shortening of the polypyrimidine tract by the deletion of one TTTA repeat. This deletion, by changing the number of uridines in the *MTTP* pre-mRNA from 9 to 6, would decrease the number of interactions between the polypyrimidine tract and the pre-mRNA splicing factor U2AF65. This step is crucial as it is one of the first stages of splice site recognition. Short polypyrimidine tracts have been shown to be associated with variable levels of correctly spliced transcripts in the CFTR gene (46), thus providing evidence for incomplete penetrance of some splicing mutations in disease.

In our patient, the lipid transfer activity of the MTP produced from the normally spliced transcript may be sufficient to allow the assembly and secretion of a relatively limited amount of ApoB-containing lipoproteins by liver and intestine and could explain the presence of the lipid absorption (as shown by metabolic-labeling biosynthesis data) observed in the intestine of the patient. Both the intracellular accumulation and the decreased secretion of ApoB48 from the intestine are consistent with a partial defect in the assembly of ApoB, which leads to a partial defect in secretion of ApoB48 (unusual in ABL). In addition, the data also suggest that a low amount of intestinal MTP was present with a normal molecular weight and with an intact PDI binding domain. Finally, the presence of a limited amount of fat absorption and lipoprotein secretion could explain the normal level of vitamin E and the normal development with only a low-fat diet as treatment. However, the residual MTP activity is not sufficient to prevent the accumulation of lipids in the enterocytes and the hepatocytes.

In conclusion, our study of this atypical case of abetalipoproteinemia shows that the combination of molecular diagnosis and functional analysis resulted in a definitive diagnosis of MTP deficiency in a patient when insufficient biopsy material was available for the analysis of the MTP protein or RNA. The functional studies of the substitution of Leu435 to a charged amino acid (acid Glu or basic His) highlight the requirement for this hydrophobic uncharged residue for MTP activity. In cases of unusual phenotype, the functional characterization of the *MTTP* mutants allows a better understanding of the milder ABL phenotype.

The authors thank S. Dumont (Service de Biochimie, CBE, HCL, Lyon), S. Faïna (Service de Biochimie et Génétique



Moléculaire, CHU A Paré, AP-HP et PIFO-UVSQ, Boulogne), and M. Lannoy (INSERM U 698, Paris) for technical assistance; N. Verthier for expertise in electron microscopy methods; and J. P. Laigneau for expertise in illustration (INSERM, IFR 94 IRNM, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris).

## REFERENCES

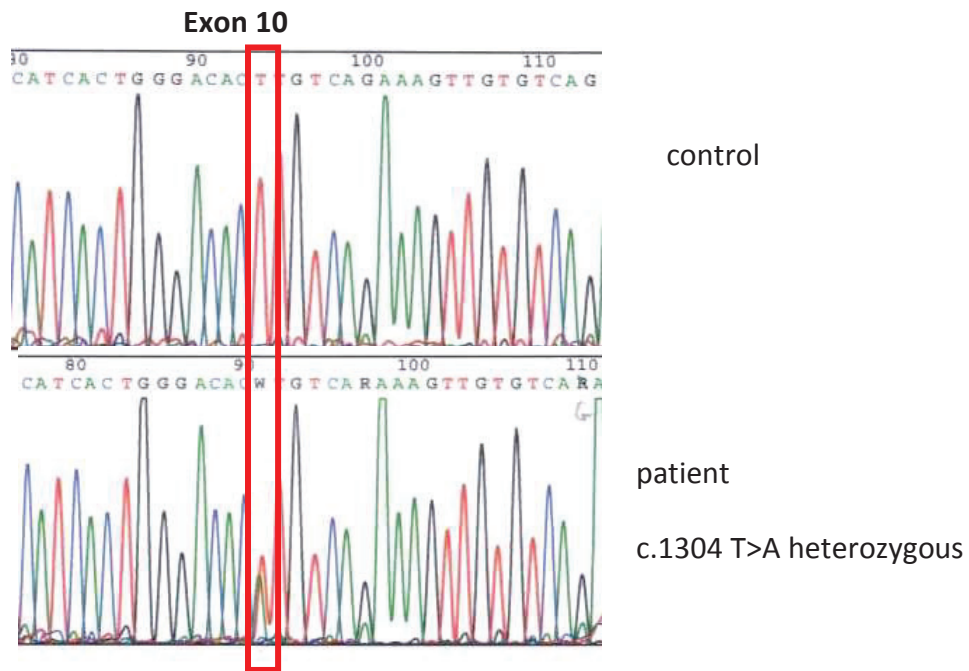
- Bassen, F. A., and A. L. Kornzweig. 1950. Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*. **5**: 381–387.
- Wetterau, J. R., L. P. Aggerbeck, M. E. Bouma, C. Eisenberg, A. Munck, M. Hermier, J. Schmitz, G. Gay, D. J. Rader, and R. E. Gregg. 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. **258**: 999–1001.
- Sharp, D., L. Blinderman, K. A. Combs, B. Kienzle, B. Ricci, K. Wager-Smith, C. M. Gil, C. W. Turck, M. E. Bouma, D. J. Rader, et al. 1993. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature*. **365**: 65–69.
- Shoulders, C. C., D. J. Brett, J. D. Bayliss, T. M. Narcisi, A. Jarmuz, T. T. Grantham, P. R. Leoni, S. Bhattacharya, R. J. Pease, P. M. Cullen, et al. 1993. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 2109–2116.
- Berriot-Varoqueaux, N., L. P. Aggerbeck, M. Samson-Bouma, and J. R. Wetterau. 2000. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 663–697.
- Narcisi, T. M., C. C. Shoulders, S. A. Chester, J. Read, D. J. Brett, G. B. Harrison, T. T. Grantham, M. F. Fox, S. Povey, T. W. de Bruin, et al. 1995. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 1298–1310.
- Zamel, R., R. Khan, R. L. Pollex, and R. A. Hegele. 2008. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**: 19.
- Chardon, L., A. Sassolas, B. Digeon, L. Michel-Calemard, M. Bovier-Lapierre, P. Moulin, and A. Lachaux. 2009. Identification of two novel mutations and long-term follow-up in abetalipoproteinemia: a report of four cases. *Eur. J. Pediatr.* **168**: 983–989.
- Najah, M., E. Di Leo, J. Awatef, L. Magnolo, J. Imene, E. Pinotti, M. Bahri, S. Barsaoui, I. Brini, M. Fekih, et al. 2009. Identification of patients with abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia in Tunisia. *Clin. Chim. Acta.* **401**: 51–56.
- Uslu, N., F. Gurakan, A. Yuce, H. Demir, and P. Tarugi. 2010. Abetalipoproteinemia in an infant with severe clinical phenotype and a novel mutation. *Turk. J. Pediatr.* **52**: 73–77.
- Pons, V., C. Rolland, M. Nauze, M. Danjoux, G. Gaibelet, A. Durandy, A. Sassolas, E. Levy, F. Terce, X. Collet, et al. 2011. A severe form of abetalipoproteinemia caused by new splicing mutations of microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Hum. Mutat.* **32**: 751–759.
- Sani, M. N., M. Sabbaghian, F. Mahjoob, A. B. Cefalu, M. R. Averna, and N. Rezaei. 2011. Identification of a novel mutation of MTP gene in a patient with abetalipoproteinemia. *Ann. Hepatol.* **10**: 221–226.
- Ohashi, K., S. Ishibashi, J. Osuga, R. Tozawa, K. Harada, N. Yahagi, F. Shionoiri, Y. Iizuka, Y. Tamura, R. Nagai, et al. 2000. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* **41**: 1199–1204.
- Wang, J., and R. A. Hegele. 2000. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene mutations in Canadian subjects with abetalipoproteinemia. *Hum. Mutat.* **15**: 294–295.
- Al-Shali, K., J. Wang, F. Rosen, and R. A. Hegele. 2003. Ileal adenocarcinoma in a mild phenotype of abetalipoproteinemia. *Clin. Genet.* **63**: 135–138.
- Ricci, B., D. Sharp, E. O'Rourke, B. Kienzle, L. Blinderman, D. Gordon, C. Smith-Monroy, G. Robinson, R. E. Gregg, D. J. Rader, et al. 1995. A 30-amino acid truncation of the microsomal triglyceride transfer protein large subunit disrupts its interaction with protein disulfide-isomerase and causes abetalipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* **270**: 14281–14285.
- Rehberg, E. F., M. E. Samson-Bouma, B. Kienzle, L. Blinderman, H. Jamil, J. R. Wetterau, L. P. Aggerbeck, and D. A. Gordon. 1996. A novel abetalipoproteinemia genotype. Identification of a missense mutation in the 97-kDa subunit of the microsomal triglyceride transfer protein that prevents complex formation with protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* **271**: 29945–29952.
- Black, D. D., R. V. Hay, P. L. Rohwer-Nutter, H. Ellinas, J. K. Stephens, H. Sherman, B. B. Teng, P. F. Whittington, and N. O. Davidson. 1991. Intestinal and hepatic apolipoprotein B gene expression in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. **101**: 520–528.
- Sakamoto, O., D. Abukawa, J. Takeyama, N. Arai, M. Nagano, H. Hattori, T. Egashira, N. Sakai, S. Yamashita, K. Inuma, et al. 2006. An atypical case of abetalipoproteinemia with severe fatty liver in the absence of steatorrhea or acanthocytosis. *Eur. J. Pediatr.* **165**: 68–70.
- Bouma, M. E., I. Beucler, M. Pessah, C. Heinzmann, A. J. Lusis, H. Y. Naim, T. Ducastelle, B. Leluyer, J. Schmitz, R. Infante, et al. 1990. Description of two different patients with abetalipoproteinemia: synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture. *J. Lipid Res.* **31**: 1–15.
1994. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. **20**: 15–20.
- Reese, M. G., F. H. Eeckman, D. Kulp, and D. Haussler. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **4**: 311–323.
- Yeo, G., and C. B. Burge. 2004. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J. Comput. Biol.* **11**: 377–394.
- Pertea, M., X. Lin, and S. L. Salzberg. 2001. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1185–1190.
- Desmet, F. O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Beroud, M. Claustres, and C. Beroud. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**: e67.
- Athar, H., J. Iqbal, X. C. Jiang, and M. M. Hussain. 2004. A simple, rapid, and sensitive fluorescence assay for microsomal triglyceride transfer protein. *J. Lipid Res.* **45**: 764–772.
- Rava, P., H. Athar, C. Johnson, and M. M. Hussain. 2005. Transfer of cholesteryl esters and phospholipids as well as net deposition by microsomal triglyceride transfer protein. *J. Lipid Res.* **46**: 1779–1785.
- Mirandola, S., S. Realdon, J. Iqbal, M. Gerotto, F. Dal Pero, G. Bortoletto, M. Marcolongo, A. Vario, C. Datz, M. M. Hussain, et al. 2006. Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology*. **130**: 1661–1669.
- Baralle, D., and M. Baralle. 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J. Med. Genet.* **42**: 737–748.
- Crehalet, H., P. Latour, V. Bonnet, S. Attarian, P. Labauge, N. Bonello, R. Bernard, G. Millat, R. Rousson, and D. Bozon. 2010. U1 snRNA mis-binding: a new cause of CMT1B. *Neurogenetics*. **11**: 13–19.
- Wetterau, J. R., and D. B. Zilversmit. 1986. Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **875**: 610–617.
- 1000 Genomes Project Consortium. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. **467**: 1061–1073.
- Berthier, M. T., P. Couture, A. Houde, A. M. Paradis, A. Sammak, A. Verner, J. P. Depres, C. Gagne, D. Gaudet, and M. C. Vohl. 2004. The c.419–420insA in the MTP gene is associated with abetalipoproteinemia among French-Canadians. *Mol. Genet. Metab.* **81**: 140–143.
- Cohen, J., A. Pertsemlidis, I. K. Kotowski, R. Graham, C. K. Garcia, and H. H. Hobbs. 2005. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**: 161–165.
- Kotowski, I. K., A. Pertsemlidis, A. Luke, R. S. Cooper, G. L. Vega, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2006. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**: 410–422.
- Tarugi, P., M. Averna, E. Di Leo, A. B. Cefalu, D. Noto, L. Magnolo, L. Cattin, S. Bertolini, and S. Calandra. 2007. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. **195**: e19–e27.
- Abifadel, M., L. Bernier, G. Dubuc, G. Nuel, J. P. Rabes, J. Bonneau, A. Marques, M. Marduel, M. Devillers, A. Munnich, et al. 2008. A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidaemia. *J. Med. Genet.* **45**: 780–786.
- Musunuru, K., J. P. Pirruccello, R. Do, G. M. Peloso, C. Guiducci, C. Sougnez, K. V. Garimella, S. Fisher, J. Abreu, A. J. Barry, et al. 2010. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N. Engl. J. Med.* **363**: 2220–2227.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jlr.org/content/suppl/2012/01/11/jlr.M020024.DC1.html>

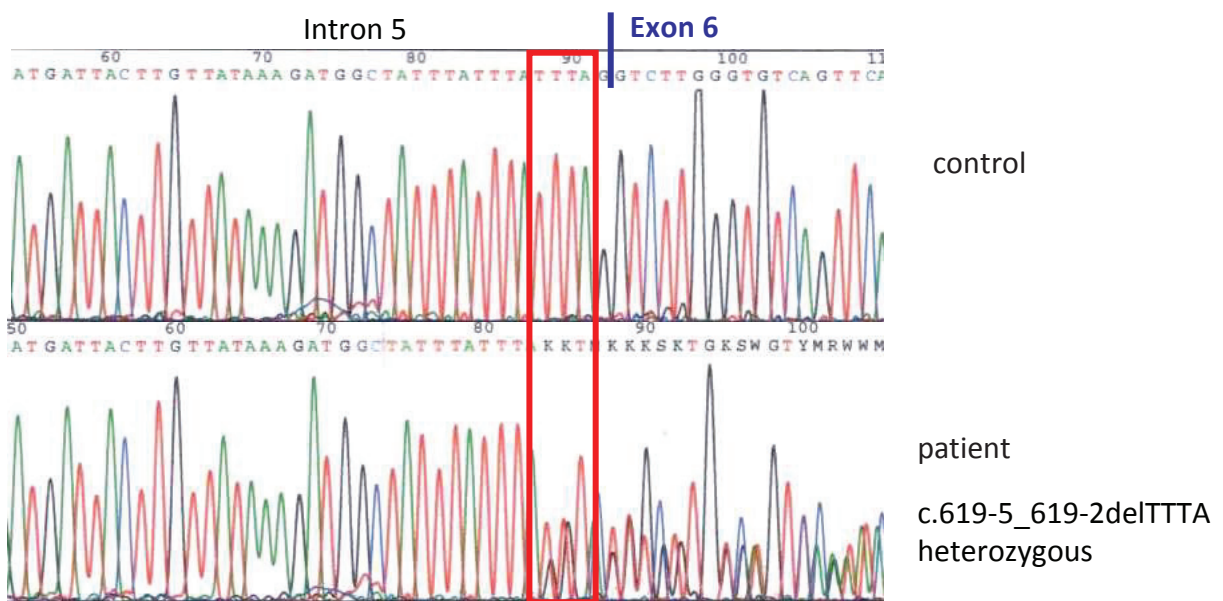
39. Martin-Campos, J. M., R. Roig, C. Mayoral, S. Martinez, G. Marti, J. A. Arroyo, J. Julve, and F. Blanco-Vaca. 2011. Identification of a novel mutation in the ANGPTL3 gene in two families diagnosed of familial hypobetalipoproteinemia without APOB mutation. *Clin. Chim. Acta*. Epub ahead of print. November 29, 2011; doi:10.1016/j.cca.2011.11.020.
40. Pisciotta, L., E. Favari, A. L. Magnolo, S. Simonelli, M. P. Adorni, R. Sallo, T. Fancello, I. Zavaroni, D. Ardigo, F. Bernini, et al. 2011. Characterization of three kindred with familial combined hypolipidemia due to loss of function mutations of ANGPTL3. *Circ. Cardiovasc. Genet*. Epub ahead of print. November 7, 2011; doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.960674.
41. Di Leo, E., S. Lancellotti, J. Y. Penacchioni, A. B. Cefalu, M. Aversa, L. Pisciotta, S. Bertolini, S. Calandra, C. Gabelli, and P. Tarugi. 2005. Mutations in MTP gene in abeta- and hypobeta-lipoproteinemia. *Atherosclerosis*. **180**: 311–318.
42. Al-Mahdili, H. A., A. J. Hooper, D. R. Sullivan, P. M. Stewart, and J. R. Burnett. 2006. A mild case of abetalipoproteinaemia in association with subclinical hypothyroidism. *Ann. Clin. Biochem*. **43**: 516–519.
43. Bradbury, P., C. J. Mann, S. Kochl, T. A. Anderson, S. A. Chester, J. M. Hancock, P. J. Ritchie, J. Amey, G. B. Harrison, D. G. Levitt, et al. 1999. A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem*. **274**: 3159–3164.
44. Shoulders, C. C., T. M. Narcisi, J. Read, A. Chester, D. J. Brett, J. Scott, T. A. Anderson, D. G. Levitt, and L. J. Banaszak. 1994. The abetalipoproteinemia gene is a member of the vitellogenin family and encodes an alpha-helical domain. *Nat. Struct. Biol*. **1**: 285–286.
45. Mann, C. J., T. A. Anderson, J. Read, S. A. Chester, G. B. Harrison, S. Kochl, P. J. Ritchie, P. Bradbury, F. S. Hussain, J. Amey, et al. 1999. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J. Mol. Biol*. **285**: 391–408.
46. Rave-Harel, N., E. Kerem, M. Nissim-Rafinia, I. Madjar, R. Goshen, A. Augarten, A. Rahat, A. Hurwitz, A. Darvasi, and B. Kerem. 1997. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet*. **60**: 87–94.

# Supplemental Data 1 : Sequencing of genomic DNA

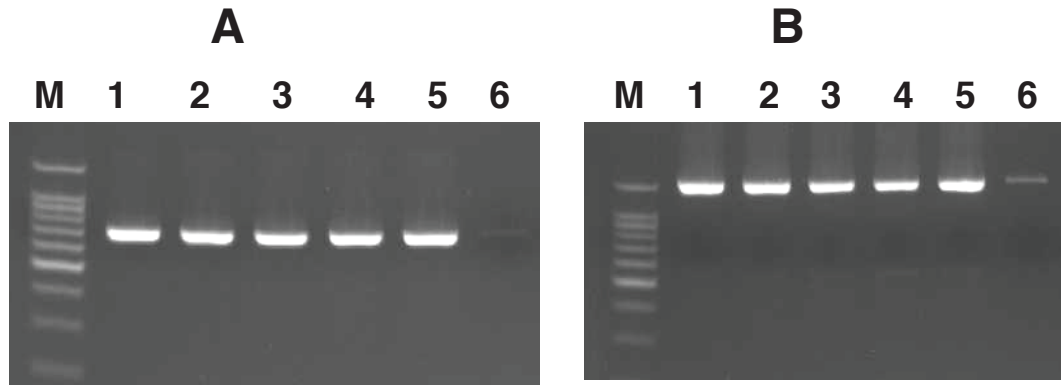
## Figure 1A : Sequencing of the exon 10 of the *MTTP* gene



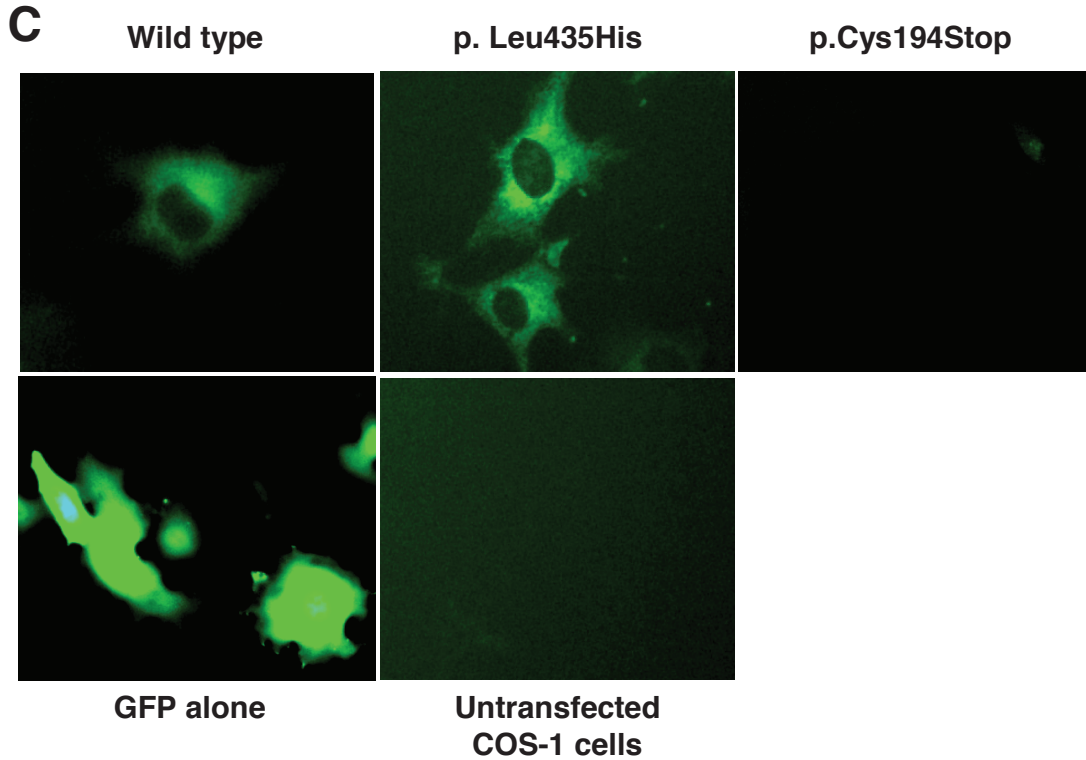
## Figure 1B : Sequencing of the intron 5 and exon 6 of the *MTTP* gene



## Supplemental Data Figure 2



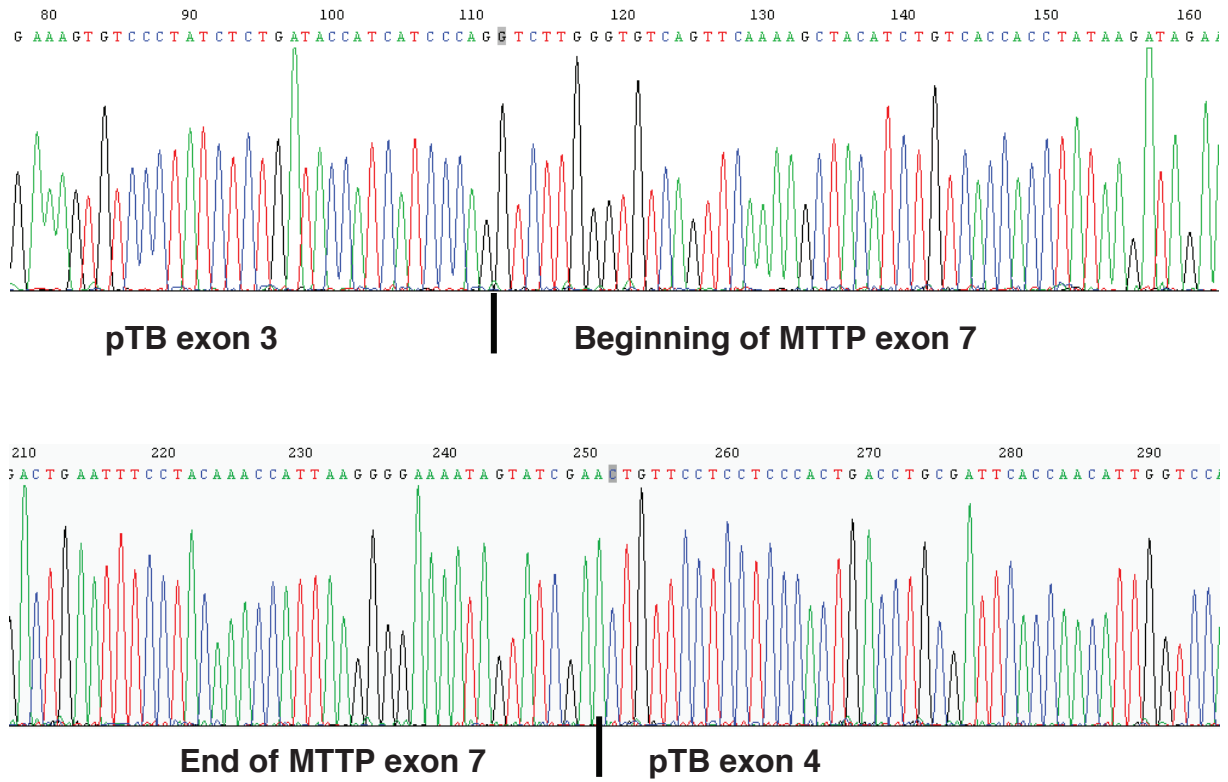
5  $\mu$ L of RT-PCR products were loaded on a 2% agarose gel. **A**: Total RNA was extracted from COS-1 cells transfected with the wild type MTP c.DNA (1) or the p.Leu435His c.DNA (2) or the p.Leu435Val c.DNA (3) or the p.Leu435Glu c.DNA (4) or the p.Cys194Stop c.DNA (5) or untransfected (6). After reverse transcription, amplification of a 706 bp fragment was performed with primers cMTP-946F and cMTP-1098rev. **B**: same as **A** but a 1582 bp PDI c.DNA fragment was amplified with primers PDI-Hind3-1 and PDI-Hind3-2.



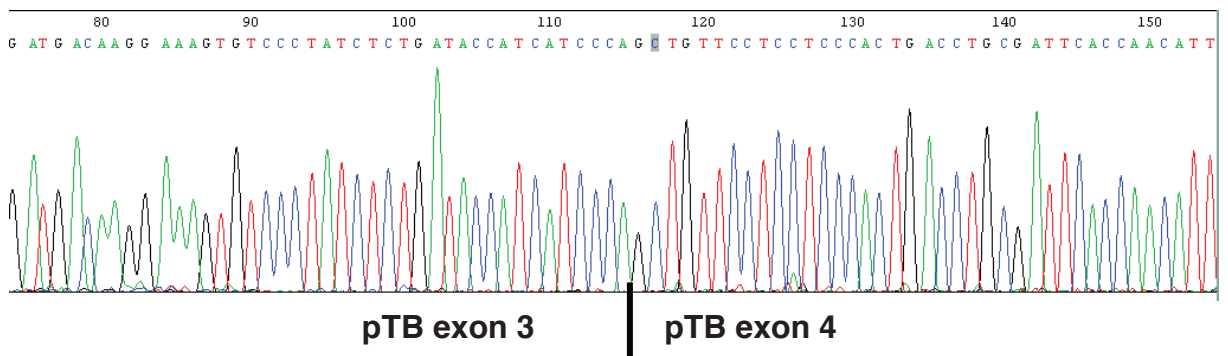
COS-1 cells were transfected with MTP-AcGFP1 fusion vector by microporation. Fluorescence was observed using Nikon Eclipse TE 2000-U microscope (objective 20) 48 hours after transfection.

### Supplemental Data Figure 3

Sequencing of the 386 bp RT- PCR product from minigene transfection :



Sequencing of the 248 bp RT- PCR product from minigene transfection :







## Homozygous *MTTP* and *APOB* mutations may lead to hepatic steatosis and fibrosis despite metabolic differences in congenital hypocholesterolemia

Mathilde Di Filippo<sup>1,2,\*</sup>, Philippe Moulin<sup>2,3</sup>, Pascal Roy<sup>4,5</sup>, Marie Elisabeth Samson-Bouma<sup>6</sup>, Sophie Collardeau-Frachon<sup>7</sup>, Sabrina Chebel-Dumont<sup>1</sup>, Noël Peretti<sup>8</sup>, Jérôme Dumortier<sup>9</sup>, Fabien Zoulim<sup>10</sup>, Thierry Fontanges<sup>11</sup>, Rossella Parini<sup>12</sup>, Miriam Rigoldi<sup>12</sup>, Francesca Furlan<sup>12</sup>, Grazia Mancini<sup>13</sup>, Dominique Bonnefont-Rousselot<sup>14,15,16</sup>, Eric Bruckert<sup>17</sup>, Jacques Schmitz<sup>18</sup>, Jean Yves Scoazec<sup>19</sup>, Sybil Charrière<sup>2,3</sup>, Sylvie Villar-Fimbel<sup>3</sup>, Frederic Gottrand<sup>20</sup>, Béatrice Dubern<sup>21,22</sup>, Diane Doummar<sup>23</sup>, Francesca Joly<sup>24</sup>, Marie Elisabeth Liard-Meillon<sup>25</sup>, Alain Lachaux<sup>8,26</sup>, Agnès Sassolas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UF Dyslipidémies Cardiobiologie, Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire du GHE, Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup>INSERM U1060, INSA de Lyon, INRA U1235, Univ Lyon-1, Université de Lyon, Villeurbanne, Oullins, France; <sup>3</sup>Fédération d'Endocrinologie, Maladies métaboliques, Diabète et Nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; <sup>4</sup>Service de Biostatistique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; <sup>5</sup>Centre National de la Recherche Scientifique UMR5558, Univ Lyon-1, Villeurbanne, France; <sup>6</sup>INSERM UMR698, Paris 7-Université Paris Diderot, CHU X. Bichat Secteur C Bernard, Paris, France; <sup>7</sup>Service de pathologie, Hospices Civils de Lyon et Université Claude Bernard, CHU de Lyon, France; <sup>8</sup>Service de Gastroentérologie Hépatologie et Nutrition Pédiatrique, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; <sup>9</sup>Fédération des Spécialités Digestives, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils, Lyon, France; <sup>10</sup>Service d'Hépatogastro-Entérologie, Hôpital de la Croix Rousse, Hospices Civils, Lyon, France; <sup>11</sup>Service d'Hépatogastro-Entérologie, Centre Hospitalier Pierre Oudot, Bourgoin Jallieu, France; <sup>12</sup>Rare Metabolic Disease Unit, Department of Pediatrics, Fondazione MBBM, San Gerardo Hospital, Monza, Italy; <sup>13</sup>Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands; <sup>14</sup>Unité pédagogique de Biochimie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France; <sup>15</sup>UPMC University Paris 6, UMR\_S1166 Inserm ICAN, Paris, France; <sup>16</sup>Service de Biochimie métabolique, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; <sup>17</sup>Service d'Endocrinologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France; <sup>18</sup>Service de Gastroentérologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France; <sup>19</sup>Service d'anatomie pathologique, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils, Lyon, France; <sup>20</sup>Department of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Jeanne de Flandre university hospital, Lille, France; <sup>21</sup>Nutrition et Gastroentérologie Pédiatriques, Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, France; <sup>22</sup>Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (ICAN), INSERM UMRS U872 (Eq7) Nutriomique, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; <sup>23</sup>Service de Neuropédiatrie, Hôpital Trousseau, Paris, France; <sup>24</sup>Service de Gastroentérologie et d'Assistance Nutritive, Hôpital Beaujon, Clichy, France; <sup>25</sup>Anatomie et Cytologie Pathologiques, Brive, France; <sup>26</sup>INSERM U 1111, Faculté de médecine Lyon Est, Université Lyon 1, Lyon, France

**Keywords:** Abetalipoproteinemia; Homozygous or compound heterozygous familial hypobetalipoproteinemia; NASH; Liver steatosis; Liver fibrosis; Obesity; Insulin resistance; *MTTP*; *APOB*; Hypocholesterolemia.

Received 5 November 2013; received in revised form 16 April 2014; accepted 6 May 2014; available online 16 May 2014

\* Corresponding author. Address: UF Dyslipidémies Cardiobiologie, Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Centre de Biologie et de Pathologie Est, 59 Bd Pinel, F-69677 Bron, France. Tel.: +33 4 72 11 89 94; fax: +33 4 27 85 59 00. E-mail address: mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr (M. Di Filippo).

**Abbreviations:** NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; Hz-FHBL, heterozygous familial hypobetalipoproteinemia; LDLc, LDL-cholesterol; apoB, apolipoprotein B; *MTTP*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein gene; ABL, abetalipoproteinemia; Ho-FHBL, homozygous or compound heterozygous hypobetalipoproteinemia; *MTP*, Microsomal Triglyceride transfer Protein; VLDL, Very Low Density Lipoprotein; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; LFT, liver function test; CRN, Clinical Research Network; CRN, Clinical Research Network; TG, triglycerides; BMI, Body mass index; ER, Endoplasmic Reticulum.

**Background & Aims:** Non-alcoholic steatohepatitis leading to fibrosis occurs in patients with abetalipoproteinemia (ABL) and homozygous or compound heterozygous familial hypobetalipoproteinemia (Ho-FHBL). We wanted to establish if liver alterations were more frequent in one of both diseases and were influenced by comorbidities.

**Methods:** We report genetic, clinical, histological and biological characteristics of new cases of ABL (n = 7) and Ho-FHBL (n = 7), and compare them with all published ABL (51) and Ho-FHBL (22) probands.

**Results:** ABL patients, diagnosed during infancy, presented mainly with diarrhea, neurological and ophthalmological impairments and remained lean, whereas Ho-FHBL were diagnosed later, with milder symptoms often becoming overweight in adulthood. Despite subtle differences in lipid phenotype, liver steatosis was observed in both groups with a high prevalence of severe fibrosis (5/27 for Ho-FHBL vs. 4/58 for ABL (n.s.)). Serum triglycerides concentration was higher in Ho-FHBL whereas total



## Research Article

and HDL-cholesterol were similar in both groups. In Ho-FHBL liver alterations were found to be independent from the apoB truncation size and apoB concentrations.

**Conclusions:** Our findings provide evidence for major liver abnormalities in both diseases. While ABL and Ho-FHBL patients have subtle differences in lipid phenotype, carriers of *APOB* mutations are more frequently obese. These results raise the question of a complex causal link between apoB metabolism and obesity. They suggest that the genetic defect in VLDL assembly is critical for the occurrence of liver steatosis leading to fibrosis and shows that obesity and insulin resistance might contribute by increasing lipogenesis.

© 2014 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common disease in which prevalence is rising rapidly. NAFLD is most often driven by increased lipogenesis, which occurs in metabolic syndrome, diabetes, and familial combined hyperlipidemia. Less frequently, NAFLD is observed in alterations in VLDL assembly occurring in heterozygous hypobetalipoproteinemia (Hz-FHBL) [1]. Hypobetalipoproteinemias represent a clinically complex and heterogeneous group of disorders characterized by a decrease of LDL-cholesterol (LDLc) and apolipoprotein B (apoB) concentrations below the 5th age- and sex-specific percentile [2–4]. In this report, we focus on two rare diseases: patients with homozygous or compound heterozygous mutations in the *MTTP* gene leading to abetalipoproteinemia (ABL) (MIM 200100), and with homozygous or compound heterozygous mutations in the *APOB* (FHBL, MIM 107730) gene leading to familial hypobetalipoproteinemia (Ho-FHBL).

In ABL, a rare autosomal recessive disease, several mutations have been identified in the microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene (*MTTP*), which encodes the MTP protein, the apoB chaperone protein, leading to a defect in apoB lipidation and consequently a lack of chylomicrons and VLDL secretion. In Ho-FHBL, a rare autosomal co-dominant disorder, the molecular defect leads to the absence of functional apoB100 and consequently to a defect in the secretion of  $\beta$ -lipoproteins. If the mutation affects one of the first 2152 residues, it additionally leads to the absence of functional apoB48 and the lack of chylomicron secretion.

An increased incidence of NASH (non-alcoholic steatohepatitis) was reported with controversial findings regarding insulin resistance in Hz-FHBL [5–13]. Interestingly, intra hepatic triglyceride content was found increased under treatment by mipomersen, an apoB synthesis inhibitor; histological NASH have also been reported both after mipomersen and lomitapid an MTP inhibitor in cases of hyperlipidemic patients [14–17]. However no obvious increase in insulin resistance was found when apoB synthesis was inhibited [14]. These findings raise the question of a major potential risk of severe hepatic complications in Ho-FHBL and in ABL.

Upon finding cases of severe fibrosis in ABL and Ho-FHBL, we wanted to establish if NASH prevalence leading to fibrosis was higher in one of both diseases and if it was dependent of any comorbidities. This led us to correlate liver alterations with lipid and clinical phenotype in ABL and Ho-FHBL. Our study includes

our cohort (7 new ABL cases, 7 new Ho-FHBL cases) and a review of all the previous cases with characterised mutations reported in the literature (including an update of 6 previously published ABL cases), with a total of 67 ABL cases from 58 families and 41 Ho-FHBL cases from 27 families.

### Patients and methods

#### Study population

**Our clinical cohort** consists of 14 new cases from 12 families from Europe and North Africa, including 9 women and 5 men, aged from 4 months to 42 years. Informed written consent was obtained from the patients and their parents for blood sampling. Cases were entitled A for ABL and B for Ho-FHBL patients. Clinical data were now updated for with 6 additional patients we had previously described [18–21] between the age of 17 to 36 years.

**Cases compilation** was performed within literature, cases with molecular diagnosis were selected (see chapter after). For each criterion, the features of all patients are shown simultaneously (those already published together with our new cases), the ABL then the Ho-FHBL patients are reported, followed by a comparison between both groups.

#### Classification of the population: Molecular diagnosis

**Our clinical cohort:** Following the extraction of genomic DNA from the blood, encoding regions and the flanking intronic junctions of the *MTTP* and *APOB* genes were amplified by PCR. The amplicons were directly sequenced on an ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems). Analysis of large genomic DNA fragments was performed with Expand Long Template PCR System (Roche®), as previously described [22], with the exception of an elongation time of 8 min (temperature of hybridisation: 58 °C).

**Cases compilation:** Among 75 studies and our work, homozygous or compound heterozygous mutations including truncated proteins, intronic mutations affecting splicing and missense mutations with damaging effect (familial transmission or MTP activity measurements in the article) were documented. *In silico* analyses of the mutations were performed with Alamut v2.0 (Interactive Software), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_aligned\\_seqs\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html)). Consequently carriers of p.D384A, p.H297Q, and p.G661A mutations in *MTTP* gene were not included. From literature, 60 ABL cases from 51 families and 34 Ho-FHBL cases from 22 families were included in addition to the 14 new cases from our cohort (7 ABL cases and 7 Ho-FHBL).

Mutations were named according to HGVS recommendations. When the mutation led to a truncated protein, the name of the abnormal protein was given according to the centile designation [23].

#### Biological and clinical exploration

For all patients, a retrospective study was performed: comprehensive biological (first detailed lipid profile, fat load, vitamin E), histological (liver biopsy) and clinical (gastrointestinal, ophthalmic and neurological) data was collected. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as previously described [24].

#### Liver evaluation

Liver alterations were assessed by liver function tests (LFT), imaging (ultrasound, transient elastography using FibroScan®) and liver biopsy. When biopsies were available, the histological scoring system proposed by the NASH Clinical Research Network (NASH CRN) was used to describe liver histology (steatosis, activity and fibrosis) [25]. Fibrosis score was assessed by special stains (Masson trichrome and Sirius red).

#### Statistical analysis

For statistical analysis only one case per family (proband) was studied, consequently 58 ABL and 27 Ho-FHBL probands were compared. Comparison of the distribution of qualitative variables was performed by Fisher exact tests, Student *t*



tests and non-parametric Mann-Whitney tests in the case of non-Gaussian distribution (TG, LDL-cholesterol, apoB) were used to compare quantitative variables. Correlations were assessed by linear regression.

All statistical tests were two tailed and *p* values <5% were considered as significant. No type-I error rate correction was applied.

**Results**

Complete clinical and biological description of each new case is available in [Supplementary Tables 1 and 2](#).

*Classification of the patients: Mutations analysis*

*ABL patients*

**New ABL cohort:** We report 7 new cases (A1-A7) from 7 different pedigrees. The analysis of the *MTTP* gene revealed 5 new substitutions or short deletions leading to the formation of short truncated MTP protein ([Table 1](#)). A new homozygous major rearrangement (c.1068-2127\_1138 del 2198bp) was found in A5 without known consanguinity, leading to a partial deletion of intron 8 and a fraction of exon 9 (p.Pro357Phefs\*4).

**All ABL cases:** A total of 67 patients from 58 families with complete molecular diagnosis have been thus far described including 25% of compound heterozygotes; 53 different mutations have been described for these ABL patients: 45 with absence, truncated protein or abnormal C-terminal end and only 8 with missense mutations (this study, [[19-21,26-49](#)]).

*Ho-FHBL cases*

**New Ho-FHBL cases:** We report 7 new Ho-FHBL cases from 5 different pedigrees. The analysis of the *APOB* gene revealed 7 new mutations ([Table 1](#)), of which 5 led to a stop codon in the peptide signal or to a truncated apoB protein (size between 1.4 and 34.8%). 2 new missense mutations (p.C97G and p.D2182Y) located in the  $\beta$ -barrel involved in a disulfide bond [[50](#)] and were found in 2 homozygous brothers. An *in silico* study indicated that both mutations were probably damaging and low LDLc segregated with these mutations ([Supplementary Fig. 1](#)).

**All Ho-FHBL cases:** Only 41 subjects from 27 families have a complete molecular diagnosis, 35 different mutations had been

described so far: 32 with truncated proteins (from signal peptide to 89% of apoB100) and only 3 with missense mutations [[40,42,51-90](#)].

*Lipid profile and plasma vitamin E concentration*

**ABL cases:** All ABL probands exhibited typical severe hypolipidemia ([Fig. 1](#), [Table 2](#), and [Supplementary Table 3](#)). 16 ABL probands exhibited undetectable or very low levels of vitamin E (either before and/or after supplementation); only 3 patients with mild or atypical phenotype of ABL exhibited normal plasma concentration of vitamin E before and/or after supplementation (this study, [[21,29,31-34,37,38,45](#)]).

**Ho-FHBL cases:** All Ho-FHBL probands exhibited hypocholesterolemia ([Fig. 1](#), [Table 2](#), and [Supplementary Table 3](#)). However, a large range of total, HDL-cholesterol, TG and apoB concentration was observed ([Table 2](#)). Interestingly a positive correlation was observed between the size of the truncated protein, age at diagnosis, and total, LDL and HDL-cholesterol (*p*<0.01) ([Supplementary Table 4](#)). A broad range of vitamin E concentrations was observed. Normal levels before or during treatment in patients carriers of either missense mutation or truncated protein larger than 38.7% (our cohort, [[55,56,70,71,76,78,81,84,85,87,89,90](#)]) were found (data not shown).

**Comparison of ABL vs. Ho-FHBL cases:** While ABL cases presented with lower LDL-cholesterol concentrations and significantly lower TG and apoB concentrations than Ho-FHBL, both groups presented hypocholesterolemia and hypotriglyceridemia. Due to the large range of plasma lipid levels, some Ho-FHBL probands presented lipid profiles similar to ABL cases.

*Clinical data*

*Liver abnormalities*

**Our cohort of ABL cases:** Among the 7 new and 5 updated cases, all patients presented either with history of hepatomegaly and/or an increase of aminotransferases and/or steatosis (ultrasound). 3/6 had increased liver elastometry values ( $\geq 8$  kPa) ([Supplementary Tables 1, 2, and 5](#)). A liver biopsy was available in two cases (one previously published [[21](#)], and [Fig. 2](#)) and showed mild to

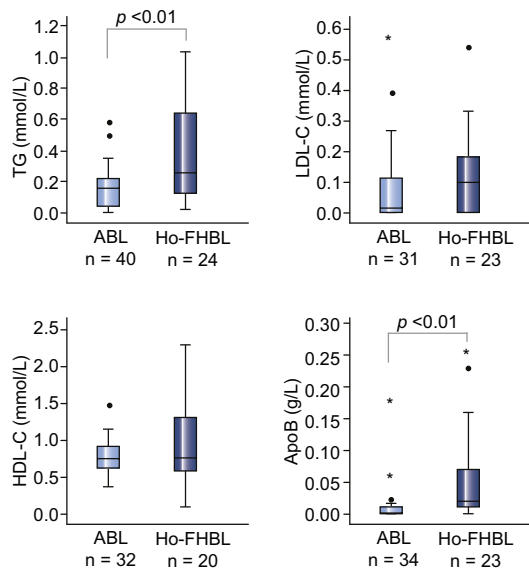
**Table 1. Gene mutations in our series of 14 patients with ABL or Ho-FHBL and the predicted size of the encoded proteins.**

Case	Gene	Status	Mutation	Protein (encoded-protein size)
A1	<i>MTTP</i>	Ho	<b>c.910-1G&gt;T</b>	<b>p.Leu304Thrfs*28</b>
A2, A3	<i>MTTP</i>	Ho	<b>c.1392delA</b>	<b>p.Glu465Argfs*13</b>
A4	<i>MTTP</i>	Ho	c.1655C>T	p.Pro552Leu
A5	<i>MTTP</i>	Ho	<b>c.1068-2127_1138 del 2198</b>	<b>p.Pro357Phefs*4</b>
A6	<i>MTTP</i>	C het	<b>c.[1A&gt;G];[2445delC]</b>	<b>p.[Met1?];[Thr816Glnfs*10]</b>
A7	<i>MTTP</i>	C het	<b>c.[154C&gt;T];[2218-2A&gt;G]</b>	<b>p.[Gln52*];[Glu740Glyfs*8]</b>
B1	<i>APOB</i>	Ho	<b>c.73delG</b>	<b>p.Ala25Profs*68</b>
B2, B3	<i>APOB</i>	Ho	<b>c.614delC</b>	<b>p.Thr205Metfs*27 (4.4%)</b>
B4	<i>APOB</i>	Ho	<b>c.4714-4715delTC</b>	<b>p.Ser1572* (34%)</b>
B5, B6	<i>APOB</i>	Ho	<b>[c.289T&gt;G;c.6544G&gt;T]</b>	<b>p.[Cys97Gly; p.Asp2182Tyr]</b>
B7	<i>APOB</i>	C het	<b>[c.2115delT];[c.4818C&gt;G]</b>	<b>p.[Phe705Leufs*30];[Tyr1606*](15.6%; 34.8%)</b>

Ho homozygous, C het compound heterozygous; in bold: new mutations.

Nucleotide numbers are derived from *APOB* cDNA sequence [Genbank NM\_000384.2] and *MTTP* cDNA [Genbank NM\_000253.2]. Amino acid sequence changes in apoB and MTP are described according to the National Center for Biotechnology Information reference sequence [NP\_000375.2 GI:105990532] and [NP\_000244.2 GI:153285408] respectively, including signal peptide (27 amino acids) for apoB.

## Research Article



**Fig. 1.** Comparison of ABL and Ho-FHBL lipid profiles of all probands.

extensive steatosis (30% of the core of all hepatocytes) with a prominent microvesicular pattern, which was mainly located in the centrilobular areas. Portal tracts were mildly expanded and inflamed. No hepatocellular ballooning, lobular inflammation or perisinusoidal fibrosis was identified. According to the NASH CRN scoring system, the score was 1 to 3 for NAFLD activity and 1c to 3 for fibrosis.

Among all the ABL patients (including the new patients), information on liver status was found in 29 patients (Table 3, Supplementary Table 5), 26 (90%) presented either hepatomegaly or increased of aminotransferases or liver steatosis (ultrasound). Liver steatosis was reported for 19 probands (31%): 7/26 children and 12/32 adult probands (mean age of adults with liver impairments:  $29 \pm 9$  years). Histological analysis of liver biopsies revealed or confirmed steatosis in all 3 additional cases. Steatosis was massive and associated with a bridging portal fibrosis in the 2 youngest cases (aged of 2 to 4), and despite a late diagnosis for two adults it was moderate with mild or no portal fibrosis in the oldest patients (Supplementary Table 5).

**Ho-FHBL cases:** Among the 7 new cases, all presented either with hepatomegaly and/or increase of aminotransferases and/or steatosis (ultrasound). 3/4 of them had liver elastometry levels consistent with significant fibrosis (15, 20,  $\geq 30$  kPa) (Supplementary Tables 1, 2, and 5). Liver biopsies were available in 3 cases. Steatosis occurred between 40 and 70% in 2 cases; according to the NASH CNR staging system, fibrosis was scored 1a (B5), 2 (B7) and 4 (B3, cirrhosis) (Figs. 3 and 4).

In all Ho-FHBL cases information on liver status was available for 25/41 patients (Table 3, Supplementary Table 5), 24/25 presented hepatomegaly or increased of aminotransferases or liver steatosis (ultrasound). Liver steatosis or cirrhosis was described for 12 probands (44%): 2/7 children, 10/20 adult probands (mean age of adults with liver impairments:  $39 \pm 12$  years). Steatosis was found in all biopsy cases except one which was performed in a hepatocellular carcinoma area. The pattern was macrovesicular or mixed. Portal fibrosis could be found early in the course of the disease and was not related to the percentage of steatosis (B2, B4, B5, B7, [68,71,75,80,88,89,91]). Liver alterations were found independent of the size of the truncation, and of mutations (missense vs. nonsense) (Supplementary Table 5).

**Comparison of ABL vs. Ho-FHBL cases:** Steatosis was observed in both groups ( $p = 0.46$ ), liver fibrosis was found in approximately 1 out of 5 Ho-FHBL and 1 out of 10 ABL probands ( $p = 0.30$ ).

In both diseases, liver abnormalities were independent of the total cholesterol (range 0.31 to 2.66 mmol/L), triglycerides ( $<0.02$  to 1.40 mmol/L) and apoB ( $<0.02$  to 0.22 g/L) levels (Table 3, Supplementary Table 5). In both diseases, liver abnormalities were also independent of the result of the fat load (Supplementary Table 5).

### Circumstances of diagnosis (age and clinical features at diagnosis)

**ABL cases:** 58 ABL probands were referred during infancy (median of age at diagnosis: 3.8 years). Most of which presented with typical features (diarrhea, failure to thrive, ataxia, retinitis pigmentosa) but six patients had either atypical signs (biological alterations or liver injury alone) or a mild phenotype [21,32–34,37,38]. ABL patients with liver injury presented either typical features or atypical phenotype.

**Ho-FHBL patients** were referred later (median of age at diagnosis: 21 years). Clinical manifestations in these 27 patients with

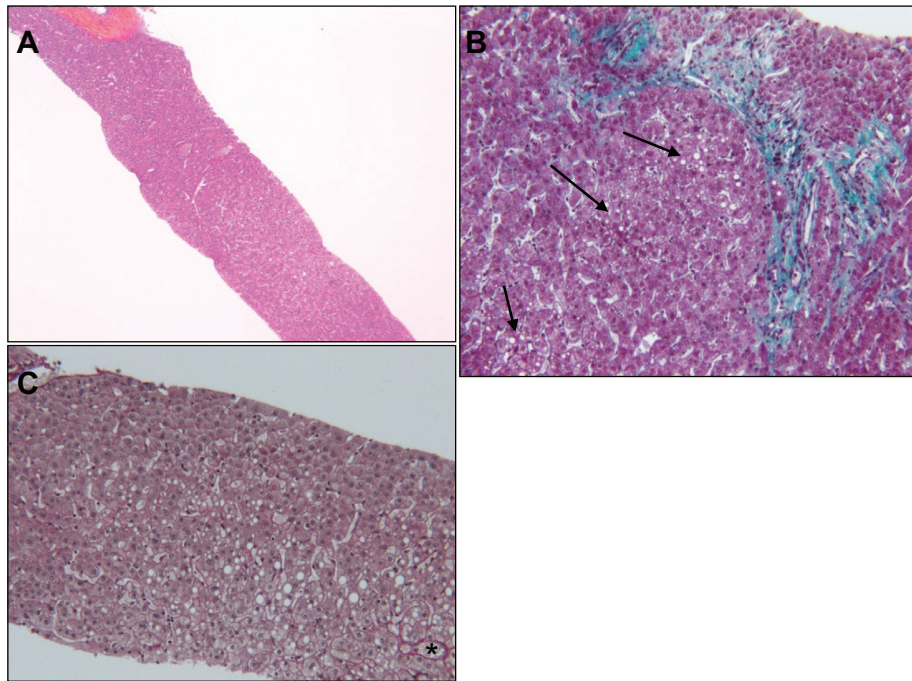
**Table 2.** Biological comparison of ABL and Ho-FHBL patients (literature and our cohort).

	All probands				p value
	ABL (n = 58)		Ho-FHBL (n = 27)		
	n	variable	n	variable	
Age at the time of lipid profil (yr)	47	4.0 [8.4-17.1]	25	21.0 [19.6-36.4]	<0.01
Total cholesterol (mmol/L)	45	0.87 [0.82-1.02]	25	0.88 [0.83-1.37]	0.22
Triglycerides (mmol/L)	40	0.09 [0.10-0.20]	24	0.23 [0.22-0.53]	<0.01
LDL-C (mmol/L)	31	<0.04* [0.03-0.13]	23	0.06 [0.04-0.18]	0.28
HDL-C (mmol/L)	32	0.71 [0.66-0.83]	20	0.77 [0.68-1.23]	0.15
ApoB (g/L)	34	<0.02* [0.001-0.023]	23	<0.02* [0.016-0.080]	
ApoA1 (g/L)	12	0.50 [0.43-0.61]	14	0.97 [0.69-1.37]	<0.01

Variable: median [95% interval of confidence].

\*Below detection threshold.

For comparison according to age, see Supplementary Table 3.



**Fig. 2. Histological features of the liver biopsy performed at the age of 14 in the updated case 3 (ABL).** (A) There is neither portal bridging fibrosis, nor diffuse steatosis. HES (hematoxylin eosin saffron) 20×. (B) A few portal tract are expanded (fibrosis score F1 according to METAVIR). Large lipid droplets (macrovesicular steatosis) are seen in some groups of hepatocytes (arrows). Masson trichrome 100×. (C) Steatosis is mainly located in centrilobular areas (\*on the central vein) with a mixed pattern (large and small lipid droplets). There is no activity, no necrosis, no perisinusoidal fibrosis. Sirius Red 100×.

**Table 3. Compilation of liver anomalies in all ABL and Ho-FHBL patients (compilation of probands + homozygous or compound heterozygous relatives).**

	ABL (n = 67)	Ho-FHBL (n = 41)	p value
Age (end of the study, yr)	21.0 [14.4-26.4] (n = 26)	28.0 [22.9-39.0] (n = 23)	0.05
BMI	20.2 [18.7-20.8] (n = 14)	25.2 [20.6-30.5] (n = 12)	0.07
Hepatomegaly			
Not found	8 (7 P + 1 AR)	5 (4 P + 1 AR)	
Presence	9 P	8 (6 P + 2 AR)	
ALT, AST, GGT:			
Normal	6 P	3 P	
Increased	17 (16 P + 1 AR)	16 (10 P + 6 AR)	
Ultrasound hyperechogenicity :			
No	0	2 P	
Observed	20 (19 P + 1 AR)	14 (11 P + 3 AR)	
Liver elastometry	6 cases (5 P, 1 AR)	4 cases (2 P, 2 AR)	
Median (kPa)	6.6	17.5	0.19
[95% CI]	[2.3-14.7]	[2.5-31.5]	
Biopsy	6 P	9 (8 P + 1 AR)	
Steatosis	6	8	
Fibrosis	4 (F1-F4)	6 (F1-F4)	
Cirrhosis/hepatocarcinoma	1	3 (2 P + 1 AR)/1P	
HOMA IR	1.7 [0.9-2.6] (n = 5)	3.8 [0.0-15.3] (n = 6)	0.19
Age at lipid profile (yr)	19.5 [13.4-25.1] (n = 26)	31.5 [21.2-39.3] (n = 22)	0.04
Total cholesterol (mmol/L)	0.98 [0.88-1.23] (n = 25)	0.93 [0.84-1.41] (n = 22)	0.73
Triglycerides (mmol/L)	0.07 [0.07-0.23] (n = 24)	0.17 [0.20-0.55] (n = 22)	<0.01

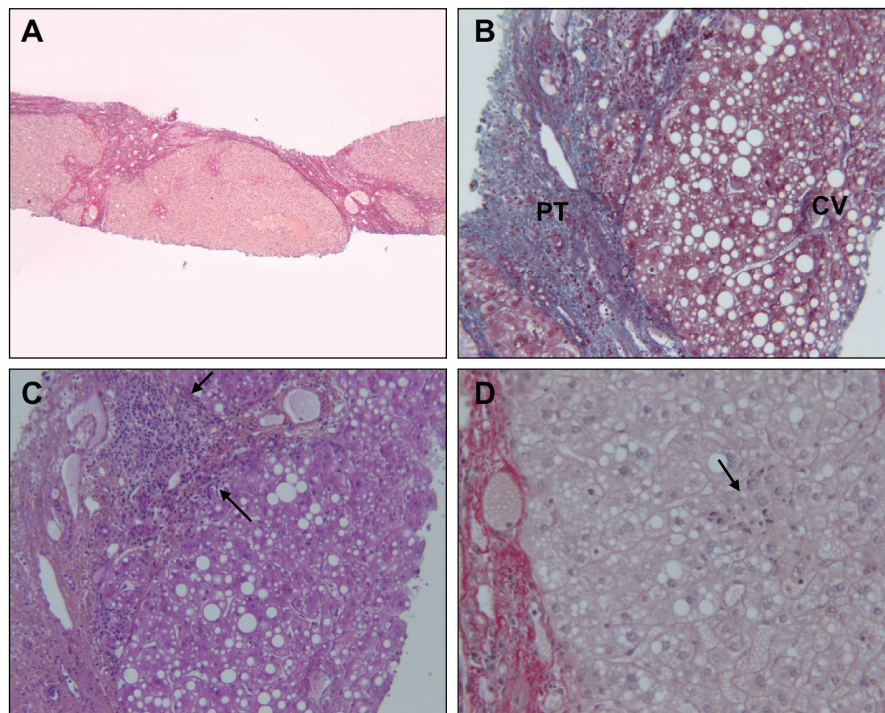
Variable: median [95% interval of confidence] or number of cases.

P, probands; AR, affected relative (ABL or Ho-FHBL).

F1 to F4: METAVIR score.



## Research Article



**Fig. 3. Histological features of the liver biopsy performed at the age of 38 in the case B2 (Ho-FHBL).** (A) Cirrhosis features of the core: liver parenchyma is subdivided into nodules due to numerous portal bridges (fibrosis score F4 according to Metavir). Sirius red 25 $\times$ . (B) Steatosis is diffuse and mixed. PT (portal tract). CV (central vein). Masson trichrome 100 $\times$ . (C) Some portal tracts are moderately inflamed with focal interface hepatitis (arrows). HES 100 $\times$ . (D) 1 focus of hepatocytes necrosis inside the lobular area (arrow). Sirius Red 200 $\times$ .

Ho-FHBL were heterogeneous. 44% had typical features (failure to thrive, diarrhea) similar to symptoms in ABL (group 1), while 24% had other clinical manifestations (group 2): vomiting, isolated hepatic complications, prominent neurological features. 32% were asymptomatic (group 3) and diagnosed in the course of another unrelated pathology, or by systematic screening. Ho-FHBL patients with liver anomalies were found in all 3 groups.

### *Evolution of thrive, body weight and occurrence of type 2 diabetes*

**ABL cases:** During adulthood these patients remained lean: 9/14 had a BMI (Body mass index) <20. Patients with liver anomalies exhibited a similar BMI (mean  $19.6 \pm 1.8$ , extreme values: 17 and 22.3). Only one case of type 2 diabetes was found in a 52 year old patient with mild atypical abetalipoproteinemia. HOMA-IR was calculated for 5 patients with liver anomalies and found increased in one of them.

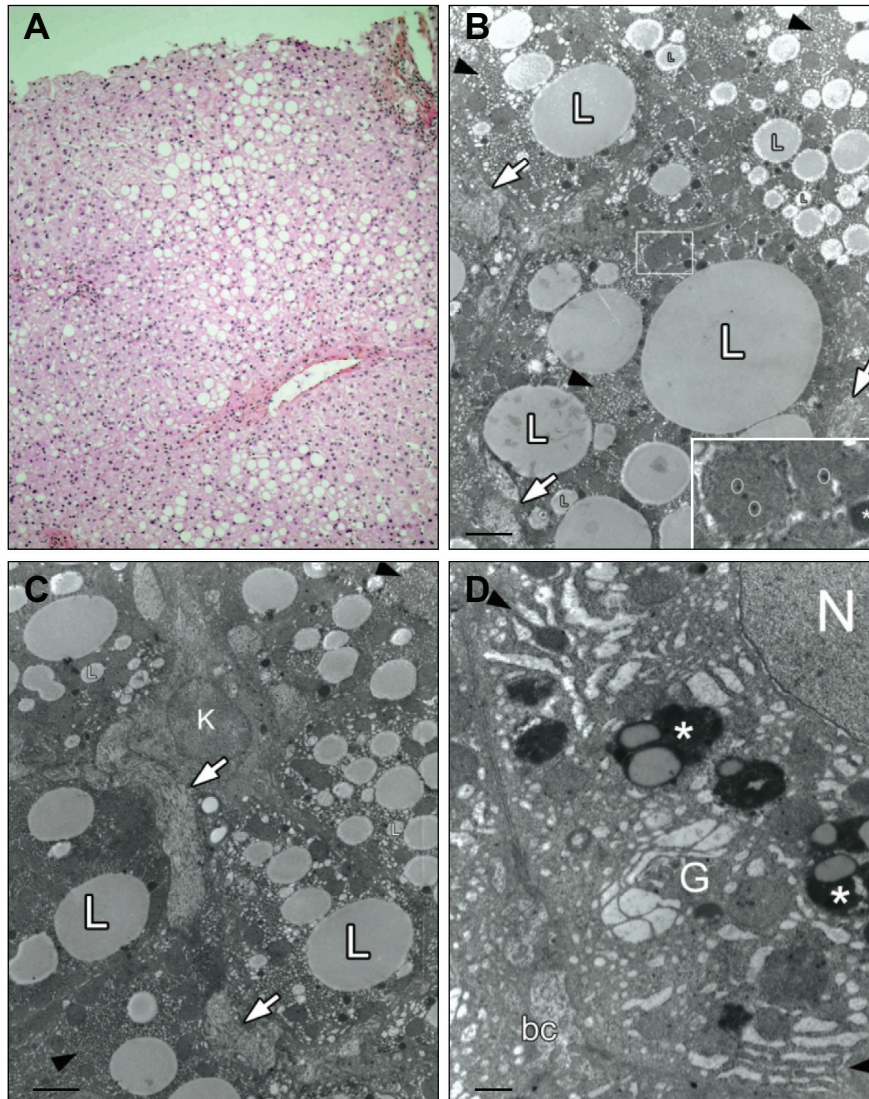
**Ho-FHBL cases:** Only one third of all Ho-FHBL probands had a report of troubles in infancy, with in that case, 80% of failure to thrive. Two patients were obese in infancy [55,87]. During adulthood, several Ho-FHBL patients were overweight (5/11: BMI 25-30), and 2/11 were obese (our cohort, [54,67,72,88,90]). Patients with liver anomalies presented with BMI between 15.9 and 41 (mean  $25.6 \pm 7.8$ ). 2 literature cases and in addition 2/7 of our Ho-FHBL cases (1 proband and 1 sibling) presented with early type 2 diabetes diagnosed before 36 years of age (B3, B5, [81,88]), all of the aforementioned presented with liver anomalies. HOMA-IR was determined for 6 patients with liver anomalies and found increased for 4 of them.

**ABL and Ho-FHBL cases:** ABL patients were much leaner than Ho-FHBL (Table 4). No overall correlation was found between HOMA IR and liver elastometry in the 9 patients who had both measurements documented. Overall the 4/5 abetalipoproteinemia patients had low HOMA-IR index and only 2 had a mild increase in liver elastometry, whereas 3 of the 4 Ho-FHBL had both an increase in HOMA-IR and liver elastometry, without obvious positive correlation within this group (see Supplementary Fig. 2).

### **Discussion**

We report the clinical phenotype (at diagnosis and during the follow-up) and the genotype of 14 new patients with ABL or Ho-FHBL and we present a review focused on liver alterations occurring in all previously described cases with molecular defect reported. Collective consideration of all ABL (67 probands + homozygous relatives) and Ho-FHBL (41 cases) provides new insights in the occurrence of liver alterations associated with a genetic defect in the assembly of TG rich lipoproteins.

Despite their scarcity, ABL and Ho-FHBL requires more thorough consideration. Although both diseases result in a lack of LDL, ABL cases were usually referred during infancy and these patients remained skinny during adulthood. Ho-FHBL patients were mostly referred at adulthood (median of age at diagnosis: 21 years) with highly heterogeneous clinical manifestations. Similarly to ABL, when truncated apoB was shorter than 34%, diagnosis was made in infancy ( $4.9 \pm 6.3$  years). When truncated apoB



**Fig. 4. Histology and ultrastructural changes of Ho-FHBL patient B7.** (A) Liver parenchyma with conserved architecture and normal portal tracts; macrovacuolar steatosis involving about 40% of hepatocytes, with centrilobular predominance; thickening of centrilobular vein walls and centrilobular perisinusoidal fibrosis; absence of significant inflammatory changes. Hematoxylin-eosin-saffron, original magnification 200 $\times$ . (B) Hepatocytes contain numerous free lipid droplets of micro- and macrovacuolar steatosis (L); endoplasmic reticulum is diffusely dilated (black arrow head); numerous calcium deposits in mitochondrial matrix (insert) as well as numerous dense bodies are visible (white star). The bar represents 2  $\mu$ m. (C) Several hepatocytes are abutting a sinusoid, viewed tangentially; a Kupffer cell (K) and portions of fenestrated endothelial cells are visible; in addition to numerous lipid droplets (L) and endoplasmic reticulum dilation visible in hepatocytes (black arrow head), note the presence of thick collagenous bands, between hepatocytes and the sinusoidal wall, confirming the existence of perisinusoidal fibrosis (white arrows, as in B). The bar represents 2  $\mu$ m. (D) Golgi cisternae are dilated (G) as well as endoplasmic reticulum (black arrow head); note the numerous dense bodies, peroxisomes and lysosomes (white stars); a slightly dilated bile canaliculus is visible (bc). The cell nucleus is labelled N. The bar represents 500 nm.

was longer than 34%, most of the patients were asymptomatic and sometimes diagnosed because of NASH related disorder. Interestingly, during adulthood, Ho-FHBL patients could be overweight with fibrosis found in patients with increased insulin resistance.

*NASH leading to fibrosis in both ABL and Ho-FHBL cases*

Hepatomegaly and abnormal LFT (ALT, AST, GGT) was present in more than 75% of cases in both conditions. On ultrasound,

suspected steatosis was reported in all ABL cases and most of Ho-FHBL cases. Through liver elastometry, pronounced fibrosis was shown in 3/4 Ho-FHBL cases (median 17.5 kPa). Liver biopsy always confirmed steatosis, with the exception of one case, and fibrosis was shown in 4/6 ABL and 6/9 Ho-FHBL with a pattern strongly reminiscent of that observed in NASH. Cirrhosis could be observed early during infancy (1 Ho-FHBL and 1 ABL patients were under 3 years old). In addition, two ‘‘ABL’’ patients, who were not included in our compilation since they were without molecular diagnosis, were previously reported to require hepatic



## Research Article

**Table 4. Clinical comparison of all ABL and Ho-FHBL patients (literature and our cohort).**

	ABL (N = 58)		All probands		p value
	n	variable	n	Ho-FHBL (N = 27) variable	
Sex (% of women)	53	49%	27	63%	0.34
Age at diagnosis (yr)	41	3.8 [5.0-11.6]	21	21.0 [14.8-35.1]	0.01
Age at the time of study (yr)	57	18.0 [15.5-23.6]	25	31.0 [23.7-39.7]	<0.01
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	15	19.7 [18.6-20.5]	11	25.3 [20.9-28.9]	0.04
Diarrhea in infancy	51	94%	15	60%	<0.01
Steatorrhea	21	76%	14	57%	0.28
Failure to thrive	24	92%	10	80%	0.56
Ophthalmological impairments	45	62%	17	18%	<0.01
Periph neurological impairments	39	54%	19	26%	0.06

Variable: percentage, median [95% interval of confidence], or number of cases. N, total number of cases; n, number of documented cases; periph, peripheral. For comparison according to age, see [Supplementary Table 6](#).

transplantation (14 and 20 years of age) [92,93]. At odds with a recent report, our findings show a progression to severe fibrosis at least in a subset of patients [94].

### *Interplay between liver abnormalities and MTP and APOB mutations*

Common SNPs in the *MTP* promoter region predispose to NASH, in the general population, by impairing TG rich lipoprotein export due to a lower transcriptional activity of *MTP* [95,96]. Moreover various studies claimed that Hz-FHBL *per se* does not lead to progressive liver disease unless associated with concurrent liver aggressions such as diabetes, obesity, and alcohol [10,97,98]. However, several arguments demonstrate the damaging role of the lack of apoB secretion *per se*: (1) In Ho-FHBL, steatosis associated with earliest stages of portal fibrosis have been found in a 10 month old boy before any interfering treatment [71,91]; (2) in Hz-FHBL, NAFLD is frequent and cases of non-alcoholic fatty liver disease (NASH), early development of liver cirrhosis leading to transplantation was reported in a patient with normal BMI [99], as well as cirrhosis in a normal weight (BMI 24 kg/m<sup>2</sup>) 27 year old adult without diabetes and alcohol consumption [100]; (3) steatosis was consistently reported in several apoB synthesis inhibitor trials and one case of liver fibrosis was reported following long term treatment with lomitapid a *MTP* inhibitor [14–17].

These reports, in addition to our findings obtained in homozygous patients, demonstrate the damaging role of hepatic TG accumulation *per se* even in the absence of oxidative stress mediated by abdominal obesity and/or diabetes.

In chow-fed ABL mice, despite marked accumulation of TG in hepatocytes, apoB does not accumulate in microsomes and ER (Endoplasmic Reticulum) and stress markers are not induced; however in experimental model, induction of liver steatosis upon MTP inhibition led to endoplasmic reticulum stress [101]. Moreover, in a cell model of apoB mutations, apoB retention in the ER and autophagy were demonstrated depending on the missense mutations. Protein retention in the ER and autophagy were commonly associated to ER stress and fibrosis development respectively [102–104]. Consequently ER stress upon misfolded apoB might be a common process in both diseases leading to fibrosis.

### *Determinants of major liver damage*

Variability in liver alteration, despite similar mechanisms, raises the question of the involvement of additional genetic and/or environmental factors.

Firstly, in this study, liver complications seem to be more frequent in the group of Ho-FHBL probands (5/27) than in the group of ABL probands (4/58) (RR 1.91 [0.97–3.79] *p* = 0.1). We cannot exclude the influence of age which was significantly higher in Ho-FHBL patients. However, portal fibrosis was described in a 10 month-old Ho-FHBL boy and 1 ABL female with fatty liver without fibrosis at 29 years of age with a late diagnosis [29,105]. Secondly, neither the nature of the mutation nor the size of the apoB truncation was closely related to hepatic injuries. In Ho-FHBL patients with liver alteration, the size of the truncated protein ranged from 2 to 87% and was found both in non-sense or missense mutation carriers. In our study, major liver alterations were found both in patients carrying truncated apoB <30% (not secreted), >30% (secreted). This finding is in accordance with previous results from Sankatsing obtained in Hz patients: in 33 patients from 4 pedigree studied, the severity of hepatic steatosis was independent of the size of the truncations [7]. Thirdly, in both diseases, the severity of the liver disease was not obviously related to the plasma concentration of total cholesterol, triglycerides and apoB levels or fat load response. Finally, the severity of the liver disease, in both diseases, was not obviously related to vitamin E plasma concentrations. Indeed, some patients presented with early fibrosis in childhood despite sub-normal plasma vitamin E concentration [29,81,105]. However, the retrospective design of the study involving a low number of patients with documented plasma vitamin E concentration precludes any reliable statistical analysis of the interaction between plasma tocopherol and the occurrence of fibrosis in both diseases.

### *Influence of overweight and diabetes*

Surprisingly, excess bodyweight or obesity occurred whatever the *APOB* mutation and even in patients who exhibited malabsorption and growth retardation in childhood (our cohort, [54,55,67,80,87]). Moreover, insulin resistance was frequent when assessed and type 2 diabetes diagnosed before 40 years

of age occurred in 3 (10%) of the all the Ho-FHBL probands (our cohort, [81]). This finding is consistent with the increased overweight prevalence previously reported in a controlled study performed in Hz-FHBL patients [5,11,13,81]. This study is the first report that provides evidence for an association between “diabesity” and Ho-FHBL. The underlying mechanism remains elusive.

Whereas genetic defect in VLDL production is likely to be a major factor of fibrosis since found in both conditions, Ho-FHBL patients who tend to have an increased prevalence of liver fibrosis exhibited a significantly higher BMI and higher HOMA-IR Index than ABL patients (63% had a BMI above 25 kg/m<sup>2</sup>).

In obese and children patients with Hz-FHBL, steatosis has been shown independently of insulin-resistance and no obvious increase in insulin resistance was observed in patient treated by mipomersen [8,11–14]. Moreover, in the general population, NAFLD was independently associated with an increased risk of incident T2DM [106]. However NAFLD was found both in ABL and Ho-FHBL whereas mostly Ho-FHBL patients were found to be obese and diabetic. A causal link with obesity and insulin-resistance remains to be clarified in Ho-FHBL patients since an incidental co heritance of both diseases cannot be excluded.

In two Ho-FHBL sisters, one (B3) with type 2 diabetes has documented metabolic cirrhosis, whereas her non-diabetic sister (B2) had a normal fibroscan 5.7 kPa. The contribution of other genetic variants involved in severe liver fibrosis may occur in addition to diabetes: B3 was found G/G carrier of *PNPLA3* rs738409 known to increased risk of advanced fibrosis, whereas B2 was found C/C (data not shown) [107].

*Screening lipid phenotype and liver diseases in the family*

Diagnosis of ABL and Ho-FHBL remains difficult due to an apparently similar phenotype. Family screening can be used to distinguish ABL (recessive disease) and Ho-FHBL (co-dominant transmission). Parents of ABL patients have mostly a normal lipid profile whereas parents of Ho-FHBL have a mild hypocholesterolemia. However, sometimes parent’s ABL proband can have low apoB, total and LDL-cholesterol whereas Hz-FHBL parents of Ho-FHBL probands unexpectedly have an almost normal lipid profile [29,32,36,42,49,80,108]. Consequently, when no mutation has been found after sequencing the first gene, the second should also be sequenced [109,110].

The identification of Ho-FHBL should lead to a cascade screening in the family since Hz-FHBL cases are mostly asymptomatic and may present severe hepatic steatosis. This condition is frequent (up to 60%) [5,9] and cases of NASH, with early development of liver cirrhosis sometimes leading to transplantation, were reported in Hz-FHBL [5,6,8,11,98,100,111]. Surprisingly, the liver status of obligate heterozygote for *MTTP* mutation has never been reported.

In conclusion, collective consideration of our new patients and all previously described ABL and Ho-FHBL patients highlights the high prevalence of NASH and related complications in both conditions. These findings emphasise the need for strict liver monitoring in these patients and their relatives with heterozygous disease and indirectly in patients treated by MTP inhibitors and apoB antisense. Our study highlights the need to consider lipid profile in any patients with NASH in order to screen for *MTTP* or *APOB* mutations in hypocholesterolemic patients. Finally, further studies are needed in order to establish how apoB mutations might contribute specifically to overweight.

**Financial support**

This work was supported by a grant of French Health ministry for rare diseases.

We thank “Fondazione Pierfranco and Luisa Mariani” Milano for their generous funding of clinical and research activities of the Metabolic Unit of the Pediatric Clinic in Monza.

**Conflict of interest**

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

**Acknowledgements**

We thank family members for their cooperation, MC Federspiel (Service de Biochimie Métabolique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) for her technical assistance, Pr E Leteurtre (Service d’Anatomopathologie, CHRU de Lille), Dr M Chevallier (Anatomopathologie, Biomnis, Lyon) and Dr O Corcos (Service de Gastroentérologie et d’Assistance Nutritive, Hôpital Beaujon, Clichy) for clinical assessment of our patient.

**Supplementary data**

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.023>.

**References**

- [1] Gutierrez-Cirlos C, Ordonez-Sanchez ML, Tusie-Luna MT, Patterson BW, Schonfeld G, Aguilar-Salinas CA. Familial hypobetalipoproteinemia in a hospital survey: genetics, metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2011;10:155–164.
- [2] Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem* 2004;50:1725–1732.
- [3] Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:515–545.
- [4] Tarugi P, Averna M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem* 2011;54:81–107.
- [5] Schonfeld G, Patterson BW, Yablonskiy DA, Tanoli TS, Averna M, Elias N, et al. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res* 2003;44:470–478.
- [6] Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, Schonfeld G. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004;45:941–947.
- [7] Sankatsing RR, Fouchier SW, de Haan S, Hutten BA, de Groot E, Kastelein JJ, et al. Hepatic and cardiovascular consequences of familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1979–1984.
- [8] Lonardo A, Lombardini S, Scaglioni F, Carulli L, Ricchi M, Ganazzi D, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance: does etiology make a difference? *J Hepatol* 2006;44:190–196.
- [9] Schonfeld G, Yue P, Lin X, Chen Z. Fatty liver and insulin resistance: not always linked. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2008;119:217–223.
- [10] Ballestri S, Lonardo A, Losi L, Pellegrini E, Bertolotti M, Loria P. Do diabetes and obesity promote hepatic fibrosis in familial heterozygous hypobetalipoproteinemia? *Intern Emerg Med* 2009;4:71–73.
- [11] Amaro A, Fabbrini E, Kars M, Yue P, Schechtman K, Schonfeld G, et al. Dissociation between intrahepatic triglyceride content and insulin resis-



## Research Article

- tance in familial hypobetalipoproteinemia. *Gastroenterology* 2010;139:149–153.
- [12] Della Corte C, Fintini D, Giordano U, Cappa M, Brufani C, Majo F, et al. Fatty liver and insulin resistance in children with hypobetalipoproteinemia: the importance of aetiology. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;79:49–54.
- [13] Visser ME, Lammers NM, Nederveen AJ, van der Graaf M, Heerschap A, Ackermans MT, et al. Hepatic steatosis does not cause insulin resistance in people with familial hypobetalipoproteinemia. *Diabetologia* 2011;54:2113–2121.
- [14] Visser ME, Wagener G, Baker BF, Geary RS, Donovan JM, Beuers UH, et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, lowers low-density lipoprotein cholesterol in high-risk statin-intolerant patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J* 2012;33:1142–1149.
- [15] Sacks FM, Stanesa M, Hegele RA. Severe hypertriglyceridemia with pancreatitis: thirteen years' treatment with lomitapide. *JAMA Intern Med* 2014;174:443–447.
- [16] Visser ME, Akdim F, Tribble DL, Nederveen AJ, Kwoh TJ, Kastelein JJ, et al. Effect of apolipoprotein-B synthesis inhibition on liver triglyceride content in patients with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2010;51:1057–1062.
- [17] Stein EA, Dufour R, Gagne C, Gaudet D, East C, Donovan JM, et al. Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2012;126:2283–2292.
- [18] Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999–1001.
- [19] Rehberg EF, Samson-Bouma ME, Kienzle B, Blinderman L, Jamil H, Wetterau JR, et al. A novel abetalipoproteinemia genotype. Identification of a missense mutation in the 97-kDa subunit of the microsomal triglyceride transfer protein that prevents complex formation with protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1996;271:29945–29952.
- [20] Chardon L, Sassolas A, Digeon B, Michel-Calemard L, Bovier-Lapierre M, Moulin P, et al. Identification of two novel mutations and long-term follow-up in abetalipoproteinemia: a report of four cases. *Eur J Pediatr* 2009;168:983–989.
- [21] Di Filippo M, Crehalet H, Samson-Bouma ME, Bonnet V, Aggerbeck LP, Rabes JP, et al. Molecular and functional analysis of two new MTTP gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2012;53:548–555.
- [22] Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnett D, et al. Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab* 2008;93:74–84.
- [23] Kane JP, Hardman DA, Paulus HE. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2465–2469.
- [24] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
- [25] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
- [26] Illingworth DR, Connor WE, Lin DS, Diliberti J. Lipid metabolism in abetalipoproteinemia: a study of cholesterol absorption and sterol balance in two patients. *Gastroenterology* 1980;78:68–75.
- [27] Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, et al. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature* 1993;365:65–69.
- [28] Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, et al. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet* 1993;2:2109–2116.
- [29] Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, et al. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;57:1298–1310.
- [30] Heath KE, Luong LA, Leonard JV, Chester A, Shoulders CC, Scott J, et al. The use of a highly informative CA repeat polymorphism within the abetalipoproteinemia locus (4q22–24). *Prenat Diagn* 1997;17:1181–1186.
- [31] Yang XP, Inazu A, Yagi K, Kajinami K, Koizumi J, Mabuchi H. Abetalipoproteinemia caused by maternal isodisomy of chromosome 4q containing an intron 9 splice acceptor mutation in the microsomal triglyceride transfer protein gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1950–1955.
- [32] Ohashi K, Ishibashi S, Osuga J, Tozawa R, Harada K, Yahagi N, et al. Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2000;41:1199–1204.
- [33] Wang J, Hegele RA. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene mutations in Canadian subjects with abetalipoproteinemia. *Hum Mutat* 2000;15:294–295.
- [34] Al-Shali K, Wang J, Rosen F, Hegele RA. Ileal adenocarcinoma in a mild phenotype of abetalipoproteinemia. *Clin Genet* 2003;63:135–138.
- [35] Berthier MT, Couture P, Houde A, Paradis AM, Sammak A, Verner A, et al. The c.419-420insA in the MTP gene is associated with abetalipoproteinemia among French-Canadians. *Mol Genet Metab* 2004;81:140–143.
- [36] Di Leo E, Lancellotti S, Penacchioni JY, Cefalu AB, Averna M, Pesciotta L, et al. Mutations in MTP gene in abeta- and hypobeta-lipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2005;180:311–318.
- [37] Al-Mahdili HA, Hooper AJ, Sullivan DR, Stewart PM, Burnett JR. A mild case of abetalipoproteinemia in association with subclinical hypothyroidism. *Ann Clin Biochem* 2006;43:516–519.
- [38] Sakamoto O, Abukawa D, Takeyama J, Arai N, Nagano M, Hattori H, et al. An atypical case of abetalipoproteinemia with severe fatty liver in the absence of steatorrhea or acanthocytosis. *Eur J Pediatr* 2006;165:68–70.
- [39] Benayoun L, Granot E, Rizel L, Allon-Shalev S, Behar DM, Ben-Yosef T. Abetalipoproteinemia in Israel: evidence for a founder mutation in the Ashkenazi Jewish population and a contiguous gene deletion in an Arab patient. *Mol Genet Metab* 2007;90:453–457.
- [40] Vongsuvan R, Hooper AJ, Coakley JC, Macdessi JS, O'Loughlin EV, Burnett JR, et al. Novel mutations in abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:990.
- [41] Zamel R, Khan R, Pollex RL, Hegele RA. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:19.
- [42] Najah M, Di Leo E, Awatef J, Magnolo L, Imene J, Pinotti E, et al. Identification of patients with abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia in Tunisia. *Clin Chim Acta* 2009;401:51–56.
- [43] Uslu N, Gurakan F, Yuce A, Demir H, Tarugi P. Abetalipoproteinemia in an infant with severe clinical phenotype and a novel mutation. *Turk J Pediatr* 2010;52:73–77.
- [44] Aminoff A, Gunnar E, Barbaro M, Mannila MN, Duponchel C, Tosi M, et al. Novel mutations in microsomal triglyceride transfer protein including maternal uniparental disomy in two patients with abetalipoproteinemia. *Clin Genet* 2011;82:197–200.
- [45] Pons V, Rolland C, Nauze M, Danjoux M, Gaibelet G, Durandy A, et al. A severe form of abetalipoproteinemia caused by new splicing mutations of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP). *Hum Mutat* 2011;32:751–759.
- [46] Sani MN, Sabbaghian M, Mahjoob F, Cefalu AB, Averna MR, Rezaei N. Identification of a novel mutation of MTP gene in a patient with abetalipoproteinemia. *Ann Hepatol* 2011;10:221–226.
- [47] Khatun I, Walsh MT, Hussain MM. Loss of both phospholipid and triglyceride transfer activities of microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2013;54:1541–1549.
- [48] Magnolo L, Najah M, Fancello T, Di Leo E, Pinotti E, Brini I, et al. Novel mutations in SAR1B and MTTP genes in Tunisian children with chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia. *Gene* 2013;512:28–34.
- [49] Mohamed N, Mohamed Youssef S, Mohamed Yahia H, Afef S, Awatef J, Saber H, et al. Molecular characterization of Tunisian families with abetalipoproteinemia and identification of a novel mutation in MTTP gene. *Diagn Pathol* 2013;8:54.
- [50] Yang CY, Kim TW, Weng SA, Lee BR, Yang ML, Gotto Jr AM. Isolation and characterization of sulfhydryl and disulfide peptides of human apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5523–5527.
- [51] Salt HB, Wolff OH, Lloyd JK, Fosbrooke AS, Cameron AH, Hubble DV. On having no beta-lipoprotein. A syndrome comprising a-beta-lipoproteinemia, acanthocytosis, and steatorrhea. *Lancet* 1960;2:325–329.
- [52] Biemer JJ, McCammon RE. The genetic relationship of abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia: a report of the occurrence of both diseases within the same family. *J Lab Clin Med* 1975;85:556–565.
- [53] Illingworth DR, Connor WE, Buist NR, Jhaveri BM, Lin DS, McMurry MP. Sterol balance in abetalipoproteinemia: studies in a patient with homozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Metabolism* 1979;28:1152–1160.
- [54] Steinberg D, Grundy SM, Mok HY, Turner JD, Weinstein DB, Brown WV, et al. Metabolic studies in an unusual case of asymptomatic familial hypobetalipoproteinemia with hypoalphalipoproteinemia and fasting chylomicronemia. *J Clin Invest* 1979;64:292–301.

- [55] Malloy MJ, Kane JP, Hardman DA, Hamilton RL, Dalal KB. Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. Absence of the B-100 apolipoprotein. *J Clin Invest* 1981;67:1441-1450.
- [56] Berger GM, Brown G, Henderson HE, Bonnici F. Apolipoprotein B detected in the plasma of a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia: implications for aetiology. *J Med Genet* 1983;20:189-195.
- [57] Takashima Y, Kodama T, Iida H, Kawamura M, Aburatani H, Itakura H, et al. Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia in infancy: an isolated apolipoprotein B-100 deficiency. *Pediatrics* 1985;75:541-546.
- [58] Young SG, Bertics SJ, Curtiss LK, Dubois BW, Witztum JL. Genetic analysis of a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. Evidence for two separate gene defects: one associated with an abnormal apolipoprotein B species, apolipoprotein B-37; and a second associated with low plasma concentrations of apolipoprotein B-100. *J Clin Invest* 1987;79:1842-1851.
- [59] Young SG, Bertics SJ, Curtiss LK, Witztum JL. Characterization of an abnormal species of apolipoprotein B, apolipoprotein B-37, associated with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1987;79:1831-1841.
- [60] Young SG, Peralta FP, Dubois BW, Curtiss LK, Boyles JK, Witztum JL. Lipoprotein B37, a naturally occurring lipoprotein containing the amino-terminal portion of apolipoprotein B100, does not bind to the apolipoprotein B, E (low density lipoprotein) receptor. *J Biol Chem* 1987;262:16604-16611.
- [61] Collins DR, Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Robertson S, et al. Truncated variants of apolipoprotein B cause hypobetalipoproteinemia. *Nucleic Acids Res* 1988;16:8361-8375.
- [62] Ross RS, Gregg RE, Law SW, Monge JC, Grant SM, Higuchi K, et al. Homozygous hypobetalipoproteinemia: a disease distinct from abetalipoproteinemia at the molecular level. *J Clin Invest* 1988;81:590-595.
- [63] Young SG, Northey ST, McCarthy BJ. Low plasma cholesterol levels caused by a short deletion in the apolipoprotein B gene. *Science* 1988;241:591-593.
- [64] Harano Y, Kojima H, Nakano T, Harada M, Kashiwagi A, Nakajima Y, et al. Homozygous hypobetalipoproteinemia with spared chylomicron formation. *Metabolism* 1989;38:1-7.
- [65] Huang LS, Ripps ME, Korman SH, Deckelbaum RJ, Breslow JL. Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem* 1989;264:11394-11400.
- [66] Krul ES, Kinoshita M, Talmud P, Humphries SE, Turner S, Goldberg AC, et al. Two distinct truncated apolipoprotein B species in a kindred with hypobetalipoproteinemia. *Arteriosclerosis* 1989;9:856-868.
- [67] Talmud P, King-Underwood L, Krul E, Schonfeld G, Humphries S. The molecular basis of truncated forms of apolipoprotein B in a kindred with compound heterozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1989;30:1773-1779.
- [68] Gay G, Pessah M, Bouma ME, Roche JF, Aymard JP, Beucler I, et al. Familial hypobetalipoproteinemia. Familial study of 4 cases. *Rev Med Interne* 1990;11:273-279.
- [69] Tennyson GE, Gabelli C, Baggio G, Bilato C, Brewer Jr HB. Molecular defect in the apolipoprotein B gene in a patient with hypobetalipoproteinemia and three distinct ApoB species. *Clin Res* 1990;38:482.
- [70] Hardman DA, Pullinger CR, Hamilton RL, Kane JP, Malloy MJ. Molecular and metabolic basis for the metabolic disorder normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1991;88:1722-1729.
- [71] Huang LS, Kayden H, Sokol RJ, Breslow JL. ApoB gene nonsense and splicing mutations in a compound heterozygote for familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1991;32:1341-1348.
- [72] Gabelli C. The lipoprotein metabolism of apolipoprotein B mutants. *Curr Opin Lipidol* 1992;3:208-214.
- [73] Linton MF, Pierotti V, Young SG. Reading-frame restoration with an apolipoprotein B gene frameshift mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11431-11435.
- [74] Pullinger CR, Hillas E, Hardman DA, Chen GC, Naya-Vigne JM, Iwasa JA, et al. Two apolipoprotein B gene defects in a kindred with hypobetalipoproteinemia, one of which results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL. *J Lipid Res* 1992;33:699-710.
- [75] Scoazec JY, Bouma ME, Roche JF, Blache D, Verthier N, Feldmann G, et al. Liver fibrosis in a patient with familial homozygous hypobetalipoproteinemia: possible role of vitamin supplementation. *Gut* 1992;33:414-417.
- [76] Burnett JR, Proos AL, Koutts J, Burnett L. Familial hypobetalipoproteinemia: a rare presentation to the lipid clinic. *Med J Aust* 1993;159:272-274.
- [77] Talmud PJ, Krul ES, Pessah M, Gay G, Schonfeld G, Humphries SE, et al. Donor splice mutation generates a lipid-associated apolipoprotein B-27.6 in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1994;35:468-477.
- [78] Young SG, Bihain B, Flynn LM, Sanan DA, Ayrault-Jarrier M, Jacotot B. Asymptomatic homozygous hypobetalipoproteinemia associated with apolipoprotein B45.2. *Hum Mol Genet* 1994;3:741-744.
- [79] Welty FK, Ordovas J, Schaefer EJ, Wilson PW, Young SG. Identification and molecular analysis of two apoB gene mutations causing low plasma cholesterol levels. *Circulation* 1995;92:2036-2040.
- [80] Gabelli C, Bilato C, Martini S, Tennyson GE, Zech LA, Corsini A, et al. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia. Increased LDL catabolism in hypobetalipoproteinemia due to a truncated apolipoprotein B species, Apo B-87Padova. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1189-1196.
- [81] Ohashi K, Ishibashi S, Yamamoto M, Osuga J, Yazaki Y, Yukawa S, et al. A truncated species of apolipoprotein B (B-38.7) in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia associated with diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1330-1334.
- [82] Welty FK, Guida KA, Andersen JJ. Donor splice-site mutation (210+1G\_C) in the ApoB gene causes a very low level of ApoB-100 and LDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1864-1865.
- [83] Hegele RA, Miskie BA. Acanthocytosis in a patient with homozygous familial hypobetalipoproteinemia due to a novel APOB splice site mutation. *Clin Genet* 2002;61:101-103.
- [84] Burnett JR, Shan J, Miskie BA, Whitfield AJ, Yuan J, Tran K, et al. A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia. *J Biol Chem* 2003;278:13442-13452.
- [85] Whitfield AJ, Marais AD, Robertson K, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Four novel mutations in APOB causing heterozygous and homozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Hum Mutat* 2003;22:178.
- [86] Fouchier SW, Sankatsing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Alonso R, et al. High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J Med Genet* 2005;42:e23.
- [87] Homer VM, George PM, du Toit S, Davidson JS, Wilson CJ. Mental retardation and ataxia due to normotriglyceridemic hypobetalipoproteinemia. *Ann Neurol* 2005;58:160-163.
- [88] Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, Bourbon M, Carmo Pereira S, Pirisi M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet* 2008;74:267-273.
- [89] Katsuda S, Kawashiri MA, Inazu A, Tada H, Tsuchida M, Kaneko Y, et al. Apolipoprotein B gene mutations and fatty liver in Japanese hypobetalipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 2009;399:64-68.
- [90] Gangloff A, Bergeron J, Couture P, Martins R, Hegele RA, Gagne C. A novel mutation of apolipoprotein B in a French Canadian family with homozygous hypobetalipoproteinemia. *J Clin Lipidol* 2011;5:414-417.
- [91] Partin JS, Partin JC, Schubert WK, McAdams AJ. Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: evolution of micronodular cirrhosis. *Gastroenterology* 1974;67:107-118.
- [92] Black DD, Hay RV, Rohwer-Nutter PL, Ellinas H, Stephens JK, Sherman H, et al. Intestinal and hepatic apolipoprotein B gene expression in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology* 1991;101:520-528.
- [93] Braegger CP, Belli DC, Mentha G, Steinmann B. Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinemia after liver transplantation. *Eur J Pediatr* 1998;157:576-578.
- [94] Lee J, Hegele RA. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J Inher Metab Dis* 2014;37:333-339.
- [95] Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, Nitz I, Helwig U, Folsch UR, et al. Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene. *Hum Mutat* 2008;29:123-129.
- [96] Peng XE, Wu YL, Lu QQ, Hu ZJ, Lin X. MTTP polymorphisms and susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease in a Han Chinese population. *Liver Int* 2014;34:118-128.
- [97] Lonardo A, Tarugi P, Ballarini G, Bagni A. Familial heterozygous hypobetalipoproteinemia, extrahepatic primary malignancy, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1998;43:2489-2492.
- [98] Heeks LV, Hooper AJ, Adams LA, Robbins P, Barrett PH, van Bockxmeer FM, et al. Non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis in a patient with APOB L343V familial hypobetalipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 2013;421:121-125.
- [99] Durrington PN, Charlton-Menys V, Packard CJ, Caslake MJ, Wang J, Bhatnagar D, et al. Familial hypobetalipoproteinemia due to a novel early stop mutation. *J Clin Lipidol* 2008;2:384-390.
- [100] Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel MC, et al. Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:104-108.

## Research Article

- [101] Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res* 2003;44:978–985.
- [102] Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012;142:938–946.
- [103] Lee JS, Zheng Z, Mendez R, Ha SW, Xie Y, Zhang K. Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett* 2012;211:29–38.
- [104] Zhong S, Magnolo AL, Sundaram M, Zhou H, Yao EF, Di Leo E, et al. Nonsynonymous mutations within APOB in human familial hypobetalipoproteinemia: evidence for feedback inhibition of lipogenesis and postendoplasmic reticulum degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 2010;285:6453–6464.
- [105] Dullaart RP, Speelberg B, Schuurman HJ, Milne RW, Havekes LM, Marcel YL, et al. Epitopes of apolipoprotein B-100 and B-48 in both liver and intestine. Expression and evidence for local synthesis in recessive abetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1986;78:1397–1404.
- [106] Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:330–344.
- [107] Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:325–334.
- [108] Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000;20:663–697.
- [109] Burnett JR, Bell DA, Hooper AJ, Hegele RA. Clinical utility gene card for: abetalipoproteinemia. *Eur J Hum Genet* 2012;20. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.30>.
- [110] Burnett JR, Bell DA, Hooper AJ, Hegele RA. Clinical utility gene card for: familial hypobetalipoproteinemia (APOB). *Eur J Hum Genet* 2012;20. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.85>.
- [111] Tarugi P, Lonardo A. Heterozygous familial hypobetalipoproteinemia associated with fatty liver. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1400–1402.

Supplementary data to:

**Hepatic steatosis and fibrosis despite metabolic differences in  
congenital hypocholesterolemia due to homozygous *MTTP* and *APOB*  
mutations**

Mathilde Di Filippo, Philippe Moulin, Pascal Roy, Marie Elisabeth Samson-Bouma, Sophie Collardeau-Frachon, Sabrina Chebel-Dumont, Noël Peretti, Jérôme Dumortier, Fabien Zoulim, Thierry Fontanges, Rossella Parini, Miriam Rigoldi, Francesca Furlan, Grazia Mancini, Dominique Bonnefont-Rousselot, Eric Bruckert, Jacques Schmitz, Jean Yves Scoazec, Sybil Charrière, Sylvie Villar-Fimbel, Frederic Gottrand, Béatrice Dubern, Diane Doummar, Francesca Joly, Marie Elisabeth Liard-Meillon, Alain Lachaux, Agnès Sassolas

## Supplementary Tables

### Supplementary Table 1. Clinical description of the cases.

Supplementary Table 1A: Clinical description of our ABL cases.

case/ sex	age (dg or study)	digestive imp	steator rhea	FTT	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HMG	steatosis	Liver elasto- metry kPa	ophtalmo imp	neuro imp	other diseases
<b>A1</b> /F	5 <sup>£</sup>	malabsor p-tion	11g/24h	+		0			normal (fundus)	loss of tendon reflexes, ataxia	osteoporosis
	21	0				0			bilateral chorioretinal degene- rescence	areflexia	
	40	+			20.3	0	+ (U)	3.7	major chorio- retinal atrophia	EMG: normal areflexia	compressive epidermoid cyst of the pineal region
<b>A2</b> /F	19	diarrhea		+	16.2	+			visual imp	tremor (hands, head)	
	37					+					
<b>A3</b> /M	1.5	diarrhea	+	+			+, massive			psychomotor retardation	
	24	resolved by ttmt			20.3	+	+, massive		hypovoltage (left)	ataxia, mental retardation (IQ 80)	
<b>A4</b> /F	0.3	abdominal distension		+		+	+, moderate				
	1.0										
<b>A5</b> /F	14	diarrhea	+	+						achieving deep sensitivity + cerebellar imp	
	44				17		+ (U)	10.4 (mild fibrosis)	retinal degeneration	moderate ataxia	cardiomyopathy osteopenia
	48				18	0	+/- (U)	20.0			cardiac insuffisancy (death at 49y of age)
<b>A6</b> /F	2.5	vo	+	+		+	+, massive		0 (VEP, ERG)	0	
	19	resolved by ttmt			19.1	+	+, massive		0	0	
<b>A7</b> /F	2.5	diarrhea									

age (years); B, biopsy; d, day; dg, diagnosis; ERG, electroretinogram; FTT failure to thrive; HMG, hepatomegaly; imp, impairment; IQ, intellectual quotient; VEP, visual evoked potentials ; vo, vomiting; ttmt, treatment; U, ultrasound; +, presence; 0, absence.

£: clinical description and lipid profil at 5 years of age previously described without molecular diagnosis in Bouma ME, Beucler I, Pessah M, Heinzmann C, Lusi AJ, Naim HY, et al. Description of two different patients with abetalipoproteinemia, synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture. J Lipid Res 1990;31,1-15.

**Supplementary Table 1B. Clinical description of our Ho-FHBL cases.**

case/ sex	age (dg or study)	digestive imp	steator rhea	FTT	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HMG	steatosis	liver elasto- metry kPa	ophthalmo imp	neuro imp	other diseases
<b>B1</b> <b>/M</b>	2 month	vo	+	+		0	0 (U)		normal (fundus)	normal tendon reflexes	facial dysmorphism (plagiocephalia)
	3.2 years	0 with diet		0		0			normal (fundus, ERG)	normal tendon reflexes	minor facial dysmorphism
<b>B2</b> <b>/F</b>	4	diarrhea + abdominal distension		+		0	0		strabismus, normal ERG	psychomotor retardation	facial dysmorphism, hyperpilosity
	38	resolved by low fat diet			29		+ (U)	8,2 (36y) 7.0 (37y) 5.7 (38y)	retinitis pigmentosa	0	hirsutism, infertility
	41				28		+ (U)				
<b>B3</b> <b>/F</b>	5	abdominal distension		+					abnormal ERG	mental retardation (IQ 77 at 2 years of age)	facial dysmorphism, hyperpilosity
	40	resolved by low fat diet			22.7	+	+ (B)	50 (cirrhosis + portal hypertens)	retinitis pigmentosa	0	D2, infertility
	42					+					
<b>B4</b> <b>/M</b>	<1 month	vo + abdominal distension		+		+	?	NA	doubt on the quality of eye tracking	normal tendon reflexes	IUGR, mental retardation, microcephalia
	7	0				0	+ (U)	NA	0	mental retardation	
	10	0					NA	NA	0 (ERG)	mental retardation	microcephalia early pruberty
<b>B5</b> <b>/M</b>	21	NA					NA	NA	NA	NA	
	28	diarrhea when fat diet			36	+	+ , 80% (B)	15 (sever fibrosis) biopsy: stade2 fibrosis (Brunt)			D2 since 23 years of age
<b>B6</b> <b>/M</b>	16	NA					?		NA	NA	
	21	diarrhea when fat diet			41	+	+ (U)	20 (sever fibrosis)	normal (ERG)	0	hypothyroidism, acanthosis nigricans
<b>B7</b> <b>/F</b>	7	vo, no diarrhea		+		+	+	NA			Thrombopenia
	28-29	vo, lipid mal- absorption			17.5	+	+ (S,U), + (B, at 29y of age)	NA	normal (fundus)	normal (tendon reflexes, EMG)	Thrombopenia
	35	vo			15.9		+ , 30%	NA	0	0	Thrombopenia

age (years); B, biopsy; d, day; dg, diagnosis; D2, diabetes; ERG, electroretinogram; F, female; FTT failure to thrive; HMG, hepatomegaly; imp, impairment; IQ, intellectual quotient; IUGR intra-uterine growth retardation; M, male; NA, not available; S, scanner; U, ultrasound, VEP, visual evoked potentials ; vo, vomiting; tmt, treatment; +, presence; 0, absence.



**Supplementary Table 2. Biological description of the cases.**

**Supplementary Table 2A. Biological description of our ABL cases.**

case / sex	age (dg or study)	vitE (µmol/L)	vitA (µmol/L)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoB (g/L)	apoA1 (g/L)	intestinal biopsy
<b>A1</b> /F	5 <sup>£</sup>	0.13				1.19	0.1			<0.01		white stippling-like hoar frosting covering the mucosa, lipid inclusion
	21	7.5				1.4	0.03	0.14	1.25	0		white stippling-like hoar frosting covering the mucosa, lipid inclusion
	41	12.8*	1.69*	61	40	1.41	<0.08	NA	0.93	NA	NA	white mucosa, lipid inclusion
<b>A2</b> /F	19					1.24	0.09		NA	<0.04		
	37				N	1.53	0.10			0.01		
<b>A3</b> /M	1.5	<1				0.54	0.08	NA	NA			
	24			36		0.64	0.13	NA	NA			
<b>A4</b> /F	0.3					1.14	0.01	NA	NA	0.01		
	1.0			125		0.98	0.01		0.80	0.00		
<b>A5</b> /F	14					0.77	0.03	0	0.76	<0.03		
	44											
	48					0.65	0.07			<0.03		
<b>A6</b> /F	2.5					0.62	0.01	NA	NA	NA		
	19			88		0.54	0.02			0.00		
<b>A7</b> /F	2.5	<1			100	0.5	0.5		NA	0.01		

apo, apolipoprotein; dg, diagnosis; NA, not available; HDLC, HDL cholesterol; LDLC, LDL cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; vit, vitamin; \* with supplementation

£, clinical description and lipid profil at 5 years of age previously described in Bouma ME, Beucler I, Pessah M, Heinzmann C, Lusic AJ, Naim HY, et al. Description of two different patients with abetalipoproteinemia, synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture. J Lipid Res 1990;31,1-15.

**Supplementary Table 2B. Biological description of our Ho-FHBL cases.**

case / sex	age (dg or study)	vitE (µmol/L)	vitA (µmol/L)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoB (g/L)	apoA1 (g/L)	intestinal biopsy
<b>B1 /M</b>	2month	2.2*	3.8*	76	66	0.88	0.02	0.15	0.72	0.01	0.57	white mucosa, vacuolisation, no intestinal atrophy
	2.75 y	2.7*	2.2*	51	49	0.7	0.34	ND	ND	ND	ND	
<b>B2 /F</b>	4	5.6 (7.8*)	0.90	35	48	0.72	0.1	ND	ND	ND		lipid inclusion in épithelium villosity
	38	1.4		37	38	0.64	0.04	0.08	0.54	<0.03		
	41			78	99	0.72	0.06		0.70	<0.03		
<b>B3 /F</b>	5	11.1 (19.9*)	0.50	60	100	0.78	0.06	ND	ND	ND		lipid inclusion
	40	0.55		23	36	0.93	0.1		0.93	<0.03	0.66	
				23	36							
<b>B4 /M</b>	<1month	6.96	2.50	11	25	1.3	0.2	NA	NA	0.35	0.69	white mucosa, lipid inclusion, partial villos atrophy
	7	8.35	1.61	354	47	0.67	0.13	0.13	0.49	0.10		
	10	4.6	1,17			0.54	0.1	0.11	0.39	0.10	0.39	
<b>B5 /M</b>	21	6.4	1.2	59		0.84	0.19	0.12	0.65	0.05		NA
	27			13	42	0.83	0.15	0.06	0.7		0.9	
<b>B6 /M</b>	16	7	1.1	106		0.84	0.29	0.01	0.72	0.09		NA
	21			86	67	0.74	0.18	0.07	0.59	<0.03		
<b>B7 /F</b>	7											
	29	8.4				0.84	0.15	0.06	0.72	0.02		lipid inclusions, no assembly of LpB
	35	4.1		N	N	0.93	0.48					

apo: apolipoprotein; dg: diagnosis; NA: not available; HDLC: HDL cholesterol; LDLC: LDL cholesterol; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; vit: vitamin; \* with supplementation

Supplementary Table 3. Lipid profile at childhood or adulthood.

	Children probands				Adults probands				
	ABL (N=30)		Ho-FHBL (N=9)		ABL (N=28)		Ho-FHBL (N=18)		
	n	Median, n	Median, %, nb of cases	<i>P</i> value	n	Median, %, nb of cases	n	Median, %, nb of cases	<i>P</i> value
<b>age at the time of lipid dosages</b>	24	7	7.0 [1.7-11.8]	0.07	15	32 [26.7-37.0]	15	48 [33.4-49.4]	0.07
Total Cholesterol (mmol/L)	22	7	0.82 [0.49-0.93]	0.56	15	0.87 [0.78-1.03]	15	1.02 [0.93-1.74]	0.21
<b>Triglycerides (mmol/L)</b>	22	7	0.22 [-0.08-0.79]	0.29	10	0.06 [0.01-0.26]	14	0.43 [0.24-0.64]	<b>0.01</b>
LDL-C (mmol/L)	15	6	<0.04*	0.90	13	<0.04*	14	0.10 [0.05-0.27]	0.11
HDL-C (mmol/L)	16	4	0.61 [0.00-1.12]	0.73	14	0.73 [0.66-0.85]	13	1.02 [0.73-1.51]	0.28
<b>apoB (g/L)</b>	21	6	<0.02*	<0.02*	9	<0.02*	14	0.040 [0.019-0.102]	<b>0.03</b>
<b>apoA1 (g/L)</b>	8	2	0.47 [0.40-0.61]	0.43 (ND)	2	0.43 (ND)	11	1.25 [0.80-1.56]	ND

\*Below detection threshold variable: median [95% interval of confidence]; ND, not determined.

**Supplementary Table 4. Impact of the size of the truncated protein in homozygous FHBL probands (n=17).**

	n	A 1% increase of the size of the truncated apo B correlates with	<i>p</i> value
<b>age at diagnosis (y)</b>	12	+ 0.5	<b>&lt;0.01</b>
<b>age at the time of study (y)</b>	15	+ 0.35	<b>0.063</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	6	- 0.051	0.396
<b>Total Cholesterol (mmol/L)</b>	15	+ 0.022	<b>&lt;0.01</b>
<b>LDL Cholesterol (mmol/L)</b>	12	+ 0.003	<b>&lt;0.01</b>
<b>HDL Cholesterol (mmol/L)</b>	11	+ 0.020	<b>&lt;0.01</b>
Triglycerides (mmol/L)	15	+ 0.003	0.182
apoB (g/L)	13	+ 0.001	0.246

Supplementary Table 5. Features of ABL and Ho-FHBL patients with history of hepatomegaly, biology, imagery and liver biopsies.

Ref	P/ AR	dis- ease	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Sex	Age £	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver explora- tion	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NSH CNR scoring		Liver Elasto- metry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT* +	BMI	Glu mmol/ L	Insulin mIU/L	HOMA- IR	D2	fat mala- bsorption signs, intestinal examina- tion*	fat load
															NAFLD activity	fibrosis												
[20], update 1	P	ABL	2%	F	18	0	2.6N	2.9N	N	U	+ moderate, diffuse						5.2 (17y) 6.1 (18y)	1.03	0.06	<0.03	+	20.8	4.7 (18y)	8.9 (18y)	1.7 (18y)	0	malA	no TG increase
[18,27]	P	ABL	8%	F	40	NA	NA	NA	NA	B	extensive	NA	NA					1.11	0.24	ND	NA	NA	NA	NA	NA	malA steatorrhea		
[37]	P	ABL	c.61+2 T>C + 16%	F	32	NA	2.2N	1.1N	NA	NA								0.90 (33y)	0.50 (33y)	0.06 (33y)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	diarrhea	
[20], update 2	AR	ABL	22%	M	22	0	2.5N	2.7N	1.2N	U	+/-						8.4 (19y) 7.0 (22y)	1.14	0.06	<0.03	+	18.0	5.1 (20y)	6.0 (20y)	1.4 (20y)	0	malA	
[20], update 3	P	ABL	22%	F	17	0	1.4N	N	3.9N	B (14y)	30% mixed	F1	mild, portal	hepatocel balloning: 0			9.9 (13y) 10.7 (14y) 8.9 (16y)	1.10	0.05	<0.03	+	child	4.7 (16y)	13.3 (16y)	2.8 (16y)	0	malA	
[42]	P	ABL	34%	M	13	NA	NA	NA	NA	U	+							0.70	<0.20	ND	NA	child	NA	NA	NA	diarrhea intestinal white mucosa		
[48]	P	ABL	34%	M	20	NA	NA	NA	NA	U	+							1.28	0.31	ND	+	NA	NA	NA	NA	diarrhea, enterocyte vacuolisa- tion		
this study A1	P	ABL	34%	F	40	0	N	N	NA	U	+						3.7	1.41	<0.08	NA	+	20.3	NA	NA	0	white mucosa	no TG increase	
this study A5	P	ABL	40%	F	48	0	1.9N	N	2.6N	U	+/-						7.5 (45y) 10.4 (47y) 20.0 (48y)	0.65	0.07	<0.03	+	18	5.0 (38y)	4.3 (38y)	1.0 (38y)	0		

Ref	P/AR	dis-ease	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Sex	Age	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver explora- tion	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NSH CNR scoring	Liver Elasto- metry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT*	BMI	Glu mmol/ L	Insulin mIU/L	HOMA- IR	D2	fat malabsor- ption signs, intestinal examina- tion*	fat load	
[29,105]	P	ABL	43%	F	29	NA	NA	NA	B		+in zone 2 of acinus	no other abnormal- ities were present					1.10	<0.10	<0.01	NA	19.7	NA	NA	NA	NA	intol for fatty foods, fat containing vacuoles in the enterocyte	no TG increase	
this study, A3	P	ABL	52%	M	24	+	N	NA	U		+massive						0.64	0.13	NA	+	20.3	NA	NA	NA	NA			
this study, A2	P	ABL	52%	F	37	+	N	NA	NA								1.53	0.10	0.01	+	16.2	NA	NA	NA	NA	diarrhea		
[20], update 4	P	ABL	67%	F	36	+	1.8N	1.2N	N	U	+						0.94 (34y)	<0.02 (34y)	<0.03 (34y)	0	22.3	4.4 (36y)	10.0 (36y)	2.0 (36y)	0	no history of diarrhea	no TG increase	
[40]	P	ABL	74%	M	0.4	NA	incr	incr	NA	NA							NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	diarrhea		
this study, A7	P	ABL	6 + 83%	F	2.5	NA	incr	NA	NA	NA							0.5	0.5	0.01							diarrhea		
[26, 32]	P	ABL	66% + 83%	M	6	+ at age of 2- 4y	2N	NA	NA	B (2y)	+marked fatty transforma- tion	early portal cirrhosis					0.77 (0.6y)	0.06 (0.6y)	0.000 (0.6y)	+	child	N	NA	NA	NA	NA	steatorrhea	
this study, A6	P	ABL	0+91%	F	19	+	NA	2.1N	NA	U	+massive						0.54	0.02	0.00	+	19.1	NA	NA	NA	NA			
[45]	P	ABL	19% + 96%	M	1.1	NA	incr	incr	NA	U scan	+						0.77	0.07	0.02	+	child	NA	NA	NA	NA	fat inclusion		
[38]	P	ABL	2% + 1564T	M	1,3	+	incr 77	incr 151	NA	Scan	+						1.19 to 2.38	0.11 to 1.14	NA	+	child	NA	NA	NA	NA	no steatorrhea		
		ABL			4	NA	NA	NA	NA	B	+massive	≥F2	mild portal				NA	NA	NA		child	NA	NA	NA	NA			



Ref	P/AR	dis-ease	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Sex	Age	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver exploration	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NSH CNR scoring	Liver Elastometry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT*	BMI	Glu mmol/L	Insulin mIU/L	HOMA-IR	D2	fat malabsorption signs, intestinal examination*	fat load
[18,19], update 5	up	ABL	46%+ R540H	M	0.5	0	2.9N	4.9N	NA	U	+ diffuse decrease of hepatic signal, only 5% of steatosis\$						1.03	0.16	<0.1	+	child	NA	NA		white mucosa, diarrhea		
					24																						
[33, 41]	P	ABL	G746E + 94%	F	40	NA	incr 97	NA	NA	NA							1.8 (16y)	<0.1 (16y)	NA	NA	21.9	NA	NA	NA	diarrhea		
[36]	P	ABL	A410L del insv	M	3	NA	incr 96-139	81-110	NA	NA							1.23	0.13	ND	+	NA	NA	NA	NA	diarrhea		
[21], update 6	P	ABL	L435H+ incomplete splicing defect	F	4	+	9.6N	9.1N	NA	U, B	+	F3	0	hepatoc ballooning : 0			1.68-2.27	0.50-1.15	0.18-0.20	0	child	NA	NA	NA	no history of diarrhea (spontaneous fat eviction) white mucosa	4y : TG increase (1.3 fold TG at T0)	
					22		1.4N	1.6N	NA	U	+						2.12	0.81	ND	0	17.3	NA	NA				
					24		N	N	NA	MRI	30%																
[46]	P	ABL	H529R	F	0.5	NA	1.9N	2.0N	N	U	+						0.57	0.15	NA	+	child	NA	NA	NA	fat laden enterocytes		
this study A4	P	ABL	P552L	F	1	+	NA	NA	NA	U	+						0.98	0.01	0.00	+							
[32]	P	ABL	D780Y	M	27	NA	NA	NA	NA	? U?	+ , mild						0.87	0.03	0.006	NA	22.1	NA	NA	NA			
this study B1	P	Ho-FHBL	SP	M	0.2	0	1.7N	1.3N	NA	U	0						0.88	0.02	0.01	+	child	NA	NA	NA	white mucosa, lipid inclusions	NA	
this study B2	P	Ho-FHBL	4%	F	41	0	2.9N	1.4N	1.1N	U	+, diffuse						8.2 (36y) 7.0 (37y) 5.7 (38y)	0.72	0.06	<0.03	+	28	5.1 (41y)	1.8 (41y)	0	4y:lipid inclusion	no TG increase

Ref	P/AR	dis-ease	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Sex	Age	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver explora- tion	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NSH CNR scoring	Liver Elasto- metry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT*	BMI	Glu mmol/ L	Insulin mIU/L	HOMA- IR	D2	fat malabsor- ption signs, intestinal examina- tion*	fat load
this study B3	AR	Ho-FHBL	4%	F	42	+	1.1N	N	2.0N	B (38y)	70% mixed diffuse	F4	moderate, portal	portal hypertension; hepatocel ballooning,0	3	31.2 (37y) 50.5 (38y) 33.3 and 27.4 (40y)	0.93 (40y)	0.10 (40y)	<0.03 (40y)	+	22.7 (40y)	6.2 (35y)	3.6 (35y)	4.7 (35y)	+	5y:lipid inclusion	no TG increase
[90]	P	Ho-FHBL	7%	F	27	NA	1.5N	N	NA	MRI	+						0.31	0.15	UD	+	25	NA	NA	NA	diarrhea	NA	
[90]	AR	Ho-FHBL	7%	M	11	NA	N	1.1N	NA								0.46	0.05	UD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
[90]	AR	Ho-FHBL	7%	M	4	NA	1.4N	N	NA								0.67	0.11	UD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
[71, 91]	P	Ho-FHBL	2%+9%	M	0.8	+	incr 283	incr 408	NA	B	diffused, mixed	F1 earliest stages of portal fibrosis	lobular, focal				0.96	0.20		+		NA	NA	+	steatorrhea, chronic diarrhea; intestinal ex: huge quantity of stainable lipids		
					1.0	NA	incr 142	incr 170	NA	B	diffused, mixed	F1/F2	lobular, focal				0.93	0.41				NA	NA				
					2.5	NA	NA	NA	NA	B	less fatty	F4	NA	portal hypertension, esophageal varices			1.20	0.34				NA	NA				
					<11	NA	NA	NA	NA	?											child	NA	NA				
[88]	P	Ho-FHBL	2068-4T>A +21%	F	55	NA	NA	NA	NA	?	70-80% (macro)	mild, F1?	NA				1.81	0.50	0.16	NA	31.2	NA	NA	+			
[88]	P	Ho-FHBL	27%	F	19	NA	N	N	NA	U	0						0.57	0.07	Trace	0	NA	NA	NA	NA	diarrhea, steatorrhea		
[65, 75]	P	Ho-FHBL	28%	F	21	NA	NA	NA	NA	B	30% zone 3, macro	F0	0				0.49	0.07	Trace		16.9	NA	NA	NA	enterocyte vacuolisation		
					23	NA	NA	NA	NA	B	massive	F2/F3	moderate, portal									NA	NA				

Ref	P/AR	dis-ease	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Sex	Age	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver explora- tion	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NAFLD activity	fibrosis	NSH CNR scoring	Liver Elasto- metry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT*	BMI	Glu mmol/ L	Insulin mIU/L	HOMA- IR	D2	fat malabsor- ption signs, intestinal examina- tion*	fat load	
[40]	P	Ho-FHBL	30.9%	M	NA	liver dysfunction																								
[40]	AR	Ho-FHBL	30.9%	F	NA	liver dysfunction																								
this study B4	P	Ho-FHBL	34%	M	10	0	incr 47 (7y)	354 (7y)	NA	U	+								0.67	0.13	0.10	+	child	5.0 (10y)	12.4 (10y)	2.8 (10y)	0	white mucosa, lipid inclusions	no TG increase	
this study B7	P	Ho-FHBL	16% + 35%	F	29	+	NA	NA	NA	B	40%, macro	centrilob- ular	not signifi- cant	hepatocel- balloning,0	2	1A		0.84	0.15	0.02	+	17.3	NA	NA	NA	0	lipid inclusion	TG increase (1.9fold TG at T0)		
					35	+	N*	N*	NA	U	30%							0.93	0.48	NA		15.9	4.6	2.7	0.6	NA	NA			
[81]	P	Ho-FHBL	39%	F	57	NA	NA	NA	NA	U+ MRI+B	mild fatty change			hepatic hemangioma				2.17	0.64	0.03	NA	17.8	NA	NA	NA	+	no history of diarrhea, moderate accumulation of fat droplets			
[87]	P	Ho-FHBL	26 + 66%	M	12	0	NA	1.5N	NA	NA								0.82	1.40	ND	NA	child								
[88]	P	Ho-FHBL	23% + 67%	M	52	+	N	N	NA	computed tomography scan + B	NA	F4	NA	hepato- cellular carcinoma. Heavy alcohol drinker				1.86	1.0	Trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			
[89]	P	Ho-FHBL	82%	F	41	NA	N	N	NA	U	+							2.66	0.08	0.01	NA	19.2		NA	NA					
[54]	P	Ho-FHBL	38+86%	M	66	+												1.02	1.04	1.06	NA	27.6								

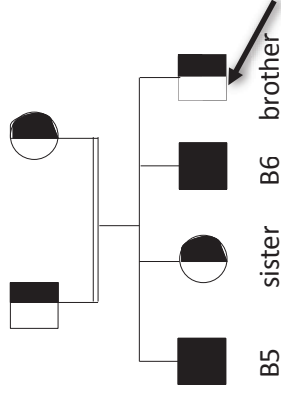
Ref	P/AR	dis-ease	FHBL	mutations : % length of the normal pt and/or missense	Age £	Sex	HMG	ASAT	ALAT	GGT	method of liver explora- tion	steatosis	fibrosis, METAVIR score	inflammation	other	NSH CNR scoring		Liver Elasto- metry kPa	CT mmol /L	TG mmol /L	ApoB g/L	FTT*	BMI	Glu mmol/ L	Insulin mIU/L	HOMA- IR	D2	fat malabsor- ption signs, intestinal examina- tion*	fat load		
																NAFLD activity	fibrosis														
[72]	P	Ho-	FHBL	87%	41	F	+	NA	NA	NA	U+B	25%	no evidence of progressi- on to cirrhosis						1.48	0.72	0.06	NA	NA	NA	NA				0 malabsor- ption signs; 0 accumula- tion of lipid-TG particle in the epithelial cells (jejunal biopsy)	increase (6.5 fold TG at T0)	
[72]	AR	Ho-	FHBL	87%	48	F	+	NA	NA	NA	U	+							2.33	0.39	0.09	NA	25.3	NA	NA				0 malabsor- ption signs		
this study B5	P	Ho-	FHBL	C97G + D2182Y	28	M	+	1.2N	N	NA	B	80% mixed diffuse	F1	mil, portal and lobular					0.83	0.15	<0.03	NA	36	NA	NA	NA	+		No history of diarrhea	TG increase (2.2 fold TG at T0)	
this study B6	AR	Ho-	FHBL	C97G + D2182Y	21	M	0	2.0N	1.6N	N	U	+							0.74	0.18	<0.03	NA	41	NA	NA	0			0 NA		
[76, 84]	P	Ho-	FHBL	R490W (R463W)	47	F	NA	1.1N	N	NA	NA	NA							0.92	0.67	0.07	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	TG increase (3.6 fold TG at T0)	
[76, 84]	AR	Ho-	FHBL	R490W (R463W)	16	F	NA	N	1.3N	NA	NA	NA							1.00	0.11	<0.01	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		

AR affected relative (ABL or Ho-FHBL); £ age at the end of the study; CT: total cholesterol; TG: triglycerides; D2: type 2 diabetes mellitus; \* described in the clinical features; +: presence; 0: absence, NA: not available; N: normal; xN: x fold the upper limit of the normal range; U: ultrasound, B: biopsy; MRI Magnetic Resonance Imagery; (age); mA: malabsorption;

Supplementary Table 6. Symptoms at the end of the study.

	Children probands*				Adults probands*			
	ABL (N=29) n Median, %, nb of cases	H <sub>0</sub> -FHBL (N=7) n Median, %, nb of cases	<i>p</i> value		ABL (N=28) n Median, %, nb of cases	H <sub>0</sub> -FHBL (N=18) n Median, %, nb of cases	<i>p</i> value	
Sex (% of women)	25 48%	7 43%	1.0		28 50%	18 78%	0.07	
age at diagnosis	22 1.0 [0.7-4.4]	7 1.0 [-0.6-8.0]	0.85		19 14.0 [9.3-20.6]	14 44.5 [24.2-47.0]	<0.01	
age at the time of study	29 7.0 [4.7-9.3]	7 8.0 [2.9-12.3]	0.64		28 30 [28.2-36.2]	18 44 [34.2-47.8]	0.02	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	- -	- -	-		14 19.6 [18.5-20.4]	11 25.3 [21.0-29.1]	0.03	
diarrhea in infancy	24 100%	4 50%	0.02		27 89%	10 60%	0.13	
stéatorrhea	10 80%	3 66%	1.0		11 73%	11 55%	0.66	
failure to thrive	14 100%	3 100%	ND		10 80%	7 71%	1.0	
ophthalmological imp	17 35%	4 25%	1.0		28 79%	13 15%	<0.01	
peripheral neurological impairments	16 37.5%	5 60%	0.61		23 65%	14 14%	<0.01	

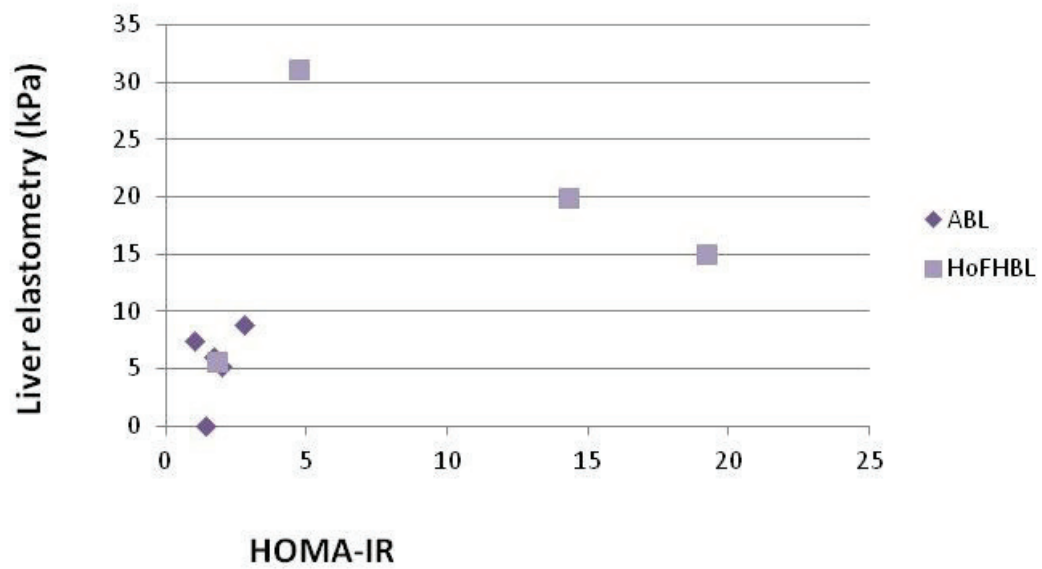
## Supplementary Figures



	mutation	genetical status	Age (years)	BMI kg/m <sup>2</sup>	Elastography (kPa)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	apoB (g/L)	other diseases
<b>father</b>	C97G+D2182Y	heterozygote	49	33	65	3.16	1.46	1.10	1.51	0.44	D2, alcohol consumption
<b>mother</b>	C97G+D2182Y	heterozygote	47	34	7.6	2.32	0.38	1.33	0.79	0.41	D2
<b>sister</b>	C97G+D2182Y	heterozygote	24	26.5	11.8	2.34	0.43	1.38	0.89	0.36	
<b>brother</b>	C97G+D2182Y	heterozygote	13 (before liver transplantation)	31	ND	2.33	0.9	1.1	0.8	0.47	D2

**Supplementary Fig 1. B5 B6 pedigree, clinical and biological data.** The proband of this family was a Hz-FHBL who presented a growing teratoma of the third ventricle at the age of 13 years and liver transplantation at 16 years of age. He presented with hypertriglyceridaemia during a corticotherapy treatment, leading to lipid exploration. Unexpectedly he was found to be heterozygous FHBL and his two asymptomatic brothers were found homozygous in a consanguineous family





Supplementary Fig. 2. Correlation between Liver elastometry and HOMA-IR.

## II. Développement d'une méthode de mesure d'activité LPL

L'étude phénotypique des patients avec hypertriglycéridémie majeure devrait comporter une quantification de l'activité LPL *ex vivo*, enzyme clé de l'activité lipolytique. En effet, l'activité de cette protéine est modulée par de nombreuses autres protéines et l'expression de ce gène est puissamment régulée par des facteurs génétiques et environnementaux ; les patients peuvent donc présenter une diminution d'activité LPL sans pour autant présenter d'anomalie sur le gène *LPL*.

L'activité LPL liée aux VLDL est difficile à mettre en évidence. Nous utilisons donc la propriété de relargage de la LPL après injection d'héparine [500] tout en prenant en compte l'activité de la lipase hépatique relarguée simultanément. Classiquement, la technique employée utilise un substrat trioléine qui présente des inconvénients majeurs : ce n'est pas le substrat naturel de la LPL, le marquage radioactif présente les contraintes liées à l'utilisation et l'élimination des isotopes radioactifs, et les performances analytiques sont médiocres. (faible reproductibilité, mauvaise fidélité intermédiaire).

Nous avons donc mis au point une mesure d'activité LPL en améliorant les performances analytiques de la méthode (robustesse). Nous avons employé un substrat naturel : pool de VLDL humains afin de mieux représenter l'activité physiologique. Les résultats de ce travail ont été publiés pour permettre le transfert de cette technique dans d'autres laboratoires de biochimie spécialisée et mieux explorer ainsi les malades présentant des HTG majeures (article 4).



# Post-Heparin LPL Activity Measurement Using VLDL As a Substrate: A New Robust Method for Routine Assessment of Plasma Triglyceride Lipolysis Defects

Mathilde Di Filippo<sup>1,2\*</sup>, Christophe Marçais<sup>2,3</sup>, Sybil Charrière<sup>2,4</sup>, Oriane Marmontel<sup>1</sup>, Martine Broyer<sup>1</sup>, Mireille Delay<sup>3</sup>, Micheline Merlin<sup>3</sup>, Axel Nollace<sup>1</sup>, René Valéro<sup>5</sup>, Michel Lagarde<sup>2</sup>, Valérie Pruneta-Deloche<sup>2</sup>, Philippe Moulin<sup>2,4</sup>, Agnès Sassolas<sup>1,2</sup>

**1** UF Dyslipidémies Cardiobiologie, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **2** INSERM U1060, INSA de Lyon, INRA U1235, Univ Lyon-1, Université de Lyon, Villeurbanne, Oullins, France, **3** Laboratoire de Biochimie spécialisée, Centre de Biologie Sud, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France, **4** Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **5** Département de Nutrition, Maladies Métaboliques, Endocrinologie, APHM, Hôpital de la Timone, Aix-Marseille Université, UMR\_S 1062, UMR\_A1260, Marseille, France

## Abstract

**Background:** Determination of lipoprotein lipase (LPL) activity is important for hyperchylomicronemia diagnosis, but remains both unreliable and cumbersome with current methods. Consequently by using human VLDL as substrate we developed a new LPL assay which does not require sonication, radioactive or fluorescent particles.

**Methods:** Post-heparin plasma was added to the VLDL substrate prepared by ultracentrifugation of heat inactivated normolipidemic human serums, diluted in buffer, pH 8.15. Following incubation at 37°C, the NEFA (non esterified fatty acids) produced were assayed hourly for 4 hours. LPL activity was expressed as  $\mu\text{mol/l/min}$  after subtraction of hepatic lipase (HL) activity, obtained following LPL inhibition with NaCl 1.5 mmol/l. Molecular analysis of *LPL*, *GPIHBP1*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE* genes was available for 62 patients.

**Results:** Our method was reproducible (coefficient of variation (CV): intra-assay 5.6%, inter-assay 7.1%), and tightly correlated with the conventional radiolabelled triolein emulsion method ( $n = 26$ ,  $r = 0.88$ ). Normal values were established at  $34.8 \pm 12.8 \mu\text{mol/l/min}$  (mean  $\pm$  SD) from 20 control subjects. LPL activities obtained from 71 patients with documented history of major hypertriglyceridemia showed a trimodal distribution. Among the 11 patients with a very low LPL activity ( $< 10 \mu\text{mol/l/min}$ ), 5 were homozygous or compound heterozygous for *LPL* or *GPIHBP1* deleterious mutations, 3 were compound heterozygous for *APOA5* deleterious mutations and the p.S19W *APOA5* susceptibility variant, and 2 were free of any mutations in the usual candidate genes. No homozygous gene alteration in *LPL*, *GPIHBP1* and *APOC2* genes was found in any of the patients with LPL activity  $> 10 \mu\text{mol/l/min}$ .

**Conclusion:** This new reproducible method is a valuable tool for routine diagnosis and reliably identifies LPL activity defects.

**Citation:** Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, et al. (2014) Post-Heparin LPL Activity Measurement Using VLDL As a Substrate: A New Robust Method for Routine Assessment of Plasma Triglyceride Lipolysis Defects. PLoS ONE 9(5): e96482. doi:10.1371/journal.pone.0096482

**Editor:** Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, Brazil

**Received:** November 8, 2013; **Accepted:** April 7, 2014; **Published:** May 2, 2014

**Copyright:** © 2014 Di Filippo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr

## Introduction

Lipoprotein lipase (LPL) (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.34) plays a crucial role in the metabolism of very low density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons [1,2]. A large pool of this enzyme bound to heparin sulfate proteoglycans and glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoproteins binding protein 1 (GPIHBP1) through ionic linkage [3,4], is releasable into plasma following the intravenous injection of heparin. Familial LPL deficiency is a rare autosomal recessive disorder which is characterized by primary hyperchylomicronemia due to homozygous or compound heterozygous mutations of *LPL* gene [5] as well as to homozygous mutations of *APOC2*, *GPIHBP1*, *APOA5* or

*LMF1* genes [6–8]. Additionally, sporadic forms of severe hypertriglyceridemia commonly result from complex interactions between environmental and genetic factors leading to various degrees of LPL deficiency [6]. Consequently, LPL activity measurement remains primordial in order to decipher the mechanisms underlying determinants of these heterogeneous phenotypes and bring irreplaceable information in case of negative or unavailable molecular diagnosis.

However, the LPL activity assay remains difficult. Methods using commercial triglyceride (TG) emulsions as a substrate are hampered by a high NEFA concentration at the basal state and a lack of specificity due to the presence of mono and diglycerides [9,10]. The use of trioleyl substrates with the incorporation of

radioactive tracers ( $^3\text{H}$ ) by sonication under strictly controlled conditions by Nilsson-Ehle et al published in 1972 [11], was a major improvement. However, this time-consuming assay needs to be performed in triplicate in order to minimize the intra-assay error [12–15]. Despite several improvements, most of the current methods using radiolabelled ( $^3\text{H}$  or  $^{14}\text{C}$ ) substrates cannot be run on automats and require cumbersome strategies to inhibit hepatic lipase activity. Some chromophoric [16–20] or fluorescent [21] substrates have been used; however the preparation of these substrates is problematic, the derivatives were unstable and the method not sensitive enough [21]. In a recent method, Basu D et al [15] used a commercially fluorescent substrate (EnzChek), esterified by BODIPY-C12 at the *sn-1* position of glycerol, which was stable and solubilised with a specific detergent (Zwittergent). Although highly appealing, this method has not been tested in human post-heparin plasmas.

Therefore, we decided to set up a new reliable method sensitive enough to allow human post-heparin LPL activity measurement in routine conditions without requiring sonication, nor use of a fluorescent or radioactive substrate. Seeking reliability, we preferred to choose a natural substrate composed of pooled human VLDL, thereby also providing the optimal amount of human apoC-II.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

Clinical investigations have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained from the control subjects and the patients before DNA sampling and heparin injection. The study protocol was approved by our institutional ethical committee (Comité d’Ethique du CHU de Lyon).

### Patients

Twenty adults control subjects (9 men, 11 women, mean age  $52 \pm 17$  years) were recruited in order to determine normal post-heparin LPL activity (without history of hypertriglyceridemia or diabetes). 71 hypertriglyceridemic patients with documented history of type V dyslipidemia (TVHTG) were assessed with the new method (Plasma TG concentration (TG)  $>15$  mmol/l or familial history of hypertriglyceridemia with TG  $>10$  mmol/l). Patients characteristics are summarized in Table 1.

Fasting venous blood samples were drawn into EDTA tubes on ice before (T0) and 10 min (T10) after a 50 U/kg intravenous heparin injection. The tubes were immediately centrifuged at  $4^\circ\text{C}$  and plasma was frozen at  $-80^\circ\text{C}$ .

### VLDL substrate preparation

VLDL substrate was used for the LPL assay: 20 ml of human serum were pooled from set of 10 human serum samples (TG 0.9–1.75 mmol/l, HDL-cholesterol  $>0.9$  mmol/l, total cholesterol 3.2–5.5 mmol/l). VLDL from the pool were isolated in 1.2 ml polycarbonate tubes (Beckman) by preparative ultracentrifugation ( $d = 1.006$  kg/l) using a Sorval Discovery M150 SE ultracentrifuge (Sorval S140 AT 017 Rotor: 140000 RPM (1042000 max) for 70 minutes). Floating VLDL were collected, stored at  $+4^\circ$  and used within 48 h; 360  $\mu\text{l}$  of VLDL substrate at a final TG concentration of 7.3 mmol/l was used for both total post heparin and hepatic lipase activity assay. Before use, the VLDL substrate was heated at  $56^\circ\text{C}$  for one hour in order to inactivate any residual endogenous lipase activity.

**Table 1. Subjects features.**

lane	n	Age year	Sex %of men	BMI kg/m <sup>2</sup>	Smoker % of smoker	Diabetes %
0	20	51.7 (22–76)	55	NA	NA	0
1	15	45.3 (13–61)	73	27.1 (21.9–34.7)	20	45
2	20	48.4 (23–80)	80	27.6 (17.8–34.0)	42	50
3	7	42.3 (36–50)	71	26.0 (20.3–32.0)	60	14
4	8	48.4 (32–64)	50	27.5 (21.7–40.0)	33	38
5	5	23.3 (5–41)	60	20.1 (19.1–21.0)	33	33
6	3	54.0 (35–70)	67	22.1 (21.8–22.3)	NA	NA

n effective of the group.

NA not available.

Mean (range) or %.

doi:10.1371/journal.pone.0096482.t001

## Michaelis constant

The Michaelis constant ( $K_m$ ) was determined as the inverse of the Lineweaver-Burk line intercept using 6 different VLDL substrates with final TG concentration ranging from 0.80 to 6.80 mmol/l.

## LPL activity assay

The inactivated VLDL substrate and the mixture for the enzymatic reaction were kept on ice until the start of the reaction at 37°C.

Total post-heparin lipase activity (PHLA) (A): 180  $\mu$ l of VLDL substrate was mixed with 540  $\mu$ l of buffer A (Tris 50 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/l, dodecylbetain (laurylbetain Ramidus AB, Ideon, SE-223 70 Lund, Sweden) detergent 0.03%, pH 8.15) leading to a 1.8 mmol/l final TG concentration; 10  $\mu$ l of post-heparin plasma sample (T10) were added and mixed; 120  $\mu$ l were distributed into 5 polycarbonate tubes. At the beginning of the enzymatic reaction, one tube was kept on ice (basal NEFA level), 4 tubes were incubated in a 37° shaking water-bath and each hour, one tube was removed and kept on ice. The NEFA concentration was assayed on the 5 tubes by an enzymatic method in duplicate (Wako kit, NEFA-HR(2)) on a Pentra 400 Roche instrument. Calculation of the enzymatic activity was made in the linear part of the curve (see results) between 60 and 180 minutes. The PHLA activity was expressed in  $\mu$ mol/l/min of released NEFA.

Hepatic Lipase (HL) activity (B): the assay was conducted with the same procedure, but with 20  $\mu$ l of post-heparin plasma sample and buffer A was substituted by buffer B (Tris 50 mmol/l, NaCl 2 mmol/l, dodecylbetain detergent 0.03%, pH 8.15) in order to inhibit the LPL activity; the final NaCl concentration in the mix was 1.5 mmol/l.

LPL activity was obtained by the subtraction of hepatic lipase activity, measured with buffer B from total activity obtained with buffer A and expressed as  $\mu$ mol/l/min of produced NEFA. The enzymatic reaction was controlled using, as the external standard, a sample of a frozen pool of PHLA plasmas obtained from 8 control subjects.

## LPL assay comparison with the radiolabelled method

A radiolabelled <sup>14</sup>C-triolein emulsion was used as previously described [22]. The assays were performed in triplicate.

## Molecular diagnosis

Following the extraction of genomic DNA from blood (Nucleon Bac3, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), the encoding regions, and the flanking intronic junctions of *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIIIBP1* and *APOE* genes were PCR amplified as previously reported [23-26]. The amplicons were directly sequenced with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI PRISM 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

*In silico* analyses of the mutations were performed with Alamut v2.0 (Interactive Software), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_aligned\\_seqs\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_aligned_seqs_submit.html)).

## Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 software. T-test or non-parametric Mann Whitney tests were performed in order to compare mean/median of LPL activities between groups. Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the distribution of the post heparin LPL activities. p-values (two sided) less than 5% were considered significant. Linear regressions were

performed to determine the correlation between LPL activity and age or the conventional radiolabelled method.

## Results

### Optimization of substrate

(see Supplemental data S1 and Figure S1)

First, we verified that similar lipoprotein profiles were obtained from different VLDL substrate pools (n = 40, the coefficient of variation (CV) was <5% for cholesterol and TG concentrations and <10% for apoB, C-II and C-III) (see Table S1). Second, the mean  $K_m$  of the reaction was lower than 1.5 mmol/l (mean 1.42 mmol/l). In order to determine the optimal TG concentration chosen for the mixture, we tested 2 patient samples (PHLA activity 17.4 and 49.2  $\mu$ mol/l/min) with 7 different TG concentrations in the mixture (ranging from 0.45 to 3.45 mmol/l); the activity was decreased (-44, -67%) with low TG levels (< 0.90 mmol/l) and slightly increased (+17, +24%) with high TG concentration (> 2.7 mmol/l) in the mixture (see Figure S2). Consequently, we established the optimal final concentration of TG in the assay mixture at 1.8 mmol/l.

### Kinetics

Using the final substrate concentration set at TG = 1.8 mmol/l, the enzymatic reaction was found to be linear from 60 to 240 min of incubation, independently of the PHLA level, as shown in Figure 1A. Hepatic Lipase (HL) activity was low in these assay conditions and remained similarly low despite both a pH increase to 9.2 (optimal pH for HL) and a sample volume increased to 20  $\mu$ l.

In order to increase the accuracy of the LPL assay by optimizing the amount of released NEFA, the reaction time was set to 3 hours since both enzymatic PHLA and HL reactions were linear from 60 to 240 min; PHLA activity was calculated between 60 and 180 min, in order to avoid a possible loss of linearity after 180 min.

### Limit of detection

The minimum level of detectable LPL activity was determined through two methods: first, we performed the assay using 6 pre-heparin control plasmas and second, with 5 inactivated (56°C one hour) control post-heparin plasmas. We discovered that the minimal detectable LPL activity (mean+3SD) was 2.7  $\mu$ mol/l/min for the pre-heparin plasmas (from VLDL-bound LPL or other circulating lipases) and 1.68  $\mu$ mol/l/min for the heat inactivated post-heparin plasmas.

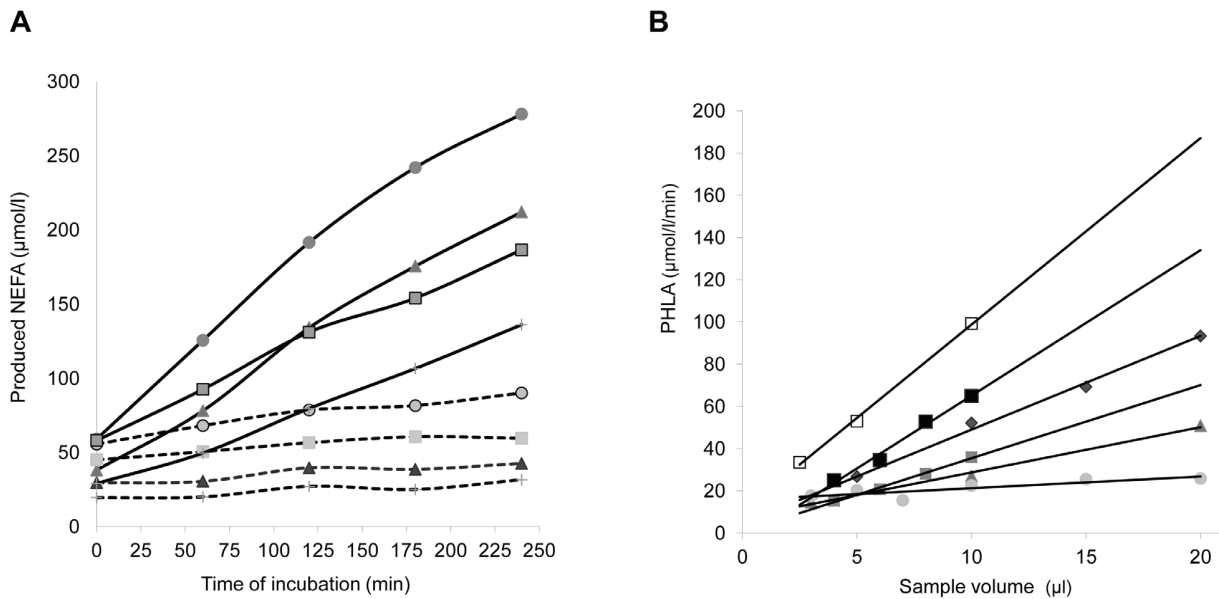
### Linearity

A strict linearity of the LPL assay was observed between 0–70  $\mu$ mol/l/h, as determined by the increase or decrease of the plasma sample volume from 6 patients with normal or high LPL activity (from 20 to 100  $\mu$ mol/l/min); the kinetics of the enzymatic reactions were linear with any sample volume (3 to 20  $\mu$ l) (Figure 1B). Consequently, the high (>70  $\mu$ mol/l/min) and low (<10  $\mu$ mol/l/h) LPL activities should be reassayed with a decreased (5  $\mu$ l) or increased (20  $\mu$ l) volume of assay sample respectively.

### Imprecision

The coefficient of variation (CV) of the intra-assay reproducibility was 5.6% for an LPL activity of 31.5  $\mu$ mol/l/min (SD: 1.8  $\mu$ mol/l/min).

The inter-assay reproducibility was studied by including a single sample from a PHLA frozen control pool in 16 consecutive series



**Figure 1. Kinetics and linearity.** Figure 1A. PHLA and HL kinetics in 3 patients. LPL+HL (line); HL (dotted line); Patient 1 (triangle); Patient 2 (circle); Patient 3 (square); Patient 4 (vertical line). Figure 1B. Linearity test. Patient 1 (black diamond); Patient 2 (white square); Patient 3 (grey triangle); Patient 4 (black square); Patient 5 (grey square); Patient 6 (grey circle). doi:10.1371/journal.pone.0096482.g001

of independent LPL determinations; the CV was 7.1% (mean:  $29.1 \pm 2.1 \mu\text{mol/l/min}$ ). This sample allows an internal quality control of each assay.

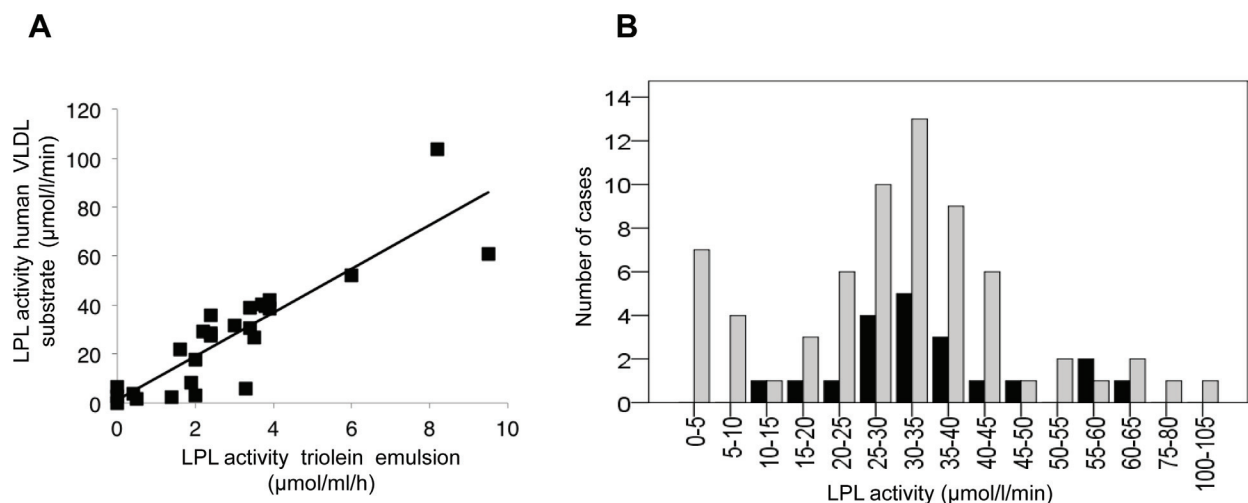
**Comparison with conventional radiolabelled method**

26 post-heparin plasma LPL-HL activities obtained from hypertriglyceridemic patients with history of documented major hyperchylomicronemia were assayed for LPL activity by both methods (our new method versus the conventional  $^{14}\text{C}$  triolein method). LPL activities showed a strong positive correlation ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2A).

**LPL activity in controls and TVHTG patients**

Normal values of LPL activity were established at  $34.8 \pm 12.8 \mu\text{mol/l/min}$  (mean  $\pm$  SD; extreme values 10.6 to 62.2) in 20 control subjects (Figure 2B); the LPL activity was unchanged according to age (no correlation between LPL activity and age,  $r = 0.063$ ) and gender: mean  $30.9 \pm 11.7 \mu\text{mol/l/min}$  and  $39.6 \pm 13.0 \mu\text{mol/l/min}$  in 11 females and 9 males respectively ( $p = 0.261$ ).

Interestingly, LPL activities from the 71 TVHTG patients were widely distributed (activity range 0 to  $103 \mu\text{mol/l/min}$ ; mean:  $30.5 \pm 18.2 \mu\text{mol/l/min}$ ) with evidence for a non normal distribution ( $p < 0.01$ ) (Figure 2B). 11 patients had a low LPL activity ( $<$



**Figure 2. Correlation between LPL activity assays in TVHTG and controls patients.** Figure 2A. Correlation with conventional method ( $n = 26$ ,  $r = 0.88$ ,  $p < 0.001$ ).  $y = 8.93x + 1.21$ ;  $R^2 = 0.77$ . Figure 2B. Distribution of LPL activity in TVHTG patients and controls subjects. TVHTG patients (grey square); controls (black square). doi:10.1371/journal.pone.0096482.g002



10  $\mu\text{mol/l/min}$  (mean  $\pm$  SD:  $3.6 \pm 2.4 \mu\text{mol/l/min}$ ) and the LPL activities in the other patients with LPL between 10 and  $55 \mu\text{mol/l/min}$  were normally distributed around the median of this group ( $p = 0.97$ , median:  $31.6 \mu\text{mol/l/min}$ , mean:  $32.1 \pm 8.6$ ,  $n = 51$ ). A group of 6 TVHTG patients had high LPL activity despite hypertriglyceridemia.

### LPL activity and molecular diagnosis in hypertriglyceridemic patients with TVHTG

Among the 71 patients with history of major hypertriglyceridemia included, molecular assessment was available for 62 patients; all of which were examined for *LPL* gene mutations. 58 patients had a molecular diagnosis for additional candidate genes involved in the regulation of LPL activity (*APOA5*, *GPIHBP1*, *APOC2*, *APOE*). 5 new mutations were found: p.V227G in *LPL* gene, p.Y110LfsX158, p.Q295X and p.R343C in *APOA5* gene and p.Q246R in *APOE* gene (See Table S2).

Mutations in *LPL*, *GPIHBP1*, *APOA5* or *APOC2* genes were not found in 15/58 (26%) TVHTG patients (Figure 3, lane 1). In this group, most patients (13/15) presented normal LPL activity whereas 2 patients had both a very low LPL activity (1.6 and  $3.7 \mu\text{mol/l/min}$ ) and a clear familial history of hyperchylomicronemia. 1 of these 2 patients was found to be a carrier of p.Q246R a new missense heterozygous *APOE* gene mutation.

LPL activity was found in the reference interval in the 20/58 patients who harboured only *APOA5* or *APOC2* susceptibility polymorphisms (*APOA5* p.S19W, *APOA5* haplotype 2 or *APOC2* p.K41T) (lane2). LPL activity was also found in the reference

interval in the 7/58 patients who had either heterozygous *LPL* or *APOA5* deleterious mutation as well as in a single patient with a homozygous deleterious *APOA5* missense mutation (lane 3).

Conversely all the 5 homozygous or compound heterozygous patients with deleterious *LPL* or *GPIHBP1* mutations had a drastically reduced LPL activity (lane 5 and see Table S2).

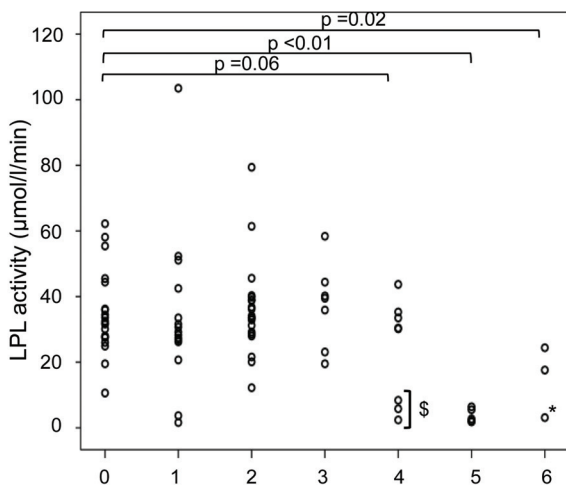
We considered a subgroup of TVHTG patients (8/58) defined as compound heterozygotes for a deleterious *APOA5* mutation and, on the second allele, a susceptibility polymorphism (either *APOA5*-haplotype 2 or *APOA5*-haplotype 3 (p.S19W)) (lane 4). 3 of these patients presented a low LPL activity  $< 10 \mu\text{mol/l/min}$  while 5 had a normal LPL activity.

3 patients had LPL auto-antibodies, only 1/3 displayed a low LPL activity (lane 6) at the time of blood drawing ( $3.1 \mu\text{mol/l/min}$ ): this patient was also heterozygous for the *LPL* p.P200LfsX7 frame shift mutation and was previously reported with low LPL activity using the triolein emulsion conventional assay [27].

Overall, drastically reduced LPL activity ( $< 10 \mu\text{mol/l/min}$ ) was discovered in 11 TVHTG patients (TG mean  $\pm$  SD:  $20.5 \pm 27.0 \text{ mmol/l}$ ): 5 of which were identified with obvious causal genotypes in either *LPL* or *GPIHBP1* genes and 4 of which had genotypes most likely to contribute to their hyperchylomicronemia. Additionally, 2 pediatric patients with family history of dominant hypertriglyceridemia had a clear lipolysis defect although there was no causal genotype yet identified in candidate genes.

Compared to patient with low LPL activity ( $< 10 \mu\text{mol/l/min}$ ), the 47 genotyped (TVHTG) patients with LPL activity over  $10 \mu\text{mol/l/min}$  had milder hypertriglyceridemia ( $8.9 \pm 8.0 \text{ mmol/l}$ ,  $p < 0.01$ ). In this group, no correlation between LPL activity and

**Figure 3**



lane	n	TG: mean (range) (mmol/l)£	LPL activity: ( $\mu\text{mol/l/min}$ )
0 control	20	1.3 (0.6-2.8)	34.8+/-12.8
1 TVHTG no mutation group: no mutation in <i>LPL</i> , <i>GPIHBP1</i> , <i>APOA5</i> , <i>APOC2</i>	15	7.8 (1.0-27.2)	33.9+/-23.8
2 TVHTG minor polymorphism group: <i>APOA5</i> p.S19W or SNP1 heterozygote, <i>APOA5</i> p.S19W homozygote, <i>APOC2</i> p.K41T heterozygote	20	9.0 (1.1-31.5)	36.1+/-14.4
3 TVHTG mild mutation group: homozygous mutation of <i>APOA5</i> , heterozygous mutation of <i>APOA5</i> , <i>LPL</i> , <i>GPIHBP1</i>	7	8.3 (2.9-19.6)	37.3+/-13.1
4 HTG mild mutation and polymorphism: group heterozygous mutation of <i>APOA5</i> (p.Q97X, p.Q295X, p.P215L, p.L253P) associated with S19W	8	20.4 (3.5-99.9)	23.7+/-15.7
5 HTG major mutation group: homozygous mutation of <i>LPL</i> or <i>GPIHBP1</i>	5	12.3 (5.3-22.4)	3.7+/-2.1
6 patients with anti-LPL antibodies and low LPL activity	3	11.1 (8.3-13.9)	15.0+/-10.9

**Figure 3. LPL activity and molecular diagnosis.** § 3 diabetic compound heterozygous patients ([p.Q139X];[p.S19W polymorphism]); \* patient with anti-LPL antibodies and heterozygous mutation of *LPL* gene; £ Triglyceridemia determined the day of LPL activity measurement. doi:10.1371/journal.pone.0096482.g003

plasma TG concentration was found ( $r=0.14$ ). None of these patients had either homozygous or combined heterozygous deleterious mutations in *LPL*, *APOC2*, or *GPIIIBP1*.

## Discussion

We propose a robust, very reproducible and convenient method to determine LPL activity in human post-heparin plasma. The absence of radiolabelled emulsion prevents the requirement of unreliable sonication under stringent conditions and avoid the use of costly and problematic reagent. Human VLDL constitute the natural substrate of LPL with an optimal composition in apoC-II and apoC-III similar to the concentrations found in normal plasma. The use of a pool of 10 plasmas obtained from control subjects provides a reproducible composition and lipolysis ability. Since fresh VLDL substrate for each LPL activity assay was needed, care was taken to control each assay with a pool of PHLA control plasmas. The dilution of the VLDL substrate was performed in a TRIS buffer in order to provide the necessary ions, optimal pH and suitable detergent conditions for an optimal reaction. A pH of 8.15 was considered as the optimal pH for the LPL activity [9,17,28–30]. The low HL activity found with our new method could be due to the fact that VLDL is not the optimal substrate for HL [31].

Since the kinetics of PHLA with a human VLDL substrate was not yet documented, we ascertained the linearity and the Michaelis constant ( $K_m$ ) of the enzymatic reaction. The  $K_m$  found using human VLDL was in the range of several  $K_m$  reported using artificial TG emulsions (0.1 to 2.5 mmol/l) [9,16,32]. We chose to work with a substrate concentration of 1.8 mmol/l; within these conditions, the upper linearity of the LPL activity is sufficient (70  $\mu\text{mol/l/min}$ ); however the highest LPL activity level needs a decrease of sample volume while the lowest LPL activity may need an increase of volume. The use of a substrate TG concentration set at 1.8 mmol/l offers many advantages: firstly, the substrate can be prepared from normal serums; secondly, the required amount of TG VLDL is low.

The robustness of the method is optimal. The inter-assay reproducibility (CV 7.1%) is lower than those of most conventional triolein methods (mean CV 11.6%, range 5–25%) reported from 11 different methods by Henriksen [12–15,17,29,33,34]. The correlation with a radiolabelled triolein method was tight ( $r=0.88$ ), similar to that obtained by Imamura (dioleil substrate versus labelled triolein,  $r=0.79$ ) ( $p=0.21$ ) [35]. Surprisingly, the other published methods with non-labelled soluble substrates did not provide any correlation with the conventional radiolabelled emulsion method [15–19].

Post-heparin LPL activity level in our normal controls ( $34.8 \pm 12.8 \mu\text{mol/l/min}$ ) was in the low range of those reported by the conventional method [24,36]. However, a huge heterogeneity is found amongst the published methods. The differences in normal LPL activity levels could be due to the use of different substrates, various doses of injected heparin (from 10 to 100 UI/kg body weight), apoC-II concentrations, pH of the reaction mixture, concentration of albumin, and method of inhibition of LPL and HL. All of these discrepancies were well described by Henriksen et al. who reported 11 published LPL activity assays, the reference values ranging from 25 to 362 mU/ml [34].

Our method provides a convenient tool to identify patients with a major defect in LPL activity. All patients with homozygous or compound heterozygous mutations of *LPL* and *GPIIIBP1* were below the cut off point of 10  $\mu\text{mol/l/min}$ , which is in agreement with previous reports for *LPL* and *GPIIIBP1* genes mutations [14,37]. Interestingly, except these 11 patients, all the other

TVHTG patients had LPL activities similar to control subjects, with several high LPL values, as previously reported by Coca-Prieto [14]. As expected, our 4 patients with heterozygous LPL mutations were identified in the group of TVHTG patients with normal LPL activity except for one patient who additionally had neutralising anti LPL antibodies [27]. Surprisingly, LPL activity has been poorly documented in heterozygous *LPL* mutation carriers with a history of type V hyperlipidemia. According with our findings, Surendram [8] recently described 2 *LPL* and 1 *GPIIIBP1* new heterozygous missense mutations with normal LPL activity. All these findings are consistent with the knowledge that under dietetic conditions, patients with heterozygous LPL mutations have normal or mildly increased TG levels due to sufficient residual LPL activity [38]. Interestingly, LPL activity levels in our patients with *APOA5* mutations were highly heterogeneous. Normal activity was found in one patient with a homozygous missense *APOA5* mutation (p.R343C) predicted to alter apoAV function. A very low LPL activity was found in 3 diabetic patients compound heterozygous for *APOA5* p.Q139X mutation and *APOA5* signal peptide p.S19W polymorphism. These patients were previously reported as having a very low activity using LPL activity emulsion method [24]. Finally, LPL activity was normal for 5 patients with other heterozygous deleterious *APOA5* mutations combined with the heterozygous p.S19W polymorphism. It remains possible that these variants are present on the same haplotype, leaving a functional *APOA5* allele in some of these patients. The discrepancy of LPL activity in *APOA5* deficient patients underlines the complexity of the phenotype and the necessity to have access to LPL activity in order to understand the high phenotypic variability of these patients. Occurrence of transient severe LPL deficiency might correspond to complex and not yet fully elucidated gene-gene interactions or gene-environment interactions.

In TVHTG patients, over half did not harbour any genetic mutation in *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIIIBP1*, *APOE*: 34% had only minor *APOA5* or *GPIIIBP1* defects and 26% were not found to harbour any variants in candidate genes. This distribution is in complete accordance with Surendram [8] who had 47% HTG patients without mutations in candidate genes (26% with only polymorphism and 21% with no variants) and reports from other teams [7]. However LPL activity was not systematically reported in these series. Our new method identified 2 TVHTG patients with an apparent autosomal dominant transmission, a very low LPL activity, no deleterious mutation in any usual candidate genes (including *LMFI*) and no evidence for autoimmunity (Figure 3, lane 1).

These findings illustrate the importance of accurate routine LPL activity assessment in order to decipher the phenotype of TVHTG patients. The discrepancy between hyperchylomicronemia and normal LPL activities raises the question of the role of additional regulators of heparin releasable LPL and/or molecular mechanisms leading to transient LPL deficiencies. Although less decisive than molecular genetic testing for etiologic diagnosis, the finding of low LPL activity in patients without mutation or conversely very high activity in patients supposed to have major genetic defect, raise some major questions about the regulation of TG metabolism and bring valuable information for diagnosis. Due to its robustness and its excellent reproducibility, this new method using human VLDL as natural substrate provides a convenient tool in order to explore the underlying mechanisms of misunderstood hyperchylomicronemia.

## Supporting Information

### Data S1 Optimization of substrate. (DOCX)

**Figure S1 Optimization of the assay: triglycerides concentration in the mixture.** Triglycerides concentration 25% (line); 50% (dotted line) Pool 23 (diamond); Pool 24 (circle) PHLA kinetics of 1 control plasma activity with 2 different VLDL substrates used at 2 TG concentrations (25 and 50%, i.e. TG 1.8 and 3.6 mmol/l). (DOC)

**Figure S2 PHLA measured with different triglycerides concentration substrate in the reaction.** Patient 1 PHLA = 17.4  $\mu\text{mol/l/min}$  (black line); Patient 2 PHLA = 49.2  $\mu\text{mol/l/min}$  (grey line) 100% of activity was fixed with triglycerides in the mixture at 1.8 mmol/l. (DOC)

## References

- Eckel RH (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320: 1060–1068.
- Olivecrona G, Olivecrona T (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 6: 291–305.
- Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, et al. (2010) The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 211: 1–8.
- Davies BS, Beigneux AP, Fong LG, Young SG (2012) New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol* 23: 35–42.
- Hayden MR, Ma Y (1992) Molecular genetics of human lipoprotein lipase deficiency. *Mol Cell Biochem* 113: 171–176.
- Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA (2011) Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res* 52: 189–206.
- Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, et al. (2012) Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb* 19: 1–12.
- Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, et al. (2012) Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med* 272: 185–196.
- Boberg J, Carlson LA (1964) Determination of Heparin-Induced Lipoprotein Lipase Activity in Human Plasma. *Clin Chim Acta* 10: 420–427.
- Biale Y, Shafir E (1969) Lipolytic activity toward tri- and monoglycerides in postheparin plasma. *Clin Chim Acta* 23: 413–419.
- Nilsson-Ehle P, Tornquist H, Belfrage P (1972) Rapid determination of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *Clin Chim Acta* 1972: 383–390.
- Henderson AD, Richmond W, Elkeles RS (1993) Hepatic and lipoprotein lipases selectively assayed in postheparin plasma. *Clin Chem* 39: 218–223.
- Eriksson JW, Buren J, Svensson M, Olivecrona T, Olivecrona G (2003) Postprandial regulation of blood lipids and adipose tissue lipoprotein lipase in type 2 diabetes patients and healthy control subjects. *Atherosclerosis* 166: 359–367.
- Coca-Prieto I, Valdivielso P, Olivecrona G, Ariza MJ, Rioja J, et al. (2009) Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 9: 46.
- Basu D, Manjur J, Jin W (2011) Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay. *J Lipid Res* 52: 826–832.
- McFarland JT, Rojas C (1986) 1,2-Dipalmitoyl-3- $\beta$ -2-furylacryloyltriacylglycerol: a chromophoric substrate for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Acta* 876: 438–449.
- Douset N, Negre A, Salvayre R, Rogalle P, Dang QQ, et al. (1988) Use of a fluorescent radiolabeled triacylglycerol as a substrate for lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase. *Lipids* 23: 605–608.
- Rawlyer A, Siegenthaler PA (1989) A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. *Biochim Biophys Acta* 1004: 337–344.
- Wicher I, Sattler W, Ibovnik A, Kostner GM, Zechner R, et al. (1996) Quantification of lipoprotein lipase (LPL) by dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. Comparison of immunoreactivity of LPL mass and enzyme activity of LPL. *J Immunol Methods* 192: 1–11.
- Panteghini M, Bonora R, Pagani F (2001) Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann Clin Biochem* 38: 365–370.

**Table S1 Lipids and apoproteins of the VLDL substrates (n = 40 different pools of VLDL).** (DOC)

**Table S2 Genetic variants identified in candidate genes in TVHTG patients.** (DOC)

## Acknowledgments

We would like to thank Pr Gilles Rioufol, Pr Gérard Finet, Dr François Sassolas, and Pierre-Valentin Laffitte for their contribution in control recruitment, and Dr Bénédicte Mousson de Camaret and Marjorie Dumoux for technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MDF CM SC ML PM AS. Performed the experiments: OM MB MD MM AN VPD. Analyzed the data: MDF CM SC OM MB MD MM AN VPD. Contributed reagents/materials/analysis tools: OM MB MD MM AN VPD RV. Wrote the paper: MDF CM SC ML PM AS RV.

- Hendrickson HS (1994) Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. *Anal Biochem* 219: 1–8.
- Baginsky ML, Brown WV (1979) A new method for the measurement of lipoprotein lipase in postheparin plasma using sodium dodecyl sulfate for the inactivation of hepatic triglyceride lipase. *J Lipid Res* 20: 548–556.
- Marcais C, Bernard S, Merlin M, Ullmann M, Mestre B, et al. (2000) Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. *Diabetologia* 43: 1346–1352.
- Marcais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, et al. (2005) ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* 115: 2862–2869.
- Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, et al. (2011) GPIIIBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1675–1679.
- Charrière S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, et al. (2009) Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis* 207: 150–156.
- Pruneta-Delocche V, Marcais C, Perrot L, Sassolas A, Delay M, et al. (2005) Combination of circulating antilipoprotein lipase (Anti-LPL) antibody and heterozygous S172 fsX179 mutation of LPL gene leading to chronic hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3995–3998.
- Schotz MC, Garfinkel AS, Huebotter RJ, Stewart JE (1970) A rapid assay for lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 11: 68–69.
- Huttunen JK, Ehnholm C, Kinnunen PK, Nikkila EA (1975) An immunochemical method for the selective measurement of two triglyceride lipases in human postheparin plasma. *Clin Chim Acta* 63: 335–347.
- Nilsson-Ehle P, Schotz MC (1976) A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17: 536–541.
- Nicoll A, Lewis B (1980) Evaluation of the roles of lipoprotein lipase and hepatic lipase in lipoprotein metabolism: in vivo and in vitro studies in man. *Eur J Clin Invest* 10: 487–495.
- Posner I, Wang CS, McConathy WJ (1983) Kinetics of bovine milk lipoprotein lipase and the mechanism of enzyme activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry* 22: 4041–4047.
- Blache D, Bouthillier D, Davignon J (1983) Simple, reproducible procedure for selective measurement of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Clin Chem* 29: 154–158.
- Henriksen FL, Petersen PH, Beck-Nielsen H, Horder M (2001) Calibration, specificity and trueness of a postheparin plasma lipoprotein lipase assay. *Clin Chem Lab Med* 39: 263–269.
- Imamura S, Kobayashi J, Nakajima K, Sakasegawa S, Nohara A, et al. (2008) A novel method for measuring human lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in postheparin plasma. *J Lipid Res* 49: 1431–1437.
- Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD (1989) Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 9: 326–334.
- Rahalkar AR, Giffen F, Har B, Ho J, Morrison KM, et al. (2009) Novel LPL mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 151–160.
- Ooi EM, Russell BS, Olson E, Sun SZ, Difenderfer MR, et al. (2012) Apolipoprotein B-100-containing lipoprotein metabolism in subjects with lipoprotein lipase gene mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 459–466.

## **Supplemental data S1: Optimization of substrate**

Human VLDL substrate was prepared from 10 different serum samples. Lipids and lipoproteins of each VLDL substrate were assayed before use in order to check the composition of the substrate (apoB, C-II, C-III, VLDL cholesterol and triglycerides levels: see Supplemental data Table 1 below).

### Composition of the VLDL substrate for LPL activity assay

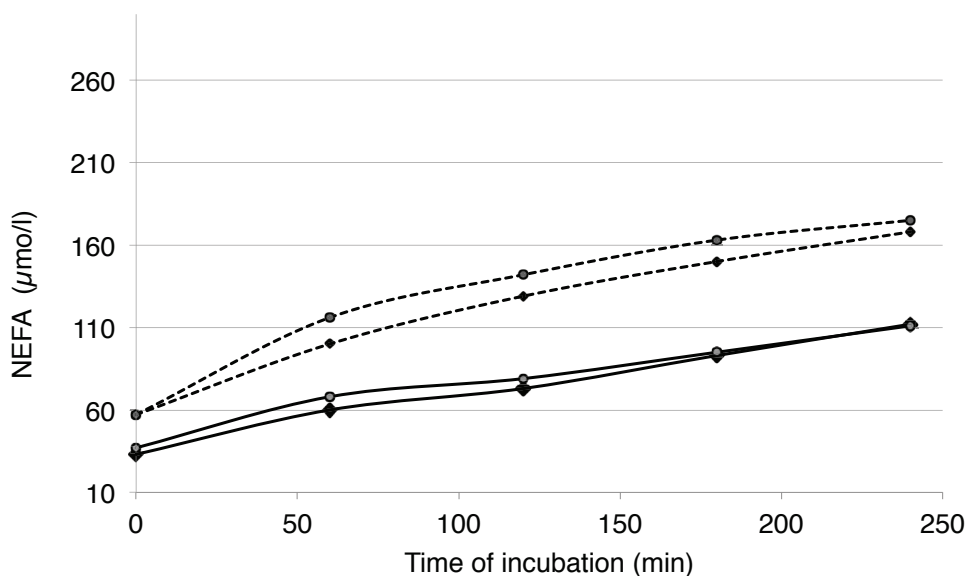
Firstly, we aimed to get the largest amount of VLDL without chylomicrons from an optimal number of normolipidemic subjects (TG <1.75 mmol/l); a pool of 10 ml of serum from 10 patients produced about 500  $\mu$ l of VLDL substrate (TG concentration about 7 mmol/l). Secondly we aimed to obtain similar lipoproteins profiles for the different pool of VLDL substrates. lipids and apolipoprotein concentrations obtained from 40 different pool of VLDL substrates were strongly homogeneous (see Supplemental data Table 1), especially for the triglycerides levels (CV 2.46%), close to 7 mmol/l; the other parameters were very reproducible and in accordance with normal VLDL profile as shown in Supplemental data Table 1; apoA1 and HDL cholesterol were undetectable.

### Choice of substrate concentration

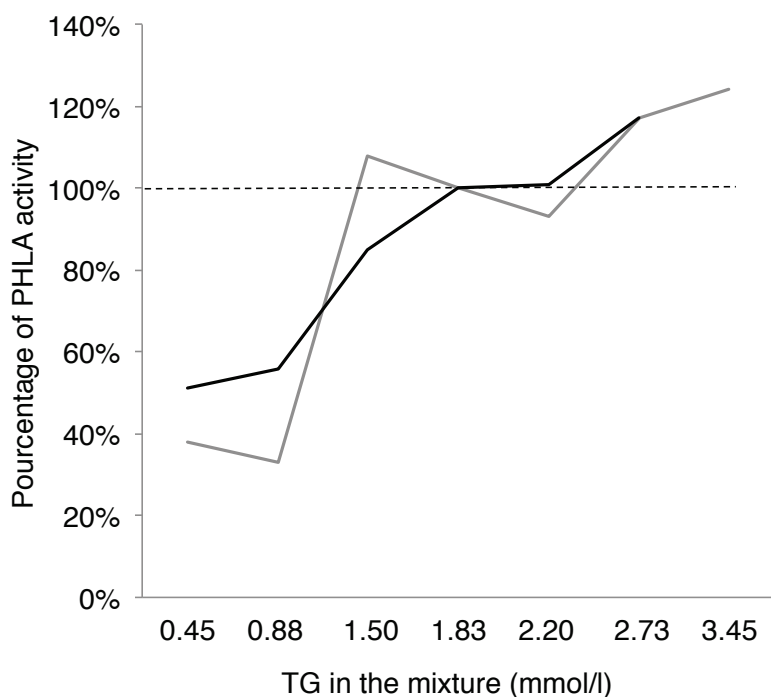
In order to establish the final TG concentration in the reagent mix (set at 1.8 mmol/l), we tested one control PHLA with 2 different VLDL substrates using 2 triglycerides concentrations in the mixture (TG 1.8 and 3.6 mmol/l). The kinetics of the reaction were linear only from 120 to 240 minutes for the mix with TG 3.6 mmol/l (see Supplemental data Figure 1); the PHLA activities of this control patient calculated in the linear range were very close to those obtained with TG at 1.8 mmol/L: respectively 23.7 and 19.8  $\mu$ mol/l/min. The HL activities were not modified.

In order to verify the optimized TG concentration chosen for the mixture (1,8 mmol/l), we tested 2 samples of patients (PHLA activity 17.4 and 49.2  $\mu$ mol/l/min) with 7 different concentrations of TG in the mixture (from 0.45 to 3.45 mmol/l) and calculated the PHLA activities from 60 to 180 minutes (see Supplemental data Figure 2); the same activity was found between 1.5 and 2.2 mmol/l of triglycerides in the different mixture and was slightly increased (+17, +24%) in the high TG concentration mixture (> 2.7 mmol/l).

**Figure S1. Optimization of the assay: triglycerides concentration in the mixture.**



**Figure S2. Post Heparin Lipase Activity measured according to different triglyceride concentrations in the the reaction substrate.**



**Table S1. Lipids and apoproteins of the VLDL substrates (n=40 different pools of VLDL).**

<b>Colonne1</b>	<b>units</b>	<b>mean</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>	<b>range</b>	<b>mean level in the MIX</b>
<b>Triglycerides</b>	mmol/l	7.29	0.18	2.46%	6.95 - 7,63	1.82
<b>Cholesterol</b>	mmol/l	5.12	0.34	4.70%	4.49 - 6,20	1.28
<b>VLDLC/TG</b>		0.31	0.02	6.40%	0.27 - 0,36	
<b>apoB</b>	g/l	0.68	0.04	5.90%	0.62 - 0,80	0.17
<b>apoC-II</b>	mg/l	142	13	9.10%	122 - 167	35.5
<b>apoC-III</b>	mg/l	302	25	8.30%	258 - 345	75.5
<b>C-II/C-III</b>		0.47	0.03	6.40%	0.39 - 0.54	



**Table S2. Genetic variants identified in candidate genes in TVHTG patients.**

Gene	Exon	Variation	Position	Missense mutations		References	Hom	Cpd	Het
				Polyphen/SIFT predictions	Truncated protein				
LPL	2	p.W91X	c.272G>A	-	yes	SNPdb rs118204070			1
	3	p.A98T	c.292G>A	Probably damaging/tolerated		Chan 2002 (1)			1
	4	p.P200LfsX7 <sup>‡</sup>	c.599del	-	yes	Pruneta-Deloche, 2005 (2)			1
	5	p.G215E	c.644G>A	Probably damaging/deleterious	yes	Reina 1992 (3)	1		
	5	p.V227A	c.680T>C			Maruyama 2004 (4)			1
	5	p.V227G	c.680T>G	Probably damaging/Deleterious		<b>New mutation</b>		1	
APOA5	5	p.I252T	c.755T>C	Probably damaging/deleterious	yes	Henderson 1998 [501]		1	
	6	p.Y315ter <sup>‡</sup>	c.945T>A	-	yes	Causeret, 2001 (6)	1		
	3	p.Q97X <sup>‡</sup>	c.283C>T	-	yes	Charrière 2009 (7)			4
	3	p.Y110LfsX158	c.327dup	-	yes	<b>New mutation</b>			1
	3	p.Q139X <sup>‡</sup>	c.415C>T	-	yes	Marçais 2005 (8)			3
	3	p.P215L	c.644C>T	Probably damaging/deleterious		SNPdb rs76753536			1
GPIIIBP1	3	p.L253P	c.758T>C	Probably damaging/deleterious		Mendoza-Barbera 2013 (9)			1
	3	p.Q295X	c.883C>T	-	yes	<b>New mutation</b>			1
	3	p.R343C	c.1027C>T	Probably damaging/deleterious		<b>New mutation</b>	1		
APOC2	3	p.C89F <sup>‡</sup>	c.266G>T	Probably damaging/deleterious		Charrière 2011 (10)		1	
	4	p.G175R <sup>‡</sup>	c.532G>C	Probably damaging/tolerated		Charrière 2011 (10)	1		
APOE		p.K41T	c.122A>C	Benigne / deleterious		Hegele (1991) (11)			1
		p.Q264R	c.791A>G	Probably damaging/deleterious		SNPdb rs120074114			1
						<b>New mutation</b>			1

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

<sup>‡</sup> mutation already published by our team ; \* compound heterozygous patient: p.C89F associated with a large deletion of the second allele

1. Chan LY, Lam CW, Mak YT, Tomlinson B, Tsang MW, et al. (2002) Genotype-phenotype studies of six novel LPL mutations in Chinese patients with hypertriglyceridemia. *Hum Mutat* 20: 232-233.
  2. Pruneta-Deloche V, Marcais C, Perrot L, Sassolas A, Delay M, et al. (2005) Combination of circulating antilipoprotein lipase (Anti-LPL) antibody and heterozygous S172 fsX179 mutation of LPL gene leading to chronic hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3995-3998.
  3. Reina M, Brunzell JD and Deeb SS (1992) Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Lipid Res* 33: 1823-1832.
  4. Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, Bujo H, Takahashi K, et al. (2004) Mutations in Japanese subjects with primary hyperlipidemia--results from the Research Committee of the Ministry of Health and Welfare of Japan since 1996. *J Atheroscler Thromb* 11: 131-145.
  5. Henderson HE, Bijvoet SM, Mannens MA, Bruin T, Erkelens DW, et al. (1998) Ile225Thr loop mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene is a de novo event. *Am J Med Genet* 78: 313-316.
  6. Causeret AS, Souillet AL, Marcais C, Prunetta V, Lachaux A, et al. (2001) [Familial hyperchylomicronemia with a new mutation of the lipoprotein lipase gene]. *Ann Dermatol Venereol* 128: 1343-1345.
  7. Charriere S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, et al. (2009) Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis* 207: 150-156.
  8. Marcais C, Verges B, Charriere S, Pruneta V, Merlin M, et al. (2005) ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* 115: 2862-2869.
  9. Mendoza-Barbera E, Julve J, Nilsson SK, Lookene A, Martin-Campos JM, et al. (2013) Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 54: 649-661.
  10. Charriere S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, et al. (2011) GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1675-1679.
- Hegele RA, Connelly PW, Maguire GF, Huff MW, Leiter L, et al. (1991) An apolipoprotein CII mutation, CII Lys19----Thr' identified in patients with hyperlipidemia. *Dis Markers* 9: 73-80

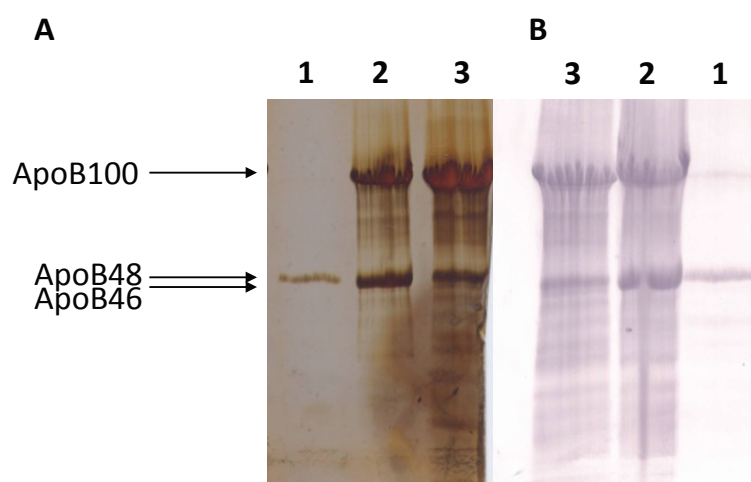
### **III. Le séquençage haut débit révèle des interactions gène/gène et une modulation du phénotype des hypertriglycémies: à propos d'un cas, résultats préliminaires**

Les mutations sur le gène *APOB* entraînent une hypocholestérolémie familiale de type 1 (FHBL1, OMIM#615558). L'hypocholestérolémie familiale est définie par une diminution du cholestérol total et LDL en dessous du 5<sup>ème</sup> percentile pour l'âge et le sexe [11, 502, 503]. Le défaut d'ApoB entraîne une diminution de sécrétion des VLDL [504]. Nous décrivons un patient diabétique de type 2 avec une obésité morbide qui présente des triglycérides normaux et une nette diminution du cholestérol LDL. L'analyse génétique a retrouvé deux mutations sur le gène *APOB* ainsi que des anomalies sur les gènes impliqués dans la lipolyse.

Ce patient est adressé en endocrinologie en juillet 2011, à 48 ans pour découverte de diabète de type 2 depuis 6 mois. Il présente une obésité morbide (IMC entre 45 et 49.3 kg/m<sup>2</sup>, un tour de taille à 123 cm, tour de hanche à 138 cm) depuis l'âge de 40 ans après prise de 50 kg en 6 ans (éthylisme chronique). Depuis la découverte du diabète, sa consommation d'alcool a été réduite à 2 verres de vin par jour. Il présente comme antécédent personnel une maladie maniaco-dépressive. Ses parents ont tous les deux présenté un infarctus du myocarde précocément (à 50 ans pour son père et 40 ans pour sa mère), ils sont tous les deux obèses et diabétiques. Deux de ses sœurs sont diabétiques de type 2 et son frère et ses deux sœurs sont obèses.

Lors de son hospitalisation, il présente une glycémie à 10.07 mmol/L, une hémoglobine glyquée à 9.4%, une cytololyse hépatique consécutive à une hépatite stéatosique avec ASAT à 1.6N et ALAT à 2N, associée à une augmentation des GGT (2.1N) sans augmentation des PAL (50 UI/L, intervalle de référence 35-130UI/L), une TSH normale à 1.1UI/L. On retrouve également une hépatosidérose éthylique avec ferritinémie très augmentée à 1124 µg/L (intervalle de référence 20-275 µg/L) et un coefficient de saturation fer/transferrine augmenté à 0.49 (0.20-0.40). Un suivi hépatique rapproché est réalisé devant le contexte et la cytololyse observée. Il présente une stéatose à l'échographie. Une biopsie hépatique est réalisée à 49ans révèle une stéatose majeure hétérogène évaluée à 80% associée à des foyers de stéato-hépatite (grade 2 de Brunt) et une fibrose modérée (grade 2 de Brunt ou équivalent F2 de Métavir) évoquant une cause dysmétabolique ou alcoolique et la présence d'une hépatosidérose intra-kupfienne peu marquée. Le fibroscan en 2013 montre un index d'élasticité peu altéré de 6.5 kPa.

Une hypobetalipoprotéinémie familiale hétérozygote est suspectée dès la première hospitalisation devant une nette diminution du cholestérol LDL à 1.20 mmol/L (intervalle de référence 2.20-4.10mmol/L) associée à une apolipoprotéine B (ApoB) basse (0.36 g/L), bien que les triglycérides soient normaux (0.80 mmol/L). En effet, nous avons observé chez les patients FHBL1 hétérozygotes avec troncation de l'ApoB diagnostiqués dans notre cohorte que les diabétiques une triglycémie plus élevée : médiane à 0.46+/-0.33 versus 0.32+/-0.11 mmol/L chez les non diabétiques (p=0.11). Une exploration a donc été réalisée et l'électrophorèse en gradient de polyacrylamide a révélé la présence d'ApoB100 normale, associée à une forme tronquée de l'ApoB estimée à 46% (cf. figure ci-dessous).



**Figure 20 : Electrophorèse de l'apoB**

(SDS PAGE, A: coloration argent ; B: western blot, piste 1 : témoin chylomicron, piste 2 VLDL, piste 3: lipoprotéines totales)

Le séquençage direct par méthode Sanger (première génération) met en évidence deux mutations sur le gène *APOB* à l'état hétérozygote: c.6286\_6287 delCA mutation entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'une protéine tronquée (**p.Gln2096Glufs\*9**) de 2103 résidus (**troncature 45,77%**) et c.3634 C>A soit **p.Leu1212Met**, mutation faux sens non tolérée d'après les logiciels de prédiction *in silico*. En l'absence d'ADN pour d'autres membres de la famille, nous ne pouvons savoir si les deux mutations sont sur le même allèle (double hétérozygote) ou sur deux allèles différents (hétérozygote composite).

Par la suite, lors de la mise en place d'une nouvelle technologie de séquençage par technique de NGS dans le laboratoire, l'ADN est de nouveau analysé par séquençage de nouvelle génération (NGS) avec une puce Ampliseq regroupant les gènes *APOB*, *RLDL*, *PCSK9*, *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *LMF1*. Brièvement, l'ADN est amplifié avec les amorces d'intérêt, puis des adaptateurs et des barre-codes permettant de distinguer les ADN des différents patients sont liés : cette étape permet la préparation des bibliothèques (Ion Ampliseq

Library kit 2, Life Technology®). Ensuite les fragments d'intérêt sont amplifiés par PCR en émulsion (amplification clonale) suivie d'un enrichissement en « Ion Sphere Particles » à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié. Les fragments sont ensuite séquencés sur PGM Ion Torrent, Life Tecnology®. Après application des filtres bioinformatiques, 38 variations sont retrouvées, dont 10 introniques n'affectant pas le site d'épissage, 11 synonymes, 5 faux sens, 2 non sens et 1 décalage du cadre de lecture. Les deux mutations sur le gène *APOB* sont confirmées, et l'étude des autres gènes révèle la présence d'autres variations associées à des hypolipidémies (gène *PCSK9*, *LPL*) et des hypertriglycéridémies (gènes *APOC2*, *APOA5*).

Le patient présente deux **anomalies qui devraient aggraver l'hypolipidémie observée dans les FHBL1**. Il est hétérozygote pour une mutation sur le gène *PCSK9*, c.2037C>A entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré : **p.C679\*** confirmée par séquençage direct. Cette mutation est répertoriée sous le rs28362286 avec une fréquence allélique de 1.7% chez les noirs américains. Cette troncature de 14 acides aminés seulement est délétère et entraîne une **hypcholestérolémie** : les hétérozygotes présentent une **diminution du LDL-C de 28%** et une patiente homozygote a été décrite avec un cholestérol LDL à 0.4 mmol/L [505-507]. Cette mutation est associée à une diminution du risque cardiovasculaire de 88% dans une population de 45-64 ans. Le patient présente en outre une variation hétérozygote sur le gène de la *LPL* associé à une **diminution plasmatique des triglycérides** avec un effet dose dépendant, une augmentation de LPL masse pré-héparinique et de l'activité post-héparinique [508]. Il s'agit du rs328 c.[1421C>G]+[=] soit **p.S474\*** (confirmée par séquençage direct). Ce polymorphisme est rapporté à la fréquence de 4,8% dans la population africaine. Il entraîne une troncature prématurée de la LPL : il manque les deux derniers acides aminés. Le mécanisme par lequel il est lié à la diminution des triglycérides n'est pas élucidé et est controversé mais cette protéine n'a pas une meilleure affinité pour Gpihbp1 [448, 509]. L'effet hypotriglycéridémiant est rapporté également chez les sujets obèses [508]. Les effets de ces deux mutations devraient théoriquement être cumulatifs avec celui des mutations de l'ApoB puisque ces anomalies entraînent : un défaut de sécrétion des VLDL (ApoB), une augmentation du catabolisme des VLDL (LPL), et de la capture des LDL (PCSK9). L'association de ces mutations devrait donc majorer le phénotype de FHBL1, ce qui n'est pas le cas ici.

L'absence de majoration de l'hypocholestérolémie et les triglycérides normaux pourraient être attribués au diabète associé aux anomalies retrouvées sur les gènes *APOC2* et *APOA5* qui devraient **favoriser l'apparition d'une hypertriglycéridémie sévère**. En effet,

premièrement ce patient présente un diabète déséquilibré (hémoglobine glyquée entre 8.2 et 11.9%). Or l'hyperglycémie est un facteur participant à l'hypertriglycéridémie chez les patients diabétiques [510, 511]; plus de 30% des diabétiques de type 2 traités ont une triglycéridémie supérieure à 2.26 mmol/L [512]. Les patients diabétiques de type 2 présentent une augmentation de la production de VLDL1-ApoB et VLDL1-TG [513]. Ce patient est également **obèse**, or les individus avec obésité viscérale et diabète de type 2 sécrètent plus d'ApoB et de VLDL-TG [514]. En outre, le patient présente des facteurs génétiques de susceptibilité à l'HTG. Le patient est **hétérozygote** *APOA5* c.[56C>G]+[=] soit **p.S19W** (rs3135506). Les porteurs de ce polymorphisme présentent des triglycéridémies significativement plus élevées que les non porteurs (2.17+/-1.30 versus 1.81+/-0.93 mmol/L, p=0.002), et les homozygotes présentent une augmentation des triglycérides de 50% [515-517]. De plus, ce polymorphisme est associé à un risque augmenté de syndrome métabolique [517]. *In vitro*, ce changement d'acide aminé diminue la translocation de l'ApoA-V dans le reticulum endoplasmique et donc sa sécrétion [518]. L'introduction de ce variant chez la souris entraîne une diminution de 50% de la concentration d'ApoA-V plasmatique [519]. Il est également hétérozygote pour une mutation faux sens sur *GPIHBP1* c.[431C>T]+[=] soit **p.S144F** (rs78367243 fréquence allélique : 3.6%) dans la partie C terminale. Cette mutation est probablement délétère selon Polyphen (score 0.969) et délétère selon SIFT (score 0.01). Cet acide aminé n'est pas directement impliqué dans la liaison à la LPL mais est proche d'une des cystéines (Cys136) du domaine Ly6 impliqué dans la liaison de la LPL [351, 375, 388]. Un patient hypertriglycéridémique homozygote a été décrit par Surendran *et al*: son activité LPL est normale mais sa LPL masse est diminuée [18]. Ceci est en faveur d'une mutation qui n'entraîne pas une perte complète de fonction. Enfin, le patient est hétérozygote *APOC2* c.**229A>C** entraînant une mutation faux sens **p.Lys77Gln** (soit p.Lys55Gln sur la protéine mature, selon l'ancienne nomenclature) (confirmée par séquençage direct). Cette anomalie est repertoriée sous le rs5126 considéré comme pathogène (NCBI ClinVar [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=17612\[AlleleID\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=17612[AlleleID])) dont la fréquence allélique est de 1,9% dans une population africaine américaine. Cette mutation affecte un acide aminé faiblement conservé, l'écart physico-chimique entre Lys et Gln est peu important, les logiciels de prediction *in silico* la considèrent comme tolérée (SIFT score 0.16), possiblement délétère (Polyphen score 0.664) ou causant une maladie (Mutation Taster). Le caractère délétère de cette mutation est difficile à déterminer : elle a été retrouvée chez 6/50 (12%) patients d'origine africaine normolipémiques mais a aussi été décrite chez 5 patients présentant une hypertriglycéridémie sévère : 4 sont porteurs obèse et/ou porteurs de l'allèle ε2; le cinquième présente une hyperlipidémie mixte [520]. La lysine 77 est situé dans la région C-terminale



activatrice de la LPL à proximité des acides aminés 85, 88, 91 et 92 et l'hélice 3 plus spécifiquement impliqués dans l'activation de la LPL [363, 424, 521]. L'étude de l'activité LPL sur des VLDL d'un de ces patients hétérozygotes ne montre pas de diminution significative de l'activité LPL [522]. Cela laisse supposer que, comme pour d'autres mutations en dehors du site d'activation de la LPL retrouvées sur le gène *APOC2*, la présence de cette mutation à l'état hétérozygote ne cause pas à elle seule une hypertriglycéridémie mais pourrait entraîner une hypertriglycéridémie en présence de facteurs génétiques ou environnementaux additionnels [421].

Même si ce patient présente une nette diminution du cholestérol LDL et une mutation sur le gène *PCSK9* associée à une diminution du risque cardiovasculaire, il devra bénéficier d'une surveillance car il présente d'autres facteurs de risque. En effet, chez les patients avec hypobetalipoprotéinémie hétérozygote ou mutation p.C679\* sur le gène *PCSK9*, la diminution du cholestérol LDL ne prévient pas la maladie cardiovasculaire en présence de l'association de plusieurs autres facteurs de risque cardiovasculaire comme (obésité+ tabac+hypertension artérielle+ augmentation de la Lpa) [507]. Il devra également bénéficier d'une surveillance hépatique rapprochée. Il présente déjà une stéatose avec fibrose probablement multifactorielle : une stéatose est retrouvée chez les patients présentant des mutations sur le gène *APOB*, *PCSK9* perte de fonction, diabétique ou obèse ; ce patient présente ces 4 anomalies simultanément [523, 524]. L'évolution vers la fibrose et la cirrhose est fréquente chez les patients présentant des mutations sur le gène *APOB* (article 4, J Hepatol 2014) y compris lorsqu'ils sont seulement hétérozygotes, même sans facteur de risque : un patient de 27 ans (IMC à 24kg/m<sup>2</sup>, non diabétique et ne consommant pas d'alcool) a été greffé hépatique suite à une cirrhose [525].

A notre connaissance, c'est la première étude qui explore simultanément les gènes impliqués dans la production et le catabolisme des lipoprotéines et leur capture par le récepteur des LDL. Des modulations des hypercholestérolémies liées à des mutations sur le gène *LDLR* par des mutations sur le gène *APOB* ont déjà été mises en évidence [526], mais, ce cas clinique est le premier à mettre en évidence les interrelations gènes-gènes et les modulations de phénotype chez les patients présentant des anomalies de production des lipoprotéines contenant des triglycérides et des anomalies de leur lipolyse. Il illustre également toute la complexité de l'interprétation des données acquises par NGS.

## **Troisième partie : Discussion**

## **Etude des cohortes de patients présentant une hypocholestérolémie familiale**

La synthèse bibliographique (Articles 1-3, Annexe 3) nous a permis de faire une description des cas et une synthèse des mutations retrouvées. Au total, concernant la maladie de rétention des chylomicrons (OMIM#246700), 40 patients homozygotes ou hétérozygotes composites issus de 24 familles ont été décrits. 17 mutations différentes ont été rapportées entraînant 10 mutations faux sens et 7 protéines tronquées (délétions, insertions avec décalage du cadre de lecture et mutations touchant le site d'épissage). 67 patients issus de 58 familles présentent une abétalipoprotéïnémie (ABL, OMIM#200100). 53 mutations différentes ont été rapportées dont seulement 8 mutations faux sens. 41 sujets issus de 27 familles présentent une hypobetalipoprotéïnémie (OMIM#615558) homozygote ou hétérozygote composite (Ho-FHBL). 35 mutations différentes ont été rapportées dont seulement 3 mutations faux sens.

La synthèse de ces 158 patients présentant une hypocholestérolémie familiale par défaut de la synthèse ou de la sécrétion des chylomicrons et des VLDL a soulevé plusieurs questions.

### **Quel est le rôle des protéines ApoB, MTTP et Sar1b dans la sécrétion des chylomicrons?**

L'ApoB et la MTTP sont indispensables à la synthèse des chylomicrons. En absence de ces protéines, il n'y a pas de synthèse de chylomicrons.

La protéine Sar1b semble être importante pour la synthèse et/ou la sécrétion des chylomicrons puisque chez les patients présentant des mutations sur le gène *SAR1B* la sécrétion des chylomicrons n'est pas normale. *In vitro*, les PCTV peuvent se former en l'absence de protéine Sar1b grâce aux protéines LFABP/FABP1 et I-FABP/FABP2, qui peuvent initier la formation des PCTV. Cependant, les vésicules qui se forment dans ces conditions sont incapables de fusionner avec le Golgi : la présence des protéines Sar1 et Sec24C est indispensable pour cette fusion [156, 221, 284]. De plus chez les patients CMRD, la protéine LFABP/FABP1 est en quantité diminuée dans les biopsies intestinales [220]. Ceci explique très probablement le déficit de formation des chylomicrons observé chez les patients atteints de cette maladie. Nous avons montré (Annexe 3) que les mutations faux-sens retrouvées en pathologie humaine sont localisées à l'extérieur de la structure tridimensionnelle de la protéine Sar1b, à proximité du site de reconnaissance, de liaison et hydrolyse du GTP et des sites de liaison de Sec23 et Sec 31 suggérant le rôle primordial de la

liaison du GTP et du recrutement des autres protéines COPII dans la sécrétion des chylomicrons.

L'étude des biopsies intestinales de patients montre la présence de vacuoles lipidiques entourées d'une membrane (contrairement aux ABL) qui pourraient être des PCTV incapables de fusionner avec le Golgi [284, 527]. Il y a des arguments en faveur d'une sécrétion, probablement faible, de chylomicrons ayant transité par le Golgi, puisque les cellules intestinales de patients CMRD en culture sécrètent de façon retardée des lipoprotéines contenant de l'ApoB48 et les biopsies de patients montrent la présence d'ApoB48 glycosylée [286, 528]. De plus une augmentation, faible, de la triglycéridémie est observée chez 3 patients avec mutation identifiée après charge en graisses [527, 529]. Comme il existe des phénomènes de compensation de l'une par l'autre des protéines Sar1, y compris pour la sécrétion de protéines de grande taille, le procollagène-I par exemple, on peut se demander si la protéine Sar1a peut permettre la sécrétion de chylomicrons. Dans les biopsies intestinales, normalement la quantité d'ARNm *SAR1B* est >200 fois plus importante que celle de *SAR1A* [162, 190] ; chez les patients CMRD l'expression du gène *SAR1A* est augmentée (1,4 à 2,7 fois) [530]. Cependant, Sar1b a une affinité plus faible que Sar1a pour le complexe Sec13/Sec31 [176]. La protéine Sar1a surexprimée pourrait remplacer Sar1b dans certaines fonctions mais son affinité plus importante pour le complexe Sec13/Sec31 ne permettrait pas la formation de vésicules très larges et la protéine Sar1a module moins bien la rigidité des membranes que la protéine Sar1b [161, 176]. Enfin la surexpression de la protéine Sar1a dans les cellules McArdle RH777 diminue la sécrétion d'ApoB48 [162]. La protéine Sar1a ne semble donc pas pouvoir permettre la sécrétion faible de chylomicrons.

### **Conséquences de l'absence de protéine MTP ou d'ApoB fonctionnelle sur le foie**

L'ApoB et la MTP permettent la formation et la sécrétion hépatique des VLDL. La production des VLDL doit être synchronisée avec sa sécrétion pour éviter la stéatose hépatique [531].

Nous avons montré que les patients présentant un défaut de MTP fonctionnelle ou d'ApoB100 normale présentent un risque très augmenté de stéatoses hépatiques avec une évolution fréquente vers la fibrose (article n°3).

Notre étude montre une stéatose chez tous les patients ABL chez lesquels elle a été recherchée. Ceci confirme chez l'Homme les résultats observés chez les souris MTP ko conditionnelle hépatique qui présentent des gouttelettes lipidiques et une stéatose hépatique modérée cependant sans inflammation et sans augmentation des ALAT ASAT plasmatiques,

cette stéatose étant plus importante en cas d'alimentation riche en graisses [106, 110, 126]. Ces gouttelettes lipidiques sont formées en l'absence de MTP fonctionnelle : il serait intéressant d'étudier leur composition et de voir si elle est identique à celle des gouttelettes lipidiques formées en présence de MTP. Cela permettrait de mieux comprendre le rôle de la protéine MTP dans la formation des gouttelettes lipidiques car il a été montré qu'en cas d'anomalies de protéines impliquées dans la formation de ces gouttelettes, elles peuvent devenir moins sensibles à la lipolyse (cf. ci-dessous).

Notre étude a également mis en évidence une évolution fréquente vers la NASH et la fibrose qui n'avaient pas été mises en évidence chez la souris à notre connaissance, sauf en présence de toxines bactériennes (inflammation avec nécrose focalisée) [126]. Ces éléments sont importants à prendre en compte puisqu'un inhibiteur de la MTP, le lomitapide, est maintenant utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote. Les essais de phase 3 ont montré des anomalies hépatiques [14-16]. 1/3 des patients présentent une élévation des enzymes hépatiques supérieure à 3 fois la limite supérieure, et chez 40% d'entre eux supérieure à 5 fois la limite supérieure ; chez la souris l'inhibition de la MTTP entraîne une augmentation des enzymes hépatiques secondaire au stress dans le RE [532]. Chez les patients traités par lomitapide, une augmentation du contenu intra-hépatique en triglycérides de 1% à 8,6% à la 26<sup>ème</sup> semaine a également été observée avec une stéatose de plus de 20% chez au moins 1 patient, et une stabilisation ensuite. Les changements de contenu intra-hépatique des triglycérides sont corrélés négativement avec le changement d'ApoB à 26 semaines ( $p \leq 0.01$ ) mais l'effet est non significatif à 56 semaines ( $p = 0.36$ ). Cette relation entre la concentration en ApoB et la stéatose n'a pas été retrouvée dans notre étude. D'autres médicaments (amineptine, amiodarone, pirprofen, tétracycline, tianeptine) entraînant des stéatoses hépatiques, inhibent également l'activité MTP [533]. Enfin, chez l'Homme, une diminution d'expression de la MTTP liée à un polymorphisme augmente le risque de NAFLD [534]. L'inhibition pharmacologique ou par polymorphisme de la MTP entraîne donc des stéatoses chez l'Homme. Une surveillance hépatique est donc préconisée chez les patients traités par lomitapide mais également chez les hétérozygotes *MTTP* à la recherche d'une stéatose hépatique et de signes d'évolution vers la fibrose, et ceci d'autant plus que le foie des souris *MTP<sup>+/-</sup>* contient une quantité plus importante de cholestérol et de triglycérides que les souris wt et montre des signes d'accumulation de lipides en coloration à Oil Red-O [124]. Les molécules inhibant L-FABP/FABP1 pourraient avoir un intérêt pharmacologique chez l'Homme puisque l'inhibition simultanée de *Mttp* et *Lfabp/Fabp1* entraîne une diminution de la sécrétion de VLDL sans stéatose hépatique chez la souris [114].

Notre étude montre également une stéatose chez la plupart des patients avec hypobetalipoprotéïnémie homozygote ou hétérozygote composite chez lesquels elle a été recherchée. Jusqu'à présent, une atteinte hépatique était connue chez les hétérozygotes mais plusieurs études mentionnaient que les mutations sur le gène *APOB* seules n'étaient pas suffisantes et n'étaient associées à une stéatose qu'en cas d'association à d'autres facteurs concourants aux anomalies hépatiques (obésité, diabète, consommation d'alcool). Notre étude montre que les mutations sur le gène *APOB* entraînent à elles seules des anomalies hépatiques.

La réduction d'ARNm de l'ApoB par un antisens réduit la production de VLDL par les cellules HepG2, chez la souris, sans augmentation des ALAT ASAT sans stéatose hépatique [77, 78]. Chez l'Homme, le mipomersen, un antisens anti-ApoB a été testé chez des patients présentant une hypercholestérolémie familiale hétérozygote ou homozygote [12, 13]. Il est commercialisé pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote. Dans les deux études, une augmentation des ALAT supérieure à 3 fois la limite supérieure a été observée chez 4/36 et 4/28 patients : 2 n'ont pas de stéatose hépatique, 2 présentent une stéatose ou une augmentation de 9,6 à 24,8% du contenu intra-hépatique en triglycérides (avec une baisse de 75% du cholestérol LDL atteignant ainsi une concentration inférieure à 1,8 mmol/L) et un patient présentant une hépatomégalie sans stéatose [12, 13]. Il est donc indispensable d'explorer le foie à la recherche d'une stéatose hépatique chez les hétérozygotes *APOB* qui présentent également une hypoLDLémie et chez les patients traités par mipomersen et ceci d'autant plus que des patients hétérozygotes *APOB* sans facteur de risque particulier (jeune, poids normal, non diabétique) ont développé des cirrhoses hépatiques et été transplantés [525].

Nous avons également mis en évidence une évolution fréquente vers la fibrose sans que des facteurs étiologiques précis aient été clairement identifiés. Les patients Ho-FHBL présentent également un surpoids et certains une insulino-résistance mais le faible effectif de la cohorte ne permet pas de conclure quant au lien de cause à effet. De nombreuses protéines ont été impliquées dans la stéatose. Nous pouvons plus particulièrement nous intéresser à *PNPLA3* (patatin-like phospholipid domain containing protein 3). Chez l'Homme, le polymorphisme p.I148M (rs738409) est associé à un risque augmenté de stéatose hépatique et a récemment été impliqué dans une augmentation du risque d'évolution vers la fibrose [535-538]. Chez l'Homme, cette variation est associée à des anomalies de compositions des gouttelettes lipidiques (augmentation de la quantité de protéine PNPLA3 associée aux gouttelettes), et pourrait générer des gouttelettes plus résistantes à l'hydrolyse [537, 539]. Or la présence de ce



polymorphisme est associée une diminution de sécrétion des VLDL<sub>1</sub> [536]. L'implication de ce polymorphisme sur une protéine impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques dans la stéatose et la fibrose montre le rôle potentiel des anomalies de formation des gouttelettes lipidiques dans la sécrétion des VLDL et en pathologie humaine. Plus récemment, le polymorphisme p.Glu167Lys (rs58542926) sur la protéine TM6SF2 (transmembrane 6 superfamily member 2), dont le rôle précis n'est pas connu, a été associé à la NAFLD et à l'évolution vers la fibrose [540, 541]. Ce polymorphisme est également associé à une diminution de la sécrétion des VLDL et une diminution du cholestérol total et des triglycérides plasmatiques [540]. Cette protéine est exprimée dans l'intestin et le foie et est localisée dans le RE et le compartiment ERGIC<sup>3</sup> (ER-Golgi intermediate compartment) [542]. L'inhibition par un siRNA (cellules Huh7 et HepG2) est associée à une diminution de sécrétion des VLDL, une diminution des triglycérides et du cholestérol total plasmatique, une augmentation des triglycérides intra-hépatiques et du contenu en gouttelettes lipidiques alors que sa surexpression réduit la stéatose [448, 542]. La surexpression chez la souris entraîne une augmentation du cholestérol total et LDL, des triglycérides et une diminution du cholestérol HDL [448, 543].

L'ABL, l'Ho-FHBL et les polymorphismes de *PNPLA3* et *TM6SF2* soulignent le risque de stéatose en cas d'altération de l'efflux des VLDL quel qu'en soit la cause.

### **Quel est le rôle de la protéine Sar1b dans la sécrétion des VLDL? Pourquoi les patients présentent-ils moins de stéatose que dans les autres hypocholestérolémies par défaut de sécrétion ?**

Nous avons longtemps pensé que la protéine Sar1b n'intervenait pas dans la synthèse/sécrétion des VLDL pour plusieurs raisons. Premièrement, dans notre revue de la littérature, les patients présentent une triglycéridémie normale en moyenne : nous utilisons d'ailleurs cette caractéristique pour distinguer cette pathologie des autres hypocholestérolémies familiales avec défaut de sécrétion des chylomicrons (abetalipoprotéïnémie, hypobetalipoprotéïnémie familiale). Deuxièmement, il est possible d'isoler des lipoprotéines flottant à la densité des VLDL (données du laboratoire, [543]). Troisièmement, il ne semble pas y avoir un blocage total de la sécrétion des lipoprotéines hépatiques puisque ces patients présentent moins de stéatose que ceux atteints d'abetalipoprotéïnémie ou hypobetalipoprotéïnémie familiale (5 cas sur 10 versus 20/20 dans l'ABL et 14/16 chez les Ho-FHBL) et à notre connaissance aucun cas de fibrose ou de

---

<sup>3</sup> Compartiment entre le RE et le Golgi

cirrhose n'a été décrit. Enfin, les VLDL ayant une taille moins importante (30 à 75nm de diamètre) que les chylomicrons (100-500 nm de diamètre), les mécanismes intracellulaires mis en jeu pour la sécrétion des VLDL pourraient être différents de ceux des chylomicrons ; dans les données actuelles, les protéines mises en jeu pour la formation des vésicules de transports VTV et PCTV des VLDL et chylomicrons respectivement sont différentes et ces vésicules sont composés de protéines différentes (cf. Figure 16 p. 56 et Tableau 2 p. 55).

Pourtant, les études cinétiques réalisées chez deux patients mutés montrent une diminution de production de l'ApoB-VLDL [543]. Les travaux récents de Fryer *et al* ont mis en évidence le rôle de la protéine Sar1b dans la sécrétion des lipoprotéines contenant de l'ApoB100 à partir de cellules McArdle RH7777. Dans cette étude, seule la protéine Sar1b peut assurer une sécrétion efficace des lipoprotéines contenant l'ApoB et la surexpression de Sar1b multiplie par 3 la quantité d'ApoB48 et d'ApoB100 sécrétées [162] ; au contraire, la surexpression d'un mutant *SAR1B* qui lie le GTP mais ne l'hydrolyse pas (*SAR1B p.H79G*) diminue de 90% environ la sécrétion d'ApoB100 et d'ApoB48 [162]. Cependant la concentration d'ApoB des patients CMRD est diminuée de 50% environ et non de 90%. La sécrétion résiduelle de VLDL pourrait être assurée par la protéine Sar1a puisque les VLDL sont des lipoprotéines de plus petite taille que les chylomicrons. Cependant, Fryer *et al* ont mis en évidence que la surexpression de la protéine Sar1a diminue de 90% environ la sécrétion d'ApoB100 et d'ApoB48 [162]. Ces résultats sont étonnants, les mécanismes conduisant à la sécrétion de VLDL chez ces patients restent à élucider. Deux pistes peuvent être envisagées : un transport par des protéines COPII recrutant des protéines particulières (KLHL12) ou une autre voie. Le complexe CUL3-KLHL12 catalysant l'ubiquitinylation de Sec 31 est impliqué dans la formation des vésicules de grande taille [544]. Or, récemment, une étude sur cellules McArdle RH7777 a montré que KLHL12 facilite le transport et la sécrétion des lipoprotéines contenant de l'ApoB [71]. La protéine KLHL12 est exprimée de façon ubiquitaire ([http://www.nextprot.org/db/entry/NX\\_Q53G59/expression](http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q53G59/expression)) mais son effet semble plus important sur la sécrétion d'ApoB100 que sur celle de l'ApoB48 [71]. Ce système pourrait être impliqué dans la sécrétion de VLDL observée les patients CMRD. La deuxième possibilité est l'existence d'un transport indépendant des vésicules COPII en l'absence de protéine Sar1; cependant ce transport n'est pas efficace pour certaines molécules de grande taille (procollagène I) [190]. L'étude protéomique des VLDL des patients CMRD et la comparaison au profil protéique de VLDL de témoins pourrait aider à une meilleure compréhension de leur sécrétion.

La question de la triglycéridémie normale observée chez ces patients est donc entière : si leur anomalie de protéine Sar1b empêche une sécrétion normale des VLDL, comment ces patients ont-ils une triglycéridémie normale ? Une piste à explorer pourrait être un défaut de lipolyse. En effet, les études cinétiques réalisées chez deux de ces patients (mutations homozygotes p.Glu166\* et p.Gly37Arg) montrent une diminution de la conversion des VLDL en IDL [543]. La triglycéridémie normale pourrait donc refléter un défaut de production masqué par un défaut de catabolisme. L'activité LPL post-héparinique a déjà été mesurée dans une cohorte de 8 patients (dont 3 avec mutation causale sur le gène *SAR1B* retrouvée) et a été retrouvée abaissée [527, 545]. Le mécanisme causal n'est pas identifié. Le rôle de la protéine Sar1b dans l'export de la LPL entre le RE et le Golgi n'est pas connu; par contre la sécrétion des protéines GPI anchored est réalisée par des vésicules COPII et dépend de Sar1 sans qu'on sache s'il s'agit de Sar1a ou de Sar1b [546]. La protéine Sar1b est exprimée dans les myocytes ; son expression dans les cellules endothéliales capillaires et les adipocytes n'est pas connue chez l'Homme. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de la protéine Sar1b et son rôle dans la sécrétion de la LPL et de GPIHBP1 sur des modèles cellulaires adéquats.

### **HDL et sécrétion des VLDL chez ces patients avec défaut qualitatif ou quantitatif de sécrétion des VLDL**

Nos études ont mis en évidence des résultats surprenants concernant les HDL chez ces patients présentant une hypocholestérolémie par défaut de sécrétion des VLDL et/ou chylomicrons.

Nous observons une nette diminution du cholestérol HDL chez les patients présentant une abetalipoprotéïnémie (absence de sécrétion des VLDL et des chylomicrons). La baisse du cholestérol HDL pourrait être due à un défaut de sécrétion des chylomicrons. Les protéines MTP et ABCA1 contribuent à elles deux à plus de 95% de l'absorption intestinale du cholestérol [128]. 30% du cholestérol sécrété par l'intestin est sécrété dans les HDL, et l'intestin contribue à la synthèse de 30% des HDL plasmatiques *in vivo* [128, 547].

Cependant, les patients présentant une maladie de rétention des chylomicrons, ne sécrétant pas de chylomicrons mais sécrétant des VLDL ont un cholestérol HDL plus bas (Annexes 3 et 4). La taille du pool d'ApoA1 est diminuée de 50% chez deux patients par rapport à des contrôles [543]. Cette concentration abaissée est la conséquence d'une diminution de production de 70% environ et d'une augmentation du catabolisme (multiplié par 1.3 à 1.7) [543]. Le défaut de production pourrait avoir deux origines : un défaut de synthèse des pré $\beta$ -HDL par l'intestin (et le foie) et/ou un défaut de synthèse des HDL par

défaut de composition ou conformation de VLDL et de chylomicrons à lipolyser. Cependant les patients avec maladie de rétention de chylomicrons sécrètent plus de VLDL que les patients (ABL) et devraient avoir une concentration en HDL plus élevée que les ABL si on ne retient que la deuxième hypothèse. On peut donc se demander si l'absence de Sar1b pourrait jouer un rôle dans la diminution de production des pré $\beta$ -HDL, ou en tous cas si le défaut de protéine Sar1b fonctionnelle empêche une sécrétion normale des HDL. Les PCTV ne contiennent pas d'apoA1 suggérant un mécanisme de transport différent [156, 157]. Par contre, les protéines impliquées dans la formation des PCTV pourraient être moins disponibles du fait du recyclage moins important par défaut de liaison des PCTV au Golgi. Un autre mécanisme pourrait être des modulations différentes d'expression des récepteurs facteurs nucléaires ou d'autres protéines en fonction de la localisation subcellulaire du blocage de sécrétion des chylomicrons. Une revue a récemment mis en évidence le rôle de ces récepteurs intestinaux dans le métabolisme des HDL [548]. Des modulations d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme intestinal du cholestérol ont été mises en évidence chez les souris MTP ko conditionnelles, notamment une diminution d'expression du gène *NPC1L1* de plus de 80% et des gènes *ABCG5* et *ABCG8* et une augmentation de l'expression du gène de l'HMGCoA reductase [128, 130]. Ces modulations d'expression des gènes n'ont pas été étudiées à notre connaissance chez les souris Sar1b ko. Enfin, l'augmentation du catabolisme pourrait être due à leur composition : leurs HDL sont enrichies en apoE [529, 543].

Chez les patients présentant une hypobetalipoprotéïnémie, nous avons observé une concentration de cholestérol HDL basse mais variable et corrélée avec la taille de la troncation : les patients présentant des troncatures de petite taille ont des concentrations de cholestérol HDL extrêmement basses alors que ceux présentant des troncatures de grande taille ont des concentrations de cholestérol HDL supérieures à 2 mmol/l (Article 3, [549, 550]). Ceci soulève deux questions : pourquoi la présence d'ApoB tronquée est associée à une diminution du cholestérol HDL et pourquoi l'existence d'une protéine de 80-90% est associée à des concentrations élevées de cholestérol HDL.

La présence de l'ApoB tronquée pourrait prévenir la synthèse et/ou la sécrétion de l'ApoA-I. L'utilisation de siRNA anti-ApoB réduisant l'ApoB de 85% sur culture de cellules HepG2 ne diminue pas l'apoA1 [77]. L'ApoB et l'apoA1 sont transportées du RE vers le Golgi de façon séparée, cependant l'ApoB37 inhibe la sécrétion de l'ApoA1 et de l'ApoE [300, 551]. *In vivo*, les études chez les hétérozygotes montrent que les plus petites troncatures sont principalement sécrétées dans les HDL (et seulement dans les HDL quand les troncatures sont  $\leq$  31%). La présence de petites troncatures d'ApoB peut perturber la synthèse normale des HDL [552, 553].

Les VLDL sécrétées par ces patients pourraient également influencer le catabolisme des HDL. Une concentration de cholestérol HDL élevée est également retrouvée chez les patients hétérozygotes pour des troncatures (cf. poster EAS 2014, Annexe 5) sans effet de la taille de la troncature. Or après charge en graisse chez les patients Ho-FHBL, nous avons observé une augmentation des triglycérides sanguins jusqu'à 6 fois la concentration basale, également corrélée avec la taille de la troncature (troncature de taille > 34.8%). Cette augmentation pourrait être due à une augmentation de la synthèse de triglycérides-VLDL dans le contexte de stéatose et d'insulinorésistance [554, 555]. Or chez le sujet obèse, il existe un lien entre le catabolisme de l'apoA1, la production des VLDL1-triglycérides (et la stéatose), le catabolisme des VLDL et l'indice HOMA-IR [556, 557]; chez les sujets obèses et non obèses, le catabolisme de l'apoA1-HDL est corrélé positivement à la production des VLDL-ApoB et du HDL-ApoA1 [556]. Des études cinétiques chez ces patients pourraient être utiles pour explorer ces anomalies de production/catabolisme des HDL et le lien avec la composition des VLDL.

### **Obésité, insulinorésistance dans les hypocholestérolémies par défaut de sécrétion des VLDL, rôle de la protéine MTP dans la formation du tissu adipeux ?**

L'obésité, généralement définie par une accumulation de triglycérides dans le tissu adipeux blanc [558]. Nous avons montré que les patients Ho-FHBL présentent un surpoids ou une obésité et ceci pose question. En effet, ce surpoids ou cette obésité sont retrouvées même chez les patients ayant présenté un retard de croissance dans l'enfance et ayant une malabsorption (troncature précoce de l'ApoB). De plus, nous avons montré que l'insulinorésistance est fréquente chez les patients Ho-FHBL. Au contraire les patients ABL, présentent dans l'enfance un retard de croissance mais restent maigres ou avec un BMI normal.

Dans les deux pathologies, les patients présentent un défaut de sécrétion des VLDL et la stéatose est fréquente. Une étude montre que chez la souris, les VLDL ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la délivrance des triglycérides aux tissus périphériques [531]. Cependant le modèle de souris utilisé dans cette étude pouvait sécréter des chylomicrons.

En revanche, chez ces patients, les protéines mutées sont différentes (ApoB ou MTTP) et ceci pourrait expliquer la différence de stockage des triglycérides. A notre connaissance, le stockage musculaire des triglycérides et l'adiposité n'a pas été étudié chez les souris *ApoB* conditionnelle, et n'ont été étudiés que chez des souris *Mttp*<sup>-/-</sup> conditionnelles hépatiques, ne sécrétant pas de VLDL mais avec une sécrétion normale de chylomicrons. Dans ces conditions, le stockage musculaire des triglycérides et l'adiposité sont normaux [531].

Cependant dans ce modèle, seule la *Mttp* hépatique est invalidée. Les souris *Mttp* conditionnelles intestinales présentent une diminution de la concentration en acides gras libres à jeûn [128]. Or la MTTP est retrouvée dans le tissu adipeux blanc et brun chez la souris et chez l'Homme, autours des gouttelettes lipidiques, et dans ces tissus, une activité de transfert des lipides est faible mais mesurable [95, 96]. La MTTP jouerait un rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques hépatiques [110-112] mais son rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques des autres tissus reste à définir.

Il serait donc intéressant d'étudier d'une part l'effet de l'invalidation du gène *MTTP* sur les adipocytes et d'autre part de comparer les profils d'expression des gènes et la composition des gouttelettes lipidiques des adipocytes de patients FHBL homozygotes par rapport à des témoins pour voir s'il existe des mécanismes adaptatifs en cas d'absence de VLDL et de chylomicrons circulants.

Par ailleurs, ces anomalies peuvent être rapprochées de l'hypolipémie combinée familiale (FHBL2) par mutation du gène *ANGPTL3*. Ces patients présentent également une diminution du pool de VLDL circulant par défaut de synthèse mais également hypercatabolisme (augmentation de l'activité LPL) [450, 451]. Comme les patients Ho-FHBL, ils sont en moyenne en surpoids mais ne présentent pas d'augmentation de la prévalence de la stéatose, bien qu'un cas de stéatose sévère (16,7%) ait été décrit chez une femme avec un IMC à 41 kg/m<sup>2</sup> [451]. Ces patients n'ont pas d'insulinorésistance (aucun cas de diabète), et au contraire une meilleure sensibilité à l'insuline [451, 559]. Ces observations encouragent à rechercher un lien entre obésité, insulinorésistance et ApoB.

### **La protéine Sar1b a-t-elle d'autres rôle en dehors de la sécrétion des lipoprotéines ?**

Les manifestations cliniques retrouvées chez les patients atteints de CMRD sont principalement en relation avec un défaut de sécrétion des lipoprotéines ou leur conséquence (malabsorption, stéatorrhée, un retard de croissance et un défaut d'absorption des vitamines liposolubles). Cette spécificité est assez étonnante puisque comme nous l'avons vu dans la première partie, la protéine Sar1 est indispensable à la formation des vésicules COPII qui permet le transport de nombreuses molécules cargo (facteurs de croissance, récepteurs de surface cellulaire, canaux transmembranaies, protéines de la matrice extracellulaire sans que nous sachions exactement quel est le rôle respectif des deux protéines paralogues Sar1a et Sar1b [560]. Cependant, cette spécificité de symptômes est retrouvée lors de la mutation d'autres protéines impliquées dans le trafic entre le RE et le Golgi en pathologie humaine. L'exemple des protéines Sec23a et Sec23b est particulièrement intéressant puisque les



mutations faux sens sur les deux protéines paralogues entraînent des phénotypes distincts : une dysplasie cranio-lenticulo-suturale (CLSD) due à une mauvaise sécrétion du procollagène pour *SEC23A* et une anémie congénitale dyserythropoïétique de type II (CDAII) sur *SEC23B* [561, 562]. Différentes hypothèses sont possibles. Première hypothèse, le transport des cargos est habituellement assuré par la protéine Sar1a, et la protéine Sar1b est exclusivement réservée au transport des lipoprotéines. La protéine Sar1a présente une plus forte homologie avec la protéine Sar1p de levure [159]. Un argument indirect est l'absence de mutation retrouvée sur le gène *SARIA* en pathologie humaine, et la présence de mutations entraînant une troncature de la protéine Sar1b, alors qu'aucun homozygote pour des troncsures de Sec23a ou b n'a été identifié [563]. Cependant, dans ce cas, on peut s'étonner de la localisation cellulaire de la protéine Sar1b, également retrouvée en dehors des sites principaux de production des lipoprotéines : cerveau, cœur, muscle squelettique, thymus, rate, rein, placenta, poumons [7]. Deuxième hypothèse, il existe chez ces malades un mécanisme permettant de pallier l'absence de protéine Sar1b fonctionnelle. La protéine Sar1a pourrait suffisamment compenser l'absence de protéine Sar1b fonctionnelle. En effet, la redondance de fonction des protéines Sar1 a été mise en évidence grâce à l'étude de la CLSD : in vitro, Sar1b est utilisée pour la sécrétion du procollagène, mais en cas de déplétion en Sar1a ou Sar1b, la sécrétion du procollagène n'est pas affectée car la déplétion est compensée par l'autre paralogue [176, 564]. Les protéines impliquées dans le trafic entre le RE et le Golgi assurent probablement des fonctions majoritairement redondantes en plus de quelques fonctions spécifiques et/ou des profils d'expression tissus-spécifiques ou stimulus-spécifique si bien que dans certaines conditions, la protéine paralogue ou le mécanisme accessoire mis en place n'est pas en mesure de compenser l'insuffisance.

Dans ce contexte, nous pouvons quand même noter que plusieurs patients CMRD présentent également

1/ des anomalies musculaires : 12/13 patients présentent des CPK augmentées, certains patients souffrent de crampes musculaires et une accumulation de lipides dans les fibres musculaires a été observée chez 2 patients [530, 565-567]. La protéine Sar1b est fortement exprimée dans le muscle squelettique [7]. Sa fonction précise dans ce tissu n'est pas connue mais sa présence ainsi que l'observation de ces anomalies chez les patients CMRD nous laissent penser que cette protéine a un rôle spécifique dans ce tissu. Le rôle de la protéine Sar1 (a ou b ?) dans le transport du récepteur calcique humain a été démontré [154].

2/ une cardiomyopathie : un patient CMRD présente en outre une cardiomyopathie [566]. Des cas de cardiomyopathies ont été décrits chez des patients ABL (Article 3) et l'expression de la

MTTP est augmentée chez la souris obèse, atténuant ainsi l'accumulation de triglycérides [568]. On peut donc se demander si la cardiopathie observée chez un patient CMRD est liée au défaut de protéine Sar1b ou au défaut de sécrétion de lipoprotéines par le cœur, organe minoritaire pour la production des LP.

Le rôle de la protéine Sar1b en dehors de la production des lipoprotéines est donc à établir. Une étude fine du phénotype de ces patients est une occasion unique d'appréhender le rôle spécifique de la protéine Sar1b en physiologie humaine

### Cas complexes

Dans l'ABL et la CMRD, quelques cas sont atypiques et soulèvent la question d'interaction gène/gène ou gène/environnement.

Le premier cas complexe de CMRD a été décrit par Céfalu *et al* [569]: une patiente homozygote a été découverte fortuitement au cours de l'exploration familiale d'un cas typique. Cette femme de 21 ans découverte par hasard est dite « homozygote » pour une mutation délétère (p.L28fs\*34) : contrairement à tous les autres cas, elle ne présente pas de signe de CMRD ni de malabsorption, est même au contraire obèse (BMI 31,6 kg/m<sup>2</sup>) et son bilan lipidique est normal (cholestérol total 4,9 mmol/L, triglycérides 1,6 mmol/L, HDL 1,97 mmol/L, LDL-C 2,2 mmol/L)[569]. Les auteurs n'ont pas mentionné s'ils avaient utilisé plusieurs couples de PCR pour le séquençage afin d'exclure un problème technique et le statut génétique de ses parents n'est pas connu. Etant donné le caractère atypique de cette patiente et l'absence de confirmation par plusieurs amplifications, cette patiente n'avait pas été retenue dans l'article de synthèse (Annexe 3). En cas de confirmation du caractère homozygote, une recherche de mutation sur un gène hypercholestérolémiant pouvant « normaliser » le profil pourrait être intéressante.

Le deuxième cas de CMRD est la famille récemment décrite par Magnolo *et al* [570]. Les patients qu'ils soient homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation p.E62K présentent tous une hypocholestérolémie touchant la fraction LDL uniquement (HDL normaux à 1,32 mmol/L) ; un hétérozygote présente un bilan lipidique sensiblement normal. *In silico* cette mutation est délétère (Polyphen, SIFT) et la modélisation a mis en évidence une perte de liaison hydrogène avec Glu63 (Annexe 3). Cette mutation pourrait avoir un effet dominant négatif : *in vitro*, des mutants à effet dominant négatif sont utilisés, empêchant l'hydrolyse du GTP, cependant le résidu Glu63 n'est pas directement impliqué dans la liaison du GTP. Les gènes *APOB*, *PCSK9*, *ANGPTL3*, *MTTP*, ont tous été explorés et aucune mutation ponctuelle

n'a été retrouvée dans cette famille. Une étude familiale plus élargie pourrait être utile ainsi que la recherche de mutations sur de nouveaux gènes.

6 patients ABL présentent une symptomatologie atypique ou modérée. Dans un cas, la patiente est hétérozygote pour une mutation faux sens délétère et une mutation intronique n'affectant pas totalement l'épissage ce qui expliquerait le phénotype (Article 3). Dans les 5 autres cas, la modulation du phénotype ABL par d'autres mécanismes peut être suspectée.

### **Perspectives de recherche dans les hypocholestérolémies familiales par défaut de synthèse**

Enfin d'autres patients présentant un phénotype de malabsorption intestinale type CMRD ont été explorés, chez lesquels aucune mutation ponctuelle du gène *SARIB* n'a été mise en évidence. L'un d'entre eux présente une disomie uniparentale du chromosome 7 laissant suspecter une mutation sur un gène situé sur ce chromosome et 5 autres patients négatifs issus de 3 familles différentes sont mentionnés dans cet article [571]. Au laboratoire, 5 patients présentant un phénotype compatible avec une CMRD une ABL ou une malabsorption intestinale ont été explorés sans que des mutations sur les gènes *SARIB*, *MTTP* ou *APOB* n'aient été retrouvées.

D'après les fonctions des protéines dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines contenant des triglycérides, d'autres gènes pourraient être explorés.

Chez les patients présentant une malabsorption intestinale, des recherches de mutations sur le gène *APOBEC1* pourraient être envisagées. Chez l'Homme, actuellement, aucune mutation du gène *APOBEC1* n'a été rapportée. Cependant, compte tenu de sa place primordiale dans la synthèse d'ApoB48 et dans l'absorption intestinale des graisses, une recherche de mutation chez les patients présentant une malabsorption semble intéressante. Il est difficile d'extrapoler le phénotype de ces patients à partir des modèles souris KO puisque les hépatocytes de souris produisent également de l'ApoB48. La protéine VAMP7 semble jouer un rôle important dans la sécrétion intestinale des triglycérides. Cette protéine co-localise avec Sar1 dans les cellules intestinales et diminue le transfert des triglycérides entre le RE et Golgi de 85% sans affecter la sécrétions des protéines nouvellement synthétisées [322]. En revanche cette protéine est absente du foie et rein [322].

D'autres protéines dont le rôle est mal défini chez l'Homme, mais dont la délétion entraîne une accumulation intestinale des triglycérides chez certains animaux, pourraient être explorées. Par exemple, nous pouvons citer la protéine KLF3 qui régule l'expression des gènes homologues aux gènes *MTTP* et *APOB* chez *Caenorhabditis elegans* et dont la délétion

entraîne une accumulation intestinale de triglycérides [321]. Chez la souris, cette protéine a été impliquée dans la régulation du poids, l'adipogénèse et la tolérance au glucose et certaines cardiomyopathies [572, 573], cependant son rôle dans la sécrétion des lipoprotéines n'est pas connu.

Chez les patients présentant un déficit combiné de synthèse et/ou de lipidation des VLDL et des chylomicrons, des recherches de mutations pourraient être menées sur les gènes impliqués dans la dégradation de l'ApoB par la voie ERAD. Par exemple, la protéine Hsp110 stabilise l'ApoB et empêche sa dégradation par voie ERAD [574]: l'inhibition d'Hsp 110 pourrait être responsable d'hypocholestérolémie. De plus les protéines impliquées dans la lipidation des lipoprotéines ou le métabolisme des gouttelettes lipidiques semblent également jouer un rôle crucial dans la sécrétion des VLDL. Nous pouvons envisager par exemple d'étudier la protéine Cideb ou PGC1- $\alpha$  qui régule l'expression de la protéine Cideb dont la surexpression entraîne une augmentation de la sécrétion des VLDL [208]. La perilipine2 semble également intéressante puisque le polymorphisme p.S251P (rs35568725) modifiant une hélice  $\alpha$  est associé chez l'Homme à des concentrations de triglycérides et des TG-VLDL plus basses ( $p < 0.05$ ) [575].

Enfin, il faut garder à l'esprit que même si la symptomatologie n'est pas la même (absence de signes digestifs par exemple), une activation de la lipolyse entraîne un bilan lipidique similaire à celui d'une hypocholestérolémie par défaut de sécrétion. En effet, les mutations sur le gène *ANGPTL3* entraînent une diminution du cholestérol total portant sur les fractions LDL et HDL associée à une hypotriglycémie et ce phénotype lipidique équivalent à celui des CMRD (cf. poster EAS 2014 en annexe 4)[450, 451, 559]. De plus, des mutations délétères (p.R19\* et p.A23T) du gène *APOC3* sont associées à une diminution des triglycérides et une accélération du turnover des VLDL. Les hétérozygotes p.K58E ont une concentration en triglycérides de 0.35 mmol/L en moyenne (0.28 – 0.54 mmol/L) [576-578]. L'exploration des protéines activant la LPL pourrait être utile chez les patients présentant une hypocholestérolémie sans signes digestifs ou hépatiques d'accumulation des lipides associés.

## Mesure d'activité LPL post-héparinique

Nous avons mis au point une technique de mesure d'activité LPL post-héparinique robuste (bonne répétabilité et fidélité intermédiaire) qui présente en outre l'avantage d'utiliser le substrat physiologique de la LPL: des VLDL humains. Les techniques habituellement employées utilisent un substrat chimique, la trioléine, qui en plus de présenter des problèmes de reproductibilité dus aux difficultés de solubilisation, n'est pas le substrat naturel de la LPL.

### **L'activité LPL post-héparinique avec substrat VLDL est-elle une bonne méthode pour identifier les patients présentant un déficit génétique sur les gènes *LPL*, *APOA5*, *GPIHBP1* et *LMF1* ?**

Dans notre étude, une diminution d'activité a été observée chez les cinq patients testés homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations délétères sur les gènes *LPL* (n=3) et *GPIHBP1* (n=2).

Les patients homozygotes pour des mutations sur le gène *LPL* présentent une protéine tronquée (p.Y315\*) pour l'un, et une mutation faux sens p.G215E (p.G188E selon l'ancienne nomenclature). La mutation p.G215E entraîne une perte d'activité catalytique (substrat trioléine) *in vivo* et *in vitro* une diminution de liaison aux HSPG, une perte de fonction catalytique et une accélération la dissociation spontanée des dimères [425, 579-581]. Le troisième patient est hétérozygote composite pour deux mutation faux sens : p.V227G (nouvelle mutation, délétère selon les logiciels de prediction *in silico*) et p.I252T déjà décrite [501].

L'activité LPL post héparinique des deux patients mutés sur *GPIHBP1* est retrouvée <10 µmol/L/min et est bien corrélée avec l'activité mesurée avec substrat trioléine publiée par Charrière et al [386]. Dans la littérature, l'activité LPL post héparinique des patients homozygotes ou hétérozygotes composites *GPIHBP1* (p.C65Y, p.C65S, p.C68G, p.C68Y, p.C68R, p.C89F hémizygote, p.S107C, p.T111P, p.Q115P, p.V138\*, p.G175R, délétion exons 3 et 4, délétion de 17,5kb) est extrêmement basse voire indetectable chez pratiquement tous les patients et de libération retardée [381, 385-393]. Seuls deux homozygotes p.G56R, présentant un type V, ont une activité LPL normale avec substrat trioléine, cependant, le caractère délétère de p.G56R est débattu : ce variant est exporté sur la membrane cellulaire normalement, lie la LPL, les LRTG et l'ApoA-V de la même façon que la protéine normale [381, 582, 583]. Concernant les autres mutations, les hétérozygotes présentent un profil lipidique normal, cependant leur activité LPL peut être normale ou inférieure à 50% de celle

des témoins dans l'étude de Franssen *et al* [381, 387]. Nous n'avons pas testé de patients hétérozygotes avec notre technique.

Théoriquement, cette mesure devrait permettre de dépister des mutations *LMFI* qui présentent un déficit combiné en LPL et HL cependant nous n'avons pas pu tester notre technique (absence d'activité PHLP disponible pour des patients déficitaires *LMFI*)[461]. Notre méthode permet simultanément une mesure de l'activité HL mais est moins sensible pour l'activité HL (moyenne 3.33 +/-2.01µmol/L/min chez les témoins) que pour l'activité LPL.

En revanche, dans notre étude, l'activité LPL n'est pas différente de celles des témoins pour les 4 patients hétérozygotes pour des mutations de la LPL ou chez 8/12 patients homozygotes ou hétérozygotes pour des mutations de l'ApoA-V.

Ces mutations *LPL* sont pourtant délétères. Il s'agit d'une troncature prématurée p.W91\*, p.P2000Lfs\*7 et de deux mutations faux sens déjà décrites : p.A98T et p.V227A [584, 585]. Dans certaines études, les patients hétérozygotes LPL présentent une activité entre 50 et 70% de l'activité de témoins [586, 587]. Les raisons de cette différence ne sont sans doute pas le fait des seules différences techniques. En effet, les porteurs de mêmes mutations testés avec la même technique peuvent présenter des activités normales ou abaissées [501, 584]. Dans l'étude de Murase *et al* regroupant des hétérozygotes pour 9 mutations différentes (faux sens, troncature prématurée), avec la même technique (trioléine), la moyenne est 25% plus basse que chez les témoins, 10/15 ont une activité LPL comprise dans l'intervalle de référence. Dans cette étude, l'activité LPL dépend du sexe : elle est plus basse chez les femmes hétérozygotes [587].

Cette méthode ne permet pas de mettre en évidence un défaut d'activité LPL chez les porteurs de mutations sur l'*APOA5*. Le patient homozygote p.R343C a une activité LPL à 58,4 µmol/L/min (témoin 34.8+/- 12.8 µmol/L/min). Cette nouvelle mutation faux sens, considérée comme délétère par les logiciels de prédiction *in silico* Alamut et SIFT, est comprise dans un domaine de liaison aux lipides, et la présence de cette cystéine supplémentaire pourrait entraîner la formation d'une liaison disulfure et la formation de dimères et multimères comme c'est le cas pour la mutation p.G271C [411, 588]. Le dosage d'ApoA-V, la réalisation d'un western Blott et l'expression de cette protéine mutante pourraient être utiles pour une meilleure compréhension de son caractère délétère.

L'activité LPL n'est retrouvée diminuée que chez 3/11 hétérozygotes *APOA5*. De plus, 5 patients avec mutation hétérozygote sur le gène *APOA5* ont eu une mesure d'activité selon les deux techniques, avec substrat trioléine et VLDL : 3/5 sont concordants (très nette baisse



d'activité retrouvée dans les deux méthodes), en revanche 2 patients présentent une activité LPL normale avec substrat VLDL et une activité diminuée de 50% avec substrat trioléïne. Ces deux patients mettent en évidence une discordance entre les deux techniques. L'utilisation d'un pool de VLDL plutôt que d'un substrat non lipoprotéique pourrait apporter de l'ApoA-V et empêcher de mettre en évidence un déficit en ApoA-V; nous n'avons jamais dosé ou recherché l'ApoA-V par blott sur les pools de VLDL. Dans la littérature, les données concernant l'apport d'ApoA-V sur l'activité LPL *in vitro* sont contradictoires : selon certains, l'ApoA-V n'active pas la LPL et l'activité LPL libre (non liée aux HSPG) est identique que le substrat VLDL contienne de l'ApoA-V ou non [397, 398]; au contraire, pour d'autres, l'activité LPL *in vitro* est nettement diminuée lorsque les VLDL ne contiennent pas d'ApoA-V et augmentée quand les VLDL sont enrichis en ApoA-V [396, 407]. Par ailleurs, la mesure d'activité LPL avec substrat trioléïne ne permet pas non plus systématiquement de mettre en évidence un déficit d'ApoA-V. En effet, dans la littérature, 1/ 2 patients homozygotes (p.Q97\* et p.A6\_A13 del) ont des activités LPL normales alors qu'il n'ont pas d'ApoA-V détectable (western Blott ou ELISA)[402, 415] 2/ chez des patients homozygotes pour la même mutation, (p.Q97\*), l'un présente une activité normale, et l'autre une activité <10% des témoins)[402, 413] 3/ concernant les hétérozygotes, 5 autres hétérozygotes ont également des activités LPL normales [401, 411, 413, 420, 589] 4/ pour tous ces patients avec activité LPL normale, l'activité a été mesurée avec trois techniques différentes utilisant toutes un substrat trioléïne et non des VLDL ; l'ApoA-V n'a donc pas été apportée par le substrat.

Les arguments retrouvés dans la littérature concernant les hétérozygotes *LPL* et les porteurs de mutations sur le gène *APOA5* avec activité LPL basse, suggèrent l'existence de facteurs additionnels responsables de la diminution d'activité LPL. L'expression phénotypique de ces déficits partiels peut être modulée par d'autres facteurs génétiques et environnementaux comme la diététique, l'obésité, l'insulino-resistance, l'hypertension, le diabète, les hormones (sexe, traitements estrogènes, grossesse), et les traitements diurétiques thiazidiques et antagonistes beta adrénergiques [370, 587, 590]. Certains cas laissent suspecter des interactions complexes : une patiente **hétérozygote** p.Q97\* sur *APOA5* a présenté une hypertriglycémie jusqu'à 22,6 mmol/L avec comme seul facteur favorisant retrouvé un BMI à 28; après perte de poids et utilisation d'huiles de poisson, ses triglycérides se sont complètement normalisés (0,8 mmol/L) [369]. De la même façon, une **homozygote** p.Q97\* sur *APOA5*, qui a présenté des triglycérides jusqu'à 112 mmol/L (patiente ayant la plus forte augmentation des triglycérides avec cette mutation), présente ensuite une triglycémie **normale à 1,6 mmol/L** sous traitement diététique associé à des fibrates et de l'acide nicotinique ; malheureusement, aucun dosage d'ApoA-V ni mesure d'activité LPL n'ont été

réalisés [591]. Ces deux patientes posent la question de mécanismes compensatoires. Enfin, la présence dans cette famille d'un frère hétérozygote p.S19W non porteur de la mutation, diabétique et qui présente des triglycérides compris entre 5 et < 22 mmol/L pose la question de l'association à une autre cause génétique participant à l'hypertriglycéridémie dans cette famille.

En conclusion, cette méthode permet de dépister les patients présentant un déficit complet de l'activité lipolytique de la LPL quel qu'en soit le mécanisme : LPL non fonctionnelle (mutation sur le gène *LPL* affectant l'activité catalytique) ou non sécrétée (absence de *GPIHBP1* ou de *LMF1* théoriquement (non testé)). Cependant cette méthode ne permet pas de mettre systématiquement en évidence les déficits en ApoA-V.

### **Que faire devant la découverte d'une activité LPL <10µmol/L/min ?**

La découverte d'une activité LPL abaissée incite à compléter des explorations génétiques sur les gènes *LPL* et *GPIHBP1* dans un premier temps. Dans la littérature, la découverte d'activité LPL post-héparinique nulle a permis de trouver des hétérozygotes composites sur le gène *LPL* et d'identifier des mutations sur la LPL entraînant une abolition de la liaison LPL-GPIHBP1 et l'absence de transport à travers la cellule [348, 592]. En l'absence de mutation ponctuelle exonique, la recherche de grands réarrangements doit être envisagée, par PCR long range ou détermination des CNV (copy number variation). En effet, des grands réarrangements ont déjà été mis en évidence sur le gène *GPIHBP1* chez 3 patients [386, 391, 593]; de même plusieurs grands réarrangements ont déjà été mis en évidence sur le gène *LPL* [371]. Il pourrait également être utile de rechercher des mutations dans les séquences régulatrices du gène *LPL*. En effet, des mutations ponctuelles ont été identifiées chez l'Homme à proximité de la séquence octamère de la LPL associées à une augmentation des triglycérides sériques et une diminution de l'activité et de la masse de LPL [590].

En l'absence de mutation homozygote ou hétérozygote composite, il faut poursuivre en séquençant le gène *APOA5* et en recherchant des facteurs génétiques (polymorphismes de susceptibilité sur le gène *APOA5* ou *APOC2*) ou environnementaux associés (cf. précédemment).

Nous avons également mis en évidence une activité <10µmol/L chez deux patients porteurs de polymorphismes mineurs (groupe 2) avec une histoire familiale d'hyperchylomicronémie. L'un d'entre eux est également porteur d'une mutation p.Q246R hétérozygote sur le gène *APOE*. Cette mutation délétère selon les logiciels Polyphen et Sift remplaçant un acide aminé acide par un acide aminé alcalin (pI 5.7 versus 10.7) entraîne une

modification du pI (pI plus alcalin que l'apoE4 objectivée par isoélectrophorèse). Bien que l'apoE soit clairement impliquée dans la recapture hépatique des remnants, le lien avec la diminution de l'activité LPL retrouvé chez ce patient n'est pas évident. Dans la littérature, une patiente avec hypertriglycémie majeure, pancréatite en post-partum et déficit partiel d'activité LPL (152 versus 164 à 284 ng/ml) a déjà été rapportée, lié, selon les auteurs, à son génotype 2/3 [594] mais 1/ le déficit est plus modéré que celui retrouvé chez notre patient et 2/ seul le gène *LPL* a été séquencé (*APOA5* et *GPIBPI* non séquencés). Le rôle de l'ApoE dans la lipolyse elle-même est controversé puisque certaines études montrent que l'ApoE favorise la lipolyse *in vitro* alors que d'autres montrent l'absence de rôle ou un rôle inhibiteur de l'ApoE [433, 478, 595-598]; l'ApoE libre ou intégrée à des lipoprotéines pauvres en triglycides pourrait inhiber la lipolyse alors que l'ApoE intégrée dans des lipoprotéines riches en triglycides pourrait l'activer [474]. L'ApoE via des résidus arginine et le fragment 139-153 de l'ApoE inhiberaient l'activité LPL *in vitro* et *in vivo* de façon dose dépendante [596, 597]. Cependant la quantité d'ApoE dans les 10µl de prise d'essai pour la mesure d'activité LPL ne semble pas suffisante pour inhiber la réaction *in vitro*. Les autres hypothèses possibles seraient que l'ApoE diminue la sécrétion de LPL ou augmente sa liaison avec les HSPG (empêche le relargage par l'injection d'héparine) ou augmente sa catalyse. La mutation p.Q246R modifie un acide aminé d'un des deux domaines de liaison de l'ApoE aux HSPG (résidus 243 à 272, masqué par les lipides) or un défaut d'interaction entre ApoE et HSPG pourrait être associé à un défaut de lipolyse des LRTG par la LPL liée aux HSPG [599, 600]. Le rôle de l'ApoE sur l'activité LPL n'est pas évident ; pourtant, le génotype de l'ApoE influence la modulation d'activité LPL par l'entraînement physique [601]. Le rôle de l'ApoE dans la lipolyse mérite d'être étudié plus précisément aussi bien chez ce patient avec une étude familiale, qu'en population générale.

L'existence de ces activités LPL basses en présence de mutations hétérozygotes avec facteur favorisant, ou sans cause génétique identifiée encourage 1/ à déterminer systématiquement l'activité LPL en complément et parallèlement à l'étude génétique, et 2/ dans les familles avec hypertriglycémie sévère et déficit en LPL sans cause génétique identifiée, à rechercher d'autres causes génétiques en lien avec la sécrétion ou la liaison de la LPL aux HSPG par séquençage de l'exome.

### **Autres applications de la mesure d'activité LPL, perspectives**

Nous avons mis en évidence 6 patients avec une activité LPL très élevée, nettement supérieure à celle des témoins présentant dans leurs antécédents une hypertriglycémie sévère. Ce résultat est surprenant : pourquoi des patients avec activité LPL augmentée

présentent-ils des antécédents d'hypertriglycéridémie majeure ? Le jour du test, ces patients présentaient des triglycérides compris entre 1.2 et 9.2 mmol/L (moyenne 5.43 mmol/L). L'existence d'activité LPL élevée chez des patients hypertriglycéridémiques à distance de l'épisode aigu apparaît aussi dans l'étude de Coca-Prieto [602]. On peut penser que des mécanismes compensatoires d'un défaut de lipolyse entraînent une surexpression du gène *LPL*, par contre, on ne comprend pas pourquoi ces patients présentent une hypertriglycéridémie. Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées : une surproduction de LRTG qui dépasserait les capacités de la LPL, un défaut de ces lipoprotéines empêchant leur lipolyse, la présence d'inhibiteurs de la LPL en grande quantité (autoanticorps, Angptl3, Angptl4) empêchant son activité *in vivo*. Ces éléments sont à étudier chez ces patients et à confronter à leur diminution de triglycérides lors du test, à la protéomique et la lipidomique de leur chylomicrons et/ou VLDL.

Dans la littérature, l'injection d'héparine chez les souris *gpihbp1<sup>-/-</sup>* et les patients avec mutation homozygote ou hétérozygote composite délétère sur le gène *GPIHBP1* présentent un relargage retardé même si la concentration de LPL masse ou activité ne se normalise pas chez l'Homme [377, 381, 385, 389]. De plus, les concentrations de triglycérides sanguins diminuent de 20mM à 6mM pour un homozygote p.Q115P après infusion d'héparine, de 25% environ en 5 à 30 min après un bolus de 100 U/kg chez deux homozygotes (del 17,5kb et p.C68Y) et deux patients homozygotes ont été découverts lors d'une extension familiale avec des hypertriglycéridémies < 10 mmol/L et aucun symptôme [381, 385, 593]. Enfin, un patient a été décrit avec LPL nulle à T10 et normale après infusion d'héparine pendant 5h ([603]abstract). Ceci suggère, qu'il existe deux pools de LPL, un lié à GPIHBP1 à la surface cellulaire, relarguable rapidement après injection d'héparine et un autre probablement extravasculaire : ceci est compatible avec l'hypothèse de Djik *et al* (cf. Figure 17 p.67) [377, 464]. Il paraît donc intéressant d'étudier la cinétique de relargage de la LPL sur 60 min en particulier chez les patients qui présentent un déficit en LPL à 10 min et chez lesquels aucune mutation n'a été retrouvée sur *LPL* et *GPIHBP1*, mais également chez tous les patients pour lesquels aucune mutation n'a été retrouvée. Nous avons également observé une diminution de 22.4 à 12.9 mmol/L de triglycérides chez une patiente homozygote *LPL* (c.945T>A soit p.Tyr315\* soit une protéine de 66% de la taille habituelle) après injection d'héparine. Cela pose la question du mécanisme de lipolyse observée *in vivo* après injection d'héparine chez des patients totalement déficitaires en LPL.

L'injection d'héparine pour détacher la LPL des HSPG permet de mesurer l'activité LPL mais 1/ l'injection d'héparine n'est pas sans danger pour les patients et est contraignante

2/ le fait de détacher la LPL des HSPG ne correspond pas à ce qui se passe au cours de la lipolyse intravasculaire 3/ la lipolyse n'est pas mesurée sur le propre substrat de la LPL (les VLDL du patient) mais soit sur un substrat synthétique, soit avec notre technique sur des VLDL « normales ». La mesure d'activité LPL liée aux VLDL du patient permet de s'affranchir de l'injection d'héparine: au cours de la lipolyse, les lipoprotéines avec de la LPL liée se détachent de l'endothélium vasculaire et se retrouvent dans la circulation générale. Cette mesure permet, en complément de l'activité LPL post-héparinique, de tester la liaison de la LPL aux propres VLDL du patient [604, 605]. Une autre possibilité est de développer un essai *in vitro* de lipolyse des VLDL des patients utilisant la LPL liée aux HSPG ce qui permet de tester la liaison VLDL-LPL-HSPG [606].

Pour conclure, la mesure d'activité LPL chez les patients hypertriglycéridémiques sans mutation identifiée sur les gènes *LPL*, *GPIHBP1*, et *APOC2* pourrait permettre d'identifier des mécanismes indépendants du défaut de lipolyse par la LPL elle-même. Cette mesure permet de déterminer s'ils ont un authentique défaut de lipolyse, ou s'il faut plutôt s'orienter vers une autre cause comme une surproduction de lipoprotéines ou un défaut de recapture des remnants. L'importance de la capture des LRTG par les héparanes sulfates a été démontrée récemment [405], des études chez l'Homme sont maintenant requises pour déterminer le rôle de l'altération des héparanes sulfates dans la recapture dans les hypertriglycéridémies et l'athérosclérose.

## Interaction gène/gène

Nous avons mis en évidence à plusieurs reprises la possibilité d'interaction gène gène modulant le phénotype des patients atypiques dans les hypocholestérolémies et dans les hypertriglycéridémies inexplicables aussi bien avec déficit d'activité LPL qu'avec activité LPL augmentée mais existence d'une hypertriglycéridémie.

Les résultats préliminaires du cas clinique présenté dans la dernière partie de nos travaux illustrent ces interrelations et les modulations de phénotype qui peuvent être observées au sein des familles présentant des anomalies génétiques. Des normalisations de cholestérolémies chez des patients avec hypercholestérolémie familiale due à une mutation sur le gène *LDLR* par des mutations hypocholestérolémiantes sur les gènes *APOB* et *PCSK9* ont déjà été rapportées [19, 20], mais à notre connaissance, nous décrivons le premier cas d'interrelation entre les gènes des hypertriglycéridémies et les gènes hypocholestérolémiants (*APOB*, *PCSK9*). De plus d'autres interrelations épi ou nutri-génomiques existent probablement et contribuent à l'expression variable des hyper ou hypolipidémies [607].



## Conclusions

Notre travail a consisté d'abord en une recherche bibliographique des mécanismes généraux de production et de lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides. Ainsi, nous avons mieux compris leur métabolisme. Les mécanismes conduisant à la production des VLDL sont importants à connaître puisqu'un défaut des protéines impliquées dans la synthèse entraîne une hypocholestérolémie mais également une augmentation de leur expression pourrait être responsable d'hyperlipidémies mixtes ou d'hypertriglycéridémie. En effet, les études sur modèles cellulaires ou animaux montrent qu'une augmentation d'expression de ces protéines entraîne une hypersécrétion de VLDL ou de chylomicrons. Il est également important de connaître les mécanismes responsables de la lipolyse de ces lipoprotéines puisqu'en cas de défaut, on observe une accumulation de lipoprotéines riches en triglycérides et qu'inversement une augmentation de la lipolyse entraîne une hypolipidémie.

Dans un second temps, nous avons ensuite mis au point les différentes techniques moléculaires permettant de rechercher des mutations sur le gène *SAR1B* pour le diagnostic moléculaire de la CMRD. Le laboratoire s'est progressivement spécialisé dans le diagnostic des hypocholestérolémies d'origine génétique (séquençage des gènes *APOB*, *MTTP*, *SAR1B*, *ANGPTL3*, *PCSK9*) et des méthodes d'étude de l'impact des mutations ont été mises en place: activité MTP sur biopsies hépatiques et intestinales, minigènes pour l'étude de l'impact des mutations introniques. Nous avons réalisé une revue complète de tous les cas de maladie de rétention des chylomicrons, d'abetalipoprotéïnémie et d'hypobetalipoprotéïnémie homozygote ou hétérozygote composite avec mutation délétère identifiée. Cette étude permet de mieux comprendre l'impact des mutations de ces gènes chez l'Homme sur la sécrétion et le métabolisme des lipoprotéines, sur l'intestin, le foie et le risque de développer des stéatoses, mais également sur le muscle et le stockage adipocytaire des triglycérides. Cette étude a mis en évidence plusieurs axes de recherche et notamment l'étude de la composition des VLDL et leur catabolisme, l'impact de la production de VLDL dans des conditions pathologiques sur la concentration d'HDL, l'étude des gouttelettes lipidiques musculaire en cas de mutations sur le gène *MTTP*. L'impact de ces mutations sur le métabolisme hépatique, la formation des gouttelettes lipidiques, la stéatose et l'évolution vers la fibrose correspond également à un axe de recherche intéressant mais qui pose le problème éthique d'accessibilité au tissu hépatique humain. Enfin plusieurs gènes pourraient faire l'objet d'une étude moléculaire chez les patients pour lesquels aucune mutation n'a été identifiée : deux approches sont possibles, soit une approche gène candidat, soit un séquençage de l'exome, à condition que les exons des gènes d'intérêt soient bien inclus dans l'analyse de l'exome proposée.

Nous avons mis au point une méthode d'exploration phénotypique des patients présentant une hypertriglycéridémie majeure en mesurant l'activité LPL post-héparinique *in vitro*. Cet outil, indispensable pour réaliser une étude fonctionnelle de la LPL, permet de dépister des anomalies fonctionnelles de la LPL mais a également montré des déficits chez des patients ne présentant pas de mutation du gène *LPL* laissant supposer l'existence de facteurs additionnels modulant l'expression ou l'activité de la LPL. Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour poursuivre l'étude phénotypique des patients avec activité LPL normale mais présentant une hypertriglycéridémie par l'étude de : l'activité LPL sur leur propres VLDL, la cinétique de libération de la LPL, les modifications des lipoprotéines au cours de la lipolyse induite par l'injection d'héparine, la composition de leur lipoprotéines riches en triglycérides par analyse protéomique et lipidomique.

Nous avons montré à travers un exemple précis que les interrelations gène/gène modulent l'expression de mutations. Nous avons décidé de mettre en place le diagnostic moléculaire grâce à la technologie NGS qui permet l'analyse de plusieurs gènes simultanément et nous avons choisi d'explorer simultanément les principaux gènes impliqués dans les dyslipidémies. Cette stratégie devrait nous permettre une corrélation génotype-phénotype plus fine que l'exploration des seuls gènes directement impliqués dans les pathologies.

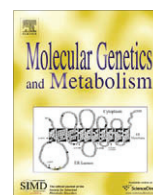
En conclusion, la stratégie d'exploration des anomalies du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides ne cesse d'évoluer à la suite des découvertes de ces 10 dernières années. Il reste indispensable de conduire des corrélations phénotype-génotypes méticuleuses et systématiques pour permettre une meilleure compréhension de ce métabolisme à partir des modèles privilégiés que fournit la clinique.

## **Annexes**



Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymgme](http://www.elsevier.com/locate/ymgme)

## Chylomicron retention disease: A long term study of two cohorts

Noel Peretti<sup>a,h</sup>, Claude C. Roy<sup>b</sup>, Agnès Sassolas<sup>c</sup>, Colette Deslandres<sup>b</sup>, Eric Drouin<sup>b</sup>, Andrée Rasquin<sup>b</sup>, Ernest Seidman<sup>d</sup>, Pierre Brochu<sup>e</sup>, Marie-Claude Vohl<sup>f,g</sup>, Sylvie Labarge<sup>h,j</sup>, Raymonde Bouvier<sup>i,j</sup>, Marie-Elizabeth Samson-Bouma<sup>k</sup>, Mathilde Charcosset<sup>c</sup>, Alain Lachaux<sup>h,j</sup>, Emile Levy<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, GI-Nutrition Unit, 3175 Ste-Catherine Road, Montreal, Que., Canada H3T 1C5

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Que., Canada

<sup>c</sup> UF Dyslipidemia Laboratory, Centre de Biologie Est, Lyon, France

<sup>d</sup> Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montreal, Que., Canada

<sup>e</sup> Department of Pathology, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Que., Canada

<sup>f</sup> CRML, CHUL Research Centre, Université Laval, Que., Canada

<sup>g</sup> Nutraceuticals and Functional Foods Institute (INAF), Université Laval, Que., Canada

<sup>h</sup> Department of Nutrition-Hepatogastroenterology, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, Université Lyon 1, Lyon F-69003, France

<sup>i</sup> Department of Pathology, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, Université Lyon 1, Lyon F-69003, France

<sup>j</sup> INSERM, U-870, INRA U-1235, Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69002, France

<sup>k</sup> INSERM U781, Université Paris Descartes, Clinique M. Lamy, Hôpital Necker-Enfants- Malades, 149 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 February 2009

Accepted 9 February 2009

Available online 20 February 2009

## Keywords:

*Sar1B* gene mutations

Fatty acid composition

Cholesterol

Apolipoproteins

Liposoluble vitamins

## ABSTRACT

Lipoprotein assembly is critical for the intestinal absorption of dietary lipids and of fat-soluble vitamins. Through their inhibition of chylomicron secretion, mutations of the *Sar1B* gene coding for *Sar1* GTPase are associated with chylomicron retention disease (CRD). The aim of this study was to describe the phenotypic expression of CRD in two clinically and genetically well characterized cohorts, and to compare their long term evolution. The study in 7 children from France ( $\bar{X}$  age  $11.3 \pm 1.7$  years) and 9 from Quebec, Canada ( $\bar{X}$  age  $12 \pm 2.5$  years) involved data collection from medical records for growth evaluation, neurological and ophthalmological status as well as bone density over an average follow-up period of 4.9 years for the French cohort and of 10.6 years for the Canadian one. All CRD patients presented within the first few months of life with diarrhea and failure to thrive. Severe hypocholesterolemia coupled with normal triglycerides was associated with low LDL and HDL-cholesterol, as well as with low apolipoproteins A-I and B. Varying degrees of essential fatty acid and of vitamin E deficiency were observed. The earlier diagnosis in the Canadian cohort ( $1.3 \pm 0.04$  years) than in the French one ( $6.3 \pm 1.3$  years) was unrelated with the severity of presenting symptoms. The fact that the disease had more impact on growth and bone density in the latter group may be related to delayed diagnosis of the disease. Vitamin E deficiency led to functional neurological and ophthalmic changes in a small number of patients but only one developed areflexia. Finally, genotype–phenotype correlation is not obvious in our cohort with CRD; even if, the Canadian subjects with the allele 409G>A had a more severe degree ( $P < 0.001$ ) of hypocholesterolemia than the other patients, many clinical data are inconsistent with a hypothetical genotype–phenotype correlation. This study provides new insights on the phenotypic expression of CRD over time and emphasizes the need to screen the lipid profile of infants with chronic diarrhea and failure to thrive.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The small intestine produces chylomicrons (CM)<sup>1</sup> in the post-prandial state. The assembly of these large lipoprotein particles is critical for the transport of fat and lipid-soluble vitamins. Although

significant strides have been made over the last three decades in the understanding of the formation of intestinal lipoproteins [1–3], additional efforts are obviously necessary to delineate the intracellular mechanisms of CM assembly. Studies of genetic disorders have provided insight into the mechanisms involved in intestinal lipid handling and lipoprotein metabolism. More specifically, they have highlighted the crucial roles of apolipoprotein (apo) B-48 [4–6], microsomal triglyceride transfer protein (MTP) [7,8] and *Sar1B* GTPase [9]. Mutations in the genes of *APO B*, *MTP* and *Sar1* GTPase result in hypobetalipoproteinemia (MIM#107730), abetalipoproteinemia (MIM#200100), and chylomicron retention disease (CRD)

\* Corresponding author. Fax: +1 514 345 4999.

E-mail address: [emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca) (E. Levy).

<sup>1</sup> Abbreviations used: CM, chylomicron; Apo, apolipoprotein; CRD, chylomicron retention disease; EFA, essential fatty acids; ER, endoplasmic reticulum; FA, fatty acids; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; PCTV, pre-chylomicron transfer vesicles; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

(MIM#246700) also called Anderson's disease (MIM#607689), respectively. First described in 1961 [10], CRD is characterized by chronic fat malabsorption with varying degrees of hypocholesterolemia, chronic diarrhea, failure to thrive, and deficiency of fat-soluble vitamins, vitamin E particularly, which may lead to neurological deficits [11–13].

Currently, it is considered that the packaging process of CM starts with the biosynthesis and entrance of apo B-48 into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), where lipids are added through interaction with pivotal MTP, allowing correct folding of apo B-48. The latter protein is then sorted into exit sites to leave the ER by Pre-Chylomicron Transfer Vesicles (PCTV), which are large COP II-like vesicles formed under the influence of Sar1B GTPase and of various coatomer proteins [14]. The efficient operation of the PCTV pathway necessitates two multimeric complexes (Sec23/24p and Sec13/31p), and Sar1B, a GTPase of the Ras superfamily [15]. The GTP-binding protein Sar1B is particularly essential for the budding reaction and it is also important for correct vesicle targeting and fusion with recipient Golgi membrane sites [16]. The requirement of Sar1B for intracellular CM transport was confirmed in CRD with the identification of mutations of the Sar1B gene (previously named SARA2) that encodes Sar1B [9].

The aim of this study was to provide a description of the largest group of CRD patients so far reported, and to compare the severity of the disease and its long term evolution in two cohorts from France and Canada as a function of the Sar1B gene mutations which we have previously identified [9,17].

## Materials and methods

### Subjects

Sixteen patients, 8 girls and 8 boys were recruited from two pediatric gastroenterology units: Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron, France [7 patients (3 born in Turkey, 2 in Algeria and 1 in Portugal)] and Sainte-Justine Hospital, Montreal, Canada [9 patients born in Quebec]. These patients were seen for a malabsorption syndrome associated with hypocholesterolemia and normal triglycerides. Initial data at diagnosis and follow-up information were obtained from medical records. The workup included neurological and ophthalmic exams, blood work, ultrasound of the liver and of the heart, bone densitometry, electromyogram, electroretinogram and visual evoked potentials. Once the diagnosis was made, patients were maintained on a low fat diet supplemented with fat-soluble vitamins. Vitamin E in both water and lipid-soluble form was given at an average dose of 40 IU/kg/day to the Canadian and of 65 IU/kg/day to the French patients. Sixteen healthy controls were age- and sex-matched for each patient of the two groups. Informed consent was obtained from the patients or their parents and permission to conduct the study was obtained from the Ethics Committees of both institutions.

### Clinical and laboratory studies

#### Anthropometry

Body weight was measured using an electronic scale. Body length was measured twice in supine position until the age of 2 years and standing with a wall-mounted stadiometer thereafter. The average value for each patient was recorded. The measures, expressed in Z score, were determined by employing the American curves established by the Center for Disease Control (<http://www.cdc.gov/growth> charts) for the Canadian cohort and the French reference curves of Sempe and Pedron [18] for the French group.

#### Fecal fat excretion

Steatorrhea defined as a 24 h fat excretion in excess of 3.5 and 5 g for infants and children respectively was measured by the Van de Kamer method [19]. Stools were collected between two carmine red markers consisting of 200 mg of powder dissolved in water given 72 h apart. The coefficient of fat absorption was obtained at diagnosis and at the time of the study in 6 of the 7 patients making up the French cohort.

#### Lipid studies

Fasting venous blood samples were collected in EDTA tubes for DNA molecular analysis and in a tube without any additive for biochemical studies. Total cholesterol and triglycerides were determined with available commercial kits (Roche® diagnostics). Phospholipids were measured by the Bartlett method [20]. High-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was determined by direct method on a Hitachi® 917 (Roche® diagnostics) for French patients and after precipitation of very-low and low-density lipoproteins with phosphotungstic acid for French-Canadian patients. Apo A-I and apo B were measured by nephelometry (Array Protein System; Beckman).

Fatty acids (FA) in whole plasma were assayed by an improved method previously described [21]. Briefly, each sample to be analyzed was subjected to direct transesterification and then injected into a gas chromatograph (model HP 5880; Hewlett-Packard, Rockville, MD) using a 60-m fused silica capillary column coated with SP 2331.

Plasma vitamins were measured as described previously [22] using HPLC system equipped with a spherical 5 µm C<sub>18</sub> octadecylsilane Hypersil column (20 cm × 2.1 mm internal diameter; Hewlett-Packard).

#### Small bowel biopsies

Following a period of 10–12 h fasting, intestinal biopsy specimens were obtained by upper gastrointestinal endoscopy from the proximal duodenum, except for the two oldest patients (4-1 and 8-1) in whom biopsies were previously obtained with a Carey capsule at the ligament of Treitz. Frozen sections were stained with oil red-O for neutral fat. Tissue was fixed in formalin for routine histology and electron microscopy.

#### Bone densitometry

Bone densitometry of the lumbar spine was obtained by dual energy X-ray absorptiometry (DXA; Lunar Prodigy, Madison, WI, USA). The results were compared with healthy age- and sex-matched controls and expressed as Age-Egal Z-Score for L2-L4. Osteopenia in children is defined as bone mineral density below 2 SD [23]. Only the French patients had Bone densitometry early after diagnosis, but both groups had bone mineral density measurements at the time of the study.

#### Neuro-ophthalmic workup

Each patient underwent an electromyogram following a complete neurological examination. Similarly, electromyograms and visual evoked potentials as well as electroretinograms were obtained following ophthalmology consults during the course of the follow-up.

#### Statistical analysis

All values are expressed as means ± SEM. Statistical differences were assessed by Student's two-tailed *t* test. For comparison of growth Z scores, the non parametric Mann-Whitney U test was used. *P* values < 0.05 were considered significant.

## Results

### Clinical features and anthropometry

As shown in Table 1, the two groups were comparable with regard to age and gender but significant consanguinity was present in the French group. No intra uterine growth retardation was noted. Age at onset of symptoms did not differ. However, the delay in diagnosis was considerably longer in the French cohort and the period of follow-up was shorter. At the time of the workup leading to the diagnosis, all patients had severe chronic diarrhea with failure to thrive while, at the time of the study, intolerance for fatty foods manifested by diarrhea and flatulence were the only symptoms. The hypoalbuminemia observed in all but 3 patients at diagnosis was no longer present at the time of the study. On the other hand, ALT levels  $>1.5 \times N$  observed in 12 of the 16 subjects remained abnormal in 4 of them. Although clinical hepatomegaly was observed in only one patient at diagnosis, 3 had ultrasound evidence of steatosis at follow-up.

Fig. 1 shows the impact of the disease on height and weight Z scores overtime in the two cohorts. Even though the interval between onset and diagnosis was shorter, the weight Z scores were more adversely affected in the Canadian cohort.

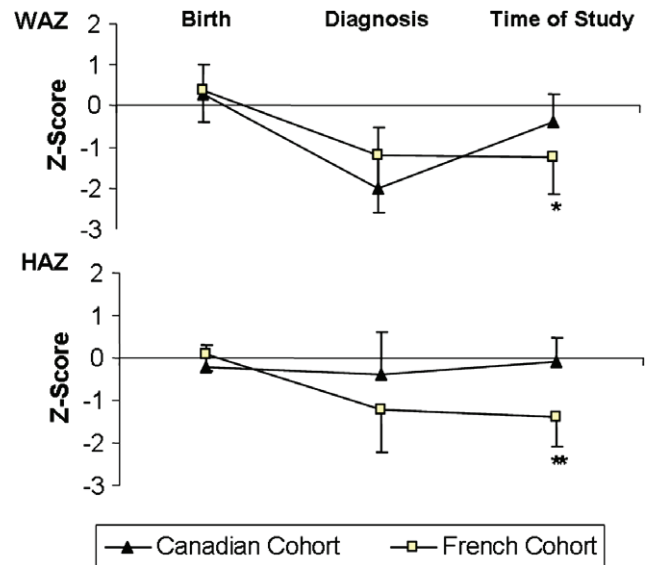
### Steatorrhea

At the time of the follow-up, fat excretion from 72 h stool collections, expressed in g/d, was abnormal ( $7.5 \pm 3.6$ ) despite a low fat diet. Over time, the coefficient of fat absorption obtained in 6 of the 7 French patients did not change: at the time of diagnosis it was ( $81.7 \pm 5.7$ )% compared to ( $82.3 \pm 5.6$ )% at the time of the study.

### Lipid, fatty acid and fat-soluble vitamin profiles

Lipid profiles at the time of the study are shown in Table 2. Hypocholesterolemia in the presence of normal triglycerides was a feature in all patients. The CRD patients had normal triglycerides, and the marked hypocholesterolemia was coupled with a decrease in phospholipids, when compared with healthy age- and sex-matched controls recruited from Canada and France more so in the former than in the latter. The low plasma cholesterol was largely accounted for by the decreased cholesterol content of both the low-density lipoprotein (LDL) and HDL lipoprotein fractions. Accordingly, the protein moieties of LDL and HDL, apos B and A-I, respectively were decreased. Importantly, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the Canadian cohort and little change occurred overtime in both cohorts (Supplementary data 1).

Plasma FA composition of the CRD patients displayed several significant differences compared with those of the age- and sex-



**Fig. 1.** Anthropometric evolution from birth to the time of study for both cohorts. A decrease in weight-for-age Z scores is noted in both cohorts at the time of diagnosis. It is less pronounced in the French children ( $\bar{X} 6.3 \pm 1.3$  years) than in the Canadian ( $\bar{X} 1.3 \pm 0.04$  years). Failure of catchup growth is clearly evident in the French patients ( $\bar{X} 11.3 \pm 1.7$  years) compared to the Canadians ( $\bar{X} 12 \pm 2.5$  years). \* $P < 0.003$ , \*\* $P < 0.002$ .

matched control subjects (Table 3). Evidence of essential fatty acids (EFA) deficiency was documented by a decrease of linoleic acid (LA) in both groups. It was associated with an increase in the 20:3( $n - 9$ )/20:4( $n - 6$ ) ratios, an index of EFA deficiency but only in the Canadian patients. Both cohorts exhibited very-low levels of vitamin E despite large oral doses (50 IU/kg) of that vitamin in lipid or aqueous solution. There was little difference between the levels observed in the Canadian ( $8.2 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ ) versus the French ( $10 \pm 2.3 \mu\text{mol/l}$ ) cohort. Furthermore, there was no evidence of ongoing deficiencies of vitamins A and D. The data tabulated also show surprisingly high levels of DHA (22:6 $n - 3$ ) and of the corresponding DHA/AA (20:4 $n - 6$ ) ratios particularly in the French cohort (Table 3).

### Histological findings

Histological findings at the time of diagnosis demonstrated on electron microscopy swollen enterocytes distended by numerous lipid droplets. Although a few large droplets were seen, the bulk of the fat droplets gorging the cells were small, uniform in size, and most of the time bound by membranes (Supplementary data 2). Clusters of these CM-size lipid droplets were noted within vesicular structures which could be part of the Golgi complex (Supplementary data 2). It was noted that despite engorgement of enterocytes by lipid droplets, the intercellular spaces were closely juxtaposed and contained no lipid droplets (Supplementary data 3).

### Bone density findings

All the French patients had decreased bone density while only one Canadian subject was affected. The mean bone densities recorded were significantly higher in the Canadian compared to the French cohort ( $-0.25 \pm 0.6$  vs  $-2.46 \pm 0.3$ ,  $P = 0.007$ ).

### Neurological and ophthalmological changes

Four patients had mild electromyographic changes, characterized by a reduction of sensory nerve conduction velocity and de-

**Table 1**

Baseline characteristics, age at onset and diagnosis, and at the time of the study.

	Canadian cohort (n = 9)	French cohort (n = 7)	P
<b>Demographics</b>			
Age (year)	12 $\pm$ 2.5	11.3 $\pm$ 1.7	NS
Sex (female/male)	4/5	4/3	
Consanguinity	1/9	6/7	
<b>Onset, diagnosis and follow-up</b>			
Age at onset of symptoms (month)	2.3 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.3	NS
Interval between age at onset of symptoms and diagnosis (year)	1.3 $\pm$ 0.04	6.3 $\pm$ 1.3	0.01
Duration of follow-up (year) <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 2	4.9 $\pm$ 0.8	0.03

<sup>a</sup> The duration of follow-up corresponds to the time of the study.



**Table 2**

Lipid profiles in patients and controls at the time of the study.

Lipids	Canadian cohort		French cohort	
	Controls (n = 9)	Patients (n = 9)	Controls (n = 7)	Patients (n = 7)
TG (mmol/L)	0.73 ± 0.21	0.76 ± 0.35	0.90 ± 0.50	0.73 ± 0.21
TC (mmol/L)	3.73 ± 0.80	1.49 ± 0.56 <sup>c</sup>	3.64 ± 0.37	2.13 ± 0.40 <sup>c,d</sup>
PL (mmol/L)	3.55 ± 0.19	1.21 ± 0.13 <sup>c</sup>	3.44 ± 0.36	1.24 ± 0.15 <sup>c</sup>
HDL-C (mmol/L)	1.07 ± 0.22	0.46 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.11 ± 0.24	0.57 ± 0.09 <sup>c,d</sup>
LDL-C (mmol/L)	2.33 ± 0.64	0.69 ± 0.38 <sup>c</sup>	2.11 ± 0.25	1.28 ± 0.42 <sup>c,e</sup>
ApoA-I (g/L)	1.05 ± 0.19	0.56 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.15	0.55 ± 0.05 <sup>c</sup>
ApoB (g/L)	0.66 ± 0.18	0.40 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.06	0.45 ± 0.10 <sup>b</sup>

TG, triglycerides; TC, total cholesterol; CE, cholesteryl ester; PL, phospholipids; LDL-C, LDL-cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol.

<sup>a</sup> P = 0.004 patients versus controls.<sup>b</sup> P = 0.002 patient versus control.<sup>c</sup> P = 0.001 patients versus controls.<sup>d</sup> P = 0.02 French patients versus Canadian patients.<sup>e</sup> P = 0.01 French patients versus Canadian patients.**Table 3**

Plasma fatty acid profiles in CRD patients and controls at the time of the study.

Fatty acids (%)	Canadian cohort		P	French cohort		P
	Controls (n = 9)	Patients (n = 9)		Controls (n = 7)	Patients (n = 7)	
LA: C18:2(n – 6)	30.16 ± 2.59	11.23 ± 2.19	0.001	33.71 ± 2.87	15.32 ± 3.5	0.001
γ-LA: C18:3(n – 6)	0.39 ± 0.14	0.48 ± 0.19	0.008	0.35 ± 0.17	0.48 ± 0.14	NS
AA: C20:4(n – 6)	5.2 ± 0.84	6.65 ± 1.58	0.03	5.14 ± 1.77	6.28 ± 1.97	NS
α-ALA C18:3(n – 3)	0.68 ± 0.24	0.38 ± 0.15	NS	0.89 ± 0.48	0.51 ± 0.23	NS
EPA C20:5(n – 3)	0.32 ± 0.13	0.31 ± 0.10	NS	0.27 ± 0.12	0.65 ± 0.38	0.04
DHA C22:6(n – 3)	0.93 ± 0.33	1.82 ± 0.73	0.007	0.96 ± 0.42	3.69 ± 1.67	0.004
PUFA/saturated	1.11 ± 0.10	0.56 ± 0.11	0.001	1.5 ± 0.84	0.57 ± 0.08	0.01
n – 6/n – 3	17.05 ± 2.92	8.9 ± 7.5	0.008	17.07 ± 3.24	4.92 ± 2.33	0.001
20:3(n – 9)/20:4(n – 6)	0.01 ± 0.005	0.04 ± 0.02	0.005	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004	NS
DHA/AA	0.17 ± 0.05	0.26 ± 0.10	0.04	0.18 ± 0.04	0.64 ± 0.37	0.02
LA/ALA	48.1 ± 12.23	32.72 ± 14.01	0.03	45.38 ± 18.17	35.4 ± 16.43	NS

EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; AA, arachidonic acid; LA, linoleic acid; ALA, alpha-linolenic acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

creased sensory nerve action potential amplitudes suggestive of an axonal and demyelinating sensory neuropathy in the lower extremities, which was clinically manifested by areflexia in only one French patient non compliant to vitamin E. At the time of the study, abnormal visual evoked potentials characterized by wave of higher amplitude and increased latencies, as well as abnormal electroretinograms characterized by decreased waves in scotopic indicative of an impairment of the function were observed in 3 patients.

#### SAR1B Mutations and the phenotypic expression of the disease

By using DHPLC (Transgenomics Wave System) and DNA sequencing, all exons of the Sar1B gene in the 16 CRD patients were studied and previously described [17]. A total of 6 different mutations, including 4 missense, 1 deletion and 1 splice were detected. The mutations 409G>A and 537T>A were the most prevalent (6/11 and 4/11 per allele and per family). It is noteworthy that mutations observed in the Canadian homozygotes differed from those identified in the 7 French homozygotes. The French cohort included only “private” mutations (Table 4).

The next step in our study was to study whether specific Sar1B gene mutations were associated with more severe manifestations and biochemical phenotypes in the follow-up. The disease was clearly more severe ( $P < 0.05$ ) in terms of its impact on weight Z scores during the interval between onset of symptoms and diagnosis in the 6 Canadian patients with the 409G>A variant than in the 10 others. The lipid profiles were more profoundly affected in the Canadian subjects with the 409G>A mutation than in the Canadian and French children with other mutations (total cholesterol:  $1.23 \pm 0.21$  vs  $2.11 \pm 0.46$  mmol/l,  $P < 0.001$ ; HDL-C:  $0.44 \pm 0.07$  vs

$0.56 \pm 0.1$  mmol/l  $P < 0.02$ ; LDL-C:  $0.52 \pm 0.16$  vs  $1.21 \pm 0.45$  mmol/l  $P < 0.001$ ; and apo B:  $0.35 \pm 0.01$ g/l vs  $0.47 \pm 0.15$   $P < 0.03$ , respectively). However, there are no other differences between the mutations in term of phenotype expression.

#### Discussion

This study describes the phenotypic expression of CRD and its evolution over time in two cohorts whose Sar1B gene mutations have been previously described [9,17].

The initial description as Anderson’s Disease in 1961 [10] was completed in 1986–1987 [11,13] by characterizing the lipid profile abnormalities and identifying a defect in the export of CM-like lipid droplets as cause of the disease. This rare autosomal recessive disease has now been described in about 40 patients, including the 16 which are the subject of the present study [10,11,13,24]. Although initially contested [10,13], the autosomal transmission of CRD is established and confirmed by our two cohorts [17]. The Canadian cohort was of French Canadian origin while the French one was of Turkish, Algerian and Portuguese stock. In the latter, 6 out of 7 sets of parents were cousins while only one case of consanguinity was present in the Canadian parents. The more homogeneous French Canadian background may account for the fact that only three mutations were identified and that 6 of 9 showed the same 409G>A mutation of exon 6.

Initial symptoms became manifest during the first 2 months of life. This is consistent with the observation that 95% of children reported are symptomatic before age of 1 and the disease is definitely more severe in infants. This is borne out by the fact that it had a more profound impact on weight Z scores in Canadian children ( $1.5 \pm 1$  years) who were significantly ( $P < 0.01$ ) younger at

**Table 4**  
Genotype of the 16 patients from the 2 cohorts.

Family	Origin	Sex	Variant	Amino acid change	Status	
I	1	Turkish	Male	c.364 G>T	p.Glu122X	Homozygous
I	2		Female	c.364 G>T	p.Glu122X	Homozygous
I	3		Female	c.364 G>T	p.Glu122X	Homozygous
I	4		Male	c.364 G>T	p.Glu122X	Homozygous
II	1	Algerian	Female	c.1-4482_58 + 1406del5946 ins15pb	p.Met1_His43del	Homozygous
II	2		Male	c.1-4482_58 + 1406del5946 ins15pb	p.Met1_His43del	Homozygous
III	1	Portuguese	Female	c.554 G>T	p.Gly185Val	Homozygous
IV	1	French Canadian	Male	c.409 G>A	p.Asp137Asn	Homozygous
IV	2		Male	c.409 G>A	p.Asp137Asn	Homozygous
V	1	French Canadian	Male	c.409 G>A + del 83-84 TG	p.Asp137Asn	Homozygous
VI	1	French Canadian	Female	c.409 G>A	p.Asp137Asn	Homozygous
VII	1	French Canadian	Female	c.[409G>A] + c.[537T>A]	p.[Asp137Asn] + p.[Ser179Arg]	Compound heterozygous
VII	2		Male	c.[409G>A] + c.[537T>A]	p.[Asp137Asn] + p.[Ser179Arg]	Compound heterozygous
VIII	1	French Canadian	Female	c.537T>A	p.Ser179Arg	Homozygous
IX	1	French Canadian	Male	c.537T>A	p.Ser179Arg	Homozygous
IX	2		Female	c.537T>A	p.Ser179Arg	Homozygous

diagnosis than the French subjects ( $6.4 \pm 1.3$  years). This delay was likely due to lack of awareness for the disease and perhaps to poor accessibility to a competent gastroenterology service. The tardy initiation of a low fat diet with a high polyunsaturated fatty acids (PUFA)/saturated fatty acids (SFA) ratio and of supplements of fat-soluble vitamins A, D and E, the latter at dosages recommended for abetalipoproteinemia [25] could account for the observations showing that catchup growth in the French cohort was not as good as in the Canadian patients. For the same reason, there was a more severe decrease of bone mineral density in the French patients.

At the time of the previous description of CRD in others Canadian and French patients [11–13], ultrastructural differences had been noted between the two groups. The distinct morphology was the subject of a debate [26] suggesting that perhaps the French patients suffered from a disease affecting the formation of CM rather than their secretion. The present study has not substantiated that possibility because in both groups most of the lipid vacuoles are membrane-bound and well individualized CM-size structures are detected in vesicular structures which could be part of the Golgi apparatus. Furthermore, a recent study on the glycosylation of apo B-48 has shown that in contrast to abetalipoproteinemia, CRD is situated somewhere between the Golgi and the basolateral membrane [27]. The cytosolic COP II machinery responsible for the transport of cargo molecules, such as CM from the ER to the cell surface, requires Sar1B [28].

In view of the low levels of vitamin E unresponsive to large supplements, special attention was given to the neuro-ophthalmic status and its evolution over time. Although no decrease of muscle strength was observed, electromyographic abnormalities were common but disappeared except in four at the time of the study. Similarly, diminished osteotendinous reflexes were common but areflexia associated with proprioceptive abnormalities was observed in only one patient who was no compliant to vitamin E. Ophthalmological manifestations of vitamin A and E deficiency were limited to electrophysiological anomalies detected by electroretinograms and evoked potentials. Common at the time of diagnosis, they proved largely reversible with treatment.

Even though mutation 409G>A is associated with a more severe biological phenotype (ie lower total cholesterol levels), not only in patients with mutation 409G>A but also in their parents (3.97 mmol/l) compared to the parents (5.06 mmol/l) of the children with other mutations, a plausible genotype–phenotype correlation is unlikely.

The predicted consequence of the 409G>A mutation is the loss of a hydrogen-bond in guanine resulting in disruption of the binding site, which has unlikely affected the protein function more severely than other mutations of the same type (i.e., missense

mutations) [17]. Furthermore, this mutation is a missense mutation whose effect on the protein is supposed to be less deleterious than the ones involving stop codons or deletions as found in the other patients. In fact, the clinical phenotype data (i.e., growth, neurological impairment, hepatic steatosis) in these later patients are not significantly different from the corresponding data observed in non sense mutations. Even though, the 409G>A allele identified in 6 of 9 Canadian patients was associated with a more negative impact on growth in terms of weight during the short interval between onset of the disease and diagnosis. Over the long term, Canadian patients exhibited better catchup growth and bone mineral density than the French. In addition, the same missense mutation is associated with different severity of complications. Finally, lipid profiles differed between families with the same mutation (families IV and VI) and even among the same family (families IV and VIII).

The complexity of the system involving Sar1B in cellular trafficking provides large opportunities for the influence of modifier genes on function and, therefore, on patient's phenotype [29]. Indeed, multiple mechanisms, including lipid digestion, protein phosphorylation and procollagen synthesis, for example, may regulate the transport of CM through the secretory pathways of mammalian cells [30,31].

Clinically, only one case in family I had a neurological handicap (areflexia) and only one in family VII suffered from hepatomegaly. This lack of genotype–phenotype correlation in CRD, a single gene disorder (Sar1 GTPase gene), could be explained by modifier genes susceptible to convert “simple” Mendelian disorders to complex phenotypes [29]. Modifier genes in the form of transcriptional factors might play an important role in the ER to Golgi COPII dependant transport. Other genes responsible for absorption, assembly, transport and metabolism of cholesterol may also be involved. As COP II transport decreases secondary to the acute depletion of cellular cholesterol concentration [32], other modifier genes affecting cholesterol homeostasis might be involved in our patients [32].

Hepatic steatosis is a well known complication of hypobetalipoproteinemia. It is known that the Sar1B protein is essential not only in the intestine but also in the liver. It has been shown that apo B-100 exits from the ER in the COPII vesicles which use the Sar1 for their budding and fusion with the Golgi [33]. In that context, it is surprising that only 3 patients had echographic evidence of steatosis. One would have expected more severe liver involvement in the patients with more severe mutations which is not the case. Then, mutations and polymorphisms of other proteins contributing to the metabolism or transport of lipids in the liver (Sar1A protein which share high homology with Sar1B protein, L-FABP, MTP, or VAMP7) might affect the functionality of this net-

work and explain heterogeneity of phenotype between patients and the impossibility to predict the prognosis of CRD despite knowledge of the mutant alleles such as described in other diseases [29,34].

Biologically, as very-low density lipoproteins and CM are responsible for the transport of vitamin E, one would have expected lower vitamin E levels at diagnosis in patients with the lowest levels of cholesterol (ie mutation 409G>A), thereby making them more at risk for progressive neurological complications. Fortunately, this was not the case even though vitamin E levels remained very-low whether given in lipid- or water-soluble form. This discrepancy indicates that lower hypocholesterolemia associated with the mutation 409G>A is not only the consequence of a more severe intestinal lipid malabsorption, but suggests concurrent partial defects in more than one pathway, or at different steps in the same metabolic pathway such as previously published [35].

Decreases in LA observed in both cohorts associated with high 20:3( $n-9$ )/20:4( $n-6$ ) ratios constitute evidence of EFA deficiency. This finding was expected in the context of the absorptive defect associated with the disease. However, the high levels of EPA, DHA and of the DHA/AA constitute a surprising finding. To our knowledge, there is no information on the role of Sar1B gene on FA metabolism. It is of interest to note that decrease in fatty acid binding protein (FABP), particularly in the liver of patients with CRD [36] in the presence of intact FABP genes [12], have been reported. Furthermore, on the basis of binding affinities, liver FABP does not appear to account for differences in the predominant products formed by the  $n-3$  and  $n-6$  PUFA metabolic pathways [37]. The fact that DHA levels are high in CRD is reassuring as this very long chain FA is essential for brain and retinal development and function [38].

In conclusion, screening of lipid profiles in particular of total cholesterol, LDL-C and vitamin E should be carried out in all infants with chronic diarrhea and failure to thrive. Sequencing of the Sar1B gene can establish the diagnosis, but further studies will be necessary to examine the functionality of the mutated proteins thereby providing further insights into this disease as well as on the normal pathway for the export of CM.

## Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP 10584) and the Quebec Nutraceuticals and Functional Foods Institute (INAF); a grant from French Ministry of the Health and Solidarity for Rare Diseases Molecular Diagnosis, and French Foreign Office (Lavoisier Grant).

The authors thank N. Allos, C. Jacobs, J. Castagnetti, S. Gingras and L. Bouthillier for their valuable contribution. We acknowledge the expert assistance of Schohraya Spahis.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ymgme.2009.02.003.

## References

- [1] M.M. Hussain, S. Fatma, X. Pan, J. Iqbal, Intestinal lipoprotein assembly, *Curr. Opin. Lipidol.* 16 (2005) 281–285.
- [2] E. Levy, M. Bendayan, Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport, *Microsc. Res. Tech.* 49 (2000) 374–382.
- [3] N. Peretti, V. Marcil, E. Drouin, E. Levy, Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency, *Nutr. Metab. (Lond.)* 2 (2005) 11.
- [4] S.G. Young, S.T. Hubl, D.A. Chappell, R.S. Smith, F. Claiborne, S.M. Snyder, J.F. Terdiman, Familial hypobetalipoproteinemia associated with a mutant species of apolipoprotein B (B-46), *N. Engl. J. Med.* 320 (1989) 1604–1610.
- [5] G. Schonfeld, X. Lin, P. Yue, Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism, *Cell Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1372–1378.
- [6] E. Levy, C.C. Roy, L. Thibault, A. Bonin, P. Brochu, E.G. Seidman, Variable expression of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia: transient malabsorption during infancy, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 2170–2177.
- [7] J.R. Wetterau, Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia, *Science* 258 (1992) 999–1001.
- [8] D. Sharp, Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia, *Nature* 365 (1993) 65–69.
- [9] B. Jones, Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders, *Nat. Genet.* 34 (2003) 29–31.
- [10] C.M. Anderson, R.R. Townley, M. Freeman, P. Johansen, Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood, *Med. J. Aust.* 48 (2) (1961) 617–622.
- [11] M.E. Bouma, I. Beucler, L.P. Aggerbeck, R. Infante, J. Schmitz, Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 398–410.
- [12] A.H. Dannoura, N. Berriot-Varoqueaux, P. Amati, V. Abadie, N. Verthier, J. Schmitz, J.R. Wetterau, M.E. Samson-Bouma, L.P. Aggerbeck, Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 2494–2508.
- [13] C.C. Roy, Malabsorption, Hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease, *Gastroenterology* 92 (1987) 390–399.
- [14] S.A. Siddiqi, F.S. Gorelick, J.T. Mahan, C.M. Mansbach, COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 415–427.
- [15] C. Barlowe, COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum, *Cell* 77 (1994) 895–907.
- [16] C. Barlowe, R. Schekman, SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER, *Nature* 365 (1993) 347–349.
- [17] M. Charcosset, A. Sassolas, N. Peretti, C.C. Roy, C. Deslandres, D. Sinnott, E. Levy, A. Lachaux, Anderson or chylomicron retention disease: Molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein, *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 74–84.
- [18] M. Sempé, G. Pédrón, Courbes collectives de la croissance somatique (taille, poids, périmètre crânien)-garçons et filles séparément (amplitudes, itinéraires, accroissements), in: *Carnet de Santé, Simep-Masson, Theraplix, Merieux, Sero, Méditations, Lyon, 1995.*
- [19] J.H. van de Kamer, H.U.I.N. Ten Bokkel, H.A. Weyers, Rapid method for the determination of fat in feces, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 347–355.
- [20] G.R. Bartlett, Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 466–468.
- [21] G. Lepage, E. Levy, N. Ronco, L. Smith, N. Galeano, C.C. Roy, Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis, *J. Lipid Res.* 30 (1989) 1483–1490.
- [22] E. Levy, Y. Rizwan, L. Thibault, G. Lepage, S. Brunet, L. Bouthillier, E. Seidman, Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 807–815.
- [23] I.M. van der Sluis, I. M.A. de Ridder, A.M. Boot, E.P. Krenning, S.M. de Muinck Keizer-Schrama, Reference data for bone density and body composition measured with dual energy X-ray absorptiometry in white children and young adults, *Arch. Dis. Child* 87 (2002) 341–347.
- [24] F. Lacaille, M. Bratos, M.E. Bouma, J. Jos, J. Schmitz, J. Rey, Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases, *Arch. Fr. Pédiatr.* 46 (1989) 491–498.
- [25] R.J. Sokol, Vitamin E and neurologic deficits, *Adv. Pediatr.* 37 (1990) 119–148.
- [26] M.E. Bouma, R. Infante, J. Jos, J. Schmitz, Chylomicron retention disease, *Gastroenterology* 94 (1988) 554–556.
- [27] N. Berriot-Varoqueaux, Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease, *Gastroenterology* 121 (2001) 1101–1108.
- [28] S.M. Stagg, P. LaPointe, A. Razvi, C. Gurkan, C.S. Potter, B. Carragher, W.E. Balch, Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly, *Cell* 134 (2008) 474–484.
- [29] K.M. Dipple, E.R. McCabe, Modifier genes convert "Simple" Mendelian disorders to complex traits, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 43–50.
- [30] T. Kuwana, P.A. Peterson, L. Karlsson, Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1056–1061.
- [31] C.C. Shoulders, D.J. Stephens, B. Jones, The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b, *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004) 191–197.
- [32] A. Ridsdale, M. Denis, P.Y. Gougeon, J.K. Ngsee, J.F. Presley, X. Zha, Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 1593–1605.
- [33] V. Gusarova, J.L. Brodsky, E.A. Fisher, Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48051–48058.
- [34] C.R. Scriver, P.J. Waters, Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria, *Trends Genet.* 15 (1999) 267–272.

- [35] J. Vockley, P. Rinaldo, M.J. Bennett, D. Matern, G.D. Vladutiu, Synergistic heterozygosity: disease resulting from multiple partial defects in one or more metabolic pathways, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 10–18.
- [36] S. Guilmeau, Decreased expression of Intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes, *Histochem. Cell Biol.* 128 (2007) 115–123.
- [37] A.W. Norris, A.A. Spector, Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids bind strongly to liver fatty acid-binding protein, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 646–653.
- [38] S.M. Innis, Dietary (*n* – 3) fatty acids and brain development, *J. Nutr.* 137 (2007) 855–859.

REVIEW

Open Access

# Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers

Noel Peretti<sup>1,3</sup>, Agnès Sassolas<sup>2,4</sup>, Claude C Roy<sup>5</sup>, Colette Deslandres<sup>5</sup>, Mathilde Charcosset<sup>2,4</sup>, Justine Castagnetti<sup>2,3</sup>, Laurence Pugnet-Chardon<sup>3</sup>, Philippe Moulin<sup>2</sup>, Sylvie Labarge<sup>3</sup>, Lise Bouthillier<sup>5</sup>, Alain Lachaux<sup>3</sup>, Emile Levy<sup>1\*</sup>

## Abstract

Familial hypocholesterolemia, namely abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia and chylomicron retention disease (CRD), are rare genetic diseases that cause malnutrition, failure to thrive, growth failure and vitamin E deficiency, as well as other complications. Recently, the gene implicated in CRD was identified. The diagnosis is often delayed because symptoms are nonspecific. Treatment and follow-up remain poorly defined.

The aim of this paper is to provide guidelines for the diagnosis, treatment and follow-up of children with CRD based on a literature overview and two pediatric centers' experience.

The diagnosis is based on a history of chronic diarrhea with fat malabsorption and abnormal lipid profile. Upper endoscopy and histology reveal fat-laden enterocytes whereas vitamin E deficiency is invariably present. Creatine kinase (CK) is usually elevated and hepatic steatosis is common. Genotyping identifies the *Sar1b* gene mutation.

Treatment should be aimed at preventing potential complications. Vomiting, diarrhea and abdominal distension improve on a low-long chain fat diet. Failure to thrive is one of the most common initial clinical findings.

Neurological and ophthalmologic complications in CRD are less severe than in other types of familial hypocholesterolemia. However, the vitamin E deficiency status plays a pivotal role in preventing neurological complications. Essential fatty acid (EFA) deficiency is especially severe early in life. Recently, increased CK levels and cardiomyopathy have been described in addition to muscular manifestations. Poor mineralization and delayed bone maturation do occur. A moderate degree of macrovesicular steatosis is common, but no cases of steatohepatitis cirrhosis.

Besides a low-long chain fat diet made up uniquely of polyunsaturated fatty acids, treatment includes fat-soluble vitamin supplements and large amounts of vitamin E. Despite fat malabsorption and the absence of postprandial chylomicrons, the oral route can prevent neurological complications even though serum levels of vitamin E remain chronically low. Dietary counseling is needed not only to monitor fat intake and improve symptoms, but also to maintain sufficient caloric and EFA intake.

Despite a better understanding of the pathogenesis of CRD, the diagnosis and management of the disease remain a challenge for clinicians. The clinical guidelines proposed will helpfully lead to an earlier diagnosis and the prevention of complications.

\* Correspondence: emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

<sup>1</sup>Department of Nutrition, CHU Sainte-Justine Research Center, Université de Montréal, 3175, Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada  
Full list of author information is available at the end of the article



### Background

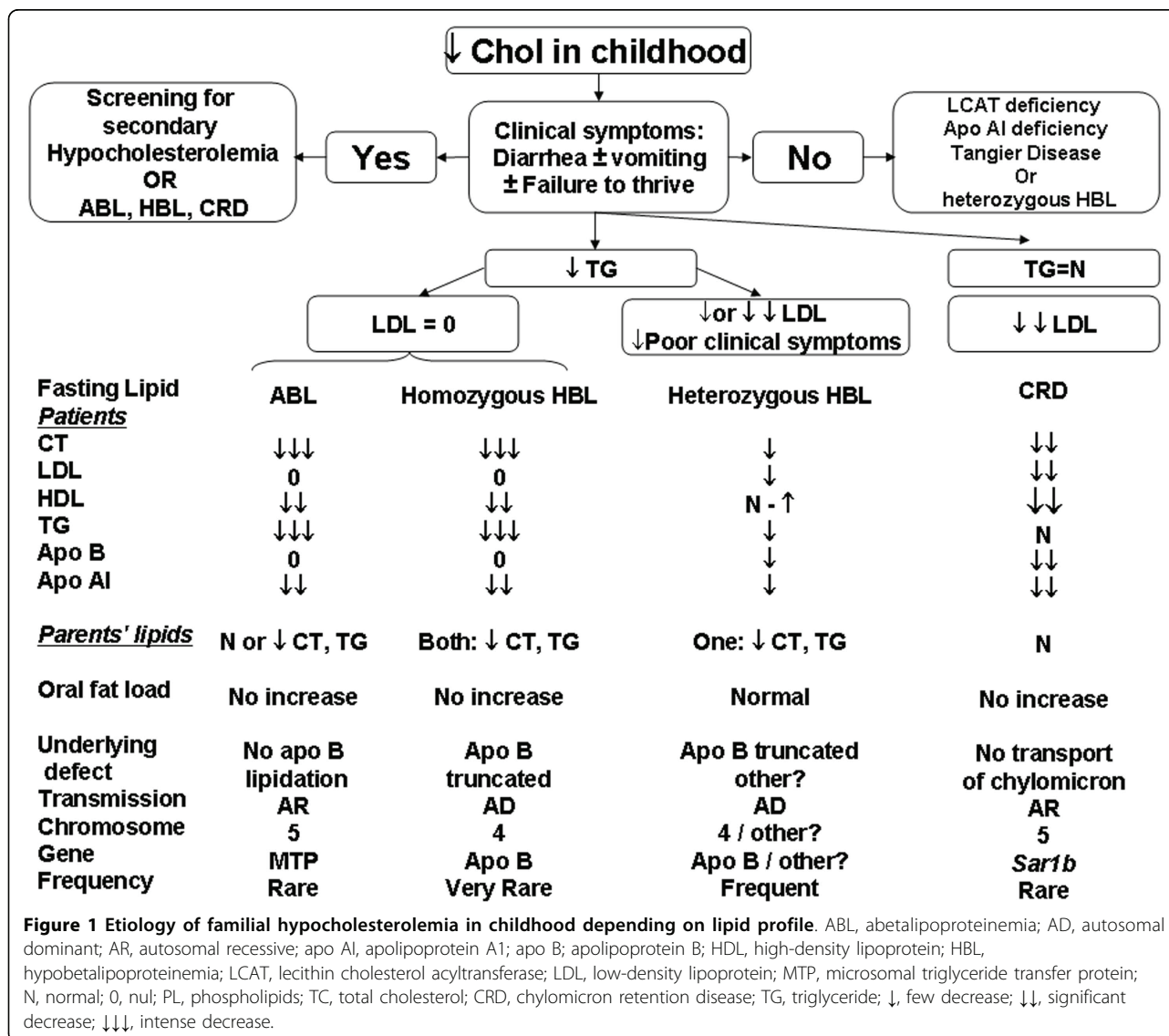
Chylomicrons, the principal carriers of dietary lipids, are triglyceride (TG)-rich lipoproteins secreted exclusively from the enterocyte. These large lipoproteins (700 to 6000 Å) contain a single molecule of apolipoprotein (apo) B-48, which is essential for chylomicron structure cohesion [1,2]. Apo B-100 is found within very-low-density lipoproteins (VLDL) secreted by the liver and in low-density lipoprotein (LDL), a catabolic product of VLDL.

Many genetic diseases are responsible for alterations in apo B synthesis, metabolism or secretion abnormalities, causing intestinal fat malabsorption with growth retardation and neuro-ophthalmological complications. Over the last 20 years, genetic abnormalities have been identified for three main disorders classified as familial hypocholesterolemia: hypobetalipoproteinemia (HBL),

abetalipoproteinemia (ABL) and chylomicron retention disease (CRD). Figure 1 illustrates the characteristic lipid screening profiles and oral responses to a fat load test in patients and their parents with these disorders.

HBL is due to a mutation in the *apo B* gene on chromosome 2 leading to a shorter apo B molecule (truncated apo B) [3]. The clinical phenotype of this autosomal dominant hypocholesterolemia (Figure 1) is variable, as homozygous patients are indistinguishable from ABL, while heterozygotes show only a very mild phenotype [4].

The genetic abnormality leading to ABL was identified in 1992 [5] and is due to the mutation of the microsomal triglyceride transfer protein gene on chromosome 4 [5-7]. This mutation leads to premature degradation of nascent apo B and then to a drastic decrease in apo B-containing lipoproteins.





Recently, the *SAR1B* gene was identified as responsible for CRD or Anderson's disease (MIM #607689) [8]. The *SAR1B* gene encodes the Sar1b protein, which is involved in chylomicron transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus [9,10]. In fact, Sar1-GTP forms a coating protein complex (COPII) with two heterodimers Sec23/24 and Sec 13/31, which initiates budding and captures cargo to eject vesicles from the ER to the Golgi apparatus. When *Sar1b* is muted, the pre-chylomicron transport vesicle delivered by the ER cannot fuse with the Golgi apparatus, which then induces an accumulation of pre-chylomicron transport vesicles in the cytoplasm of the enterocytes [11-14]. Genotyping has revealed that Anderson's and CRD are in fact the same disease [8]. Recently, we described three new mutations in addition to the eight original genetic defects and a few others have been reported [8,11,15,16]. These studies have greatly contributed to a better understanding of CRD for the clinicians who often experience difficulties with the diagnosis and management of CRD patients. First, the diagnosis is often delayed because symptoms are nonspecific (diarrhea, abdominal distension, vomiting, and failure to thrive) and hypocholesterolemia may be attributed to malnutrition secondary to chronic diarrhea. Secondly, follow-up and treatment are poorly defined for many reasons. The similarity with other types of familial hypocholesterolemias may lead to a wrong diagnosis unless molecular testing is performed. Furthermore, CRD is rare: only ~ 40 cases and two small cohorts with seven and eight patients each have been described [17-29]. Very long-term follow-up into adulthood is poorly documented. However, a few authors report some adult cases with serious neurological impairment, albeit less severe than in patients with homozygous ABL or HBL [20,21,27-29]. Finally, to our knowledge, there are no specific recommendations for CRD follow-up or treatment. For the most part, therapeutic suggestions have been elaborated based on recommendations for ABL or symptomatic HBL patients. As the pathogenesis of these diseases differs, their manifestations and complications lead to poorer outcomes.

The aim of this paper is to provide an overview of the disease, comment on recent findings obtained from a cohort of 16 patients in whom a molecular diagnosis was made and for whom a median follow-up of five and ten years was available for the Montreal and Lyon cohorts, and make recommendations for the diagnosis and treatment respectively [30].

#### CRD Diagnosis

CRD diagnosis can be confused with other genetic hypocholesterolemias characterized by decreased LDL-cholesterol (LDL-C), such as ABL or homozygous HBL,

or with acquired disorders associated with low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL)-C. Figure 1 summarizes the differences in familial hypocholesterolemia with low LDL-C. The major clinical and biological manifestations as well as complications are summarized in Table 1 and steps to diagnose CRD are presented in Table 2.

#### Clinical Signs

In CRD, consanguinity is frequent but there is usually no noted intrauterine growth retardation. Digestive symptoms are most prominent at the beginning of life. Nonspecific malabsorptive diarrhea is constant and begins in infants shortly after birth. Other digestive symptoms, such as vomiting or abdominal swelling, are often present. They get better within a few days or weeks with a low-fat diet. The long-term evolution of digestive symptoms is variable. The intensity of symptoms decreased over time independent of the level of fat in the diet in some previously reported patients [22]. However, our data do not support the hypothesis of intestinal adaptation during CRD. Even though our patients' gastrointestinal symptoms improved on a low-fat diet, diarrhea began again when fat was reintroduced, even in adult patients. Furthermore, there was no improvement in steatorrhea after an average of five years of follow-up [30].

Hepatomegaly is reported to occur in about 20% of CRD patients. Hepatic steatosis is a well known complication of HBL. However, in CRD, at ultrasonography hepatomegaly and steatosis were detected in a few cases. A moderate degree of macrovesicular steatosis was previously reported [22,27], but, to our knowledge, no case of cirrhosis has been reported in CRD, in contrast to ABL and HBL [31-33]. Interestingly, during follow-up, we did not find any correlation between the level of hepatic enzymes and steatosis or hepatomegaly. Serological testing alone is therefore insufficient to detect hepatic morphological problems.

Neurological, muscular or ophthalmic manifestations may raise an alarm in those older patients with a delayed diagnosis as poor compliance to treatment.

The neurological abnormalities described in CRD children are: areflexia at ten and 13 years in a French publication and 13 and 18 years in Strich's publication; areflexia combined with proprioceptive abnormalities at ten and seven years in a Canadian study [21,27,29]. Furthermore, more severe neurological degeneration, such as ataxia, myopathy and sensory neuropathy, has been reported in CRD adults 21 and 55 years old [20,28]. The mean age in the literature of children with clinical neurological manifestations is 12 years, which is significantly older than that for asymptomatic patients (four years). In our cohort, 4/16 patients had

**Table 1 Clinical and Biological Expressions of Chylomicron Retention Disease in Studies with Genotyping**

Clinical signs	Age at onset of symptoms	Transient or permanent symptoms	Prevalence in childhood	Power of discrimination
<b>Anthropometry</b>				
Failure to thrive	Infancy (1 to 6 m)	transient if low LCFA diet	80%	+
<b>Gastrointestinal symptoms and signs</b>				
Diarrhea	Infancy (1 to 6 m)	transient if low LCFA diet	100%	+
Vomiting	Infancy (1 to 6 m)	transient if low LCFA diet	60%	+
Abdominal distension	Infancy (1 to 6 m)	transient if low LCFA diet	65%	+
Hepatomegaly, Steatosis	Infancy or late childhood	transient or permanent	15%	
<b>Neurology</b>				
Retinopathy	Adult	permanent	100%	+++
Visual abnormalities	Late childhood or adult (6 to 10 y)	transient if early treatment	30%	+
Hypo or Areflexia	Late childhood or adult (4 to 10 y)	permanent	5%	+
Myopathy	Adult	permanent	0%	+
EMG abnormalities	Late childhood or adult (4 to 10 y)	transient if early treatment	25%	+
Decreased proprioception	Late childhood or adult (4 to 10 y)	transient if early treatment	0%	+
<b>Cardiomyopathy/Biological signs</b>				
Normal TG <sup>§</sup>	Adult	permanent?	0%	+
Normal TG <sup>§</sup>	Infancy (1 to 6 m)	transient or permanent	90%	+++
Low Total cholesterol <sup>§§</sup>	Infancy (1 to 6 m)	permanent	100%	moderate decrease ++
Low LDL <sup>†</sup>	Infancy (1 to 6 m)	permanent	100%	moderate decrease ++
Low HDL <sup>††</sup>	Infancy (1 to 6 m)	permanent	100%	+++
Normal Fasting lipids in parents			100%	+
High CK (N < 100 mmol/L)	Infancy (1 to 6 m) - (460 ± 100)	permanent	60%	+++
Hepatic cytolysis (ALT < 40 mmol/L)	Infancy to late childhood - (60 ± 20)	transient or permanent	95%	+
Vitamin E deficiency (N > 18.4 µmol/L)	Infancy (1 to 6 m) - (2.7 ± 0.3)	permanent	95%	+
Vitamin A deficiency (N > 1.61 µmol/L)	Infancy (1 to 6 m) - (0.8 ± 0.5)	transient if supplementation	70%	+
Vitamin D deficiency (N > 50 nmol/L)	Infancy (1 to 6 m) - (31 ± 17)	transient if supplementation	45%	+
Vitamin K deficiency (N > 2.26 mmol/L)	Infancy (1 to 6 m) - (1.15 ± 0.6)	transient if supplementation	45%	+
Steatorrhea (N < 5 g/d)	Infancy (1 to 6 m) - (7.5 ± 3.6)	transient or permanent	85%	+
Negative Oral Fat Load	Infancy (1 to 6 m)	Permanent ?	100%	+
No acantocytosis	Infancy (1 to 6 m)	transient or permanent	90%	+++
EFA deficiency* (20:3n-9/20:4n-6)	Infancy to late childhood	permanent but variations	55%	+
<b>Endoscopic and histological signs</b>				
White duodenal mucosa	Infancy (1 to 6 m)	permanent? Fat load dependent	100%	++
Enterocyte vacuolization, chylomicron-like	Infancy (1 to 6 m)	permanent? Fat load dependent	100%	++

+: no; ++: few; +++: highly discriminative; N: normal.

<sup>§</sup> X value (mmol/L) is the same in CRD as in controls (0.73).

<sup>§§</sup> X value (mmol/L) is decreased by 60% in CRD (1.49 ± 0.56) vs controls (3.73 ± 0.80).

<sup>†</sup> X value (mmol/L) is decreased by 75% in CRD (0.69 ± 0.38) vs controls (2.33 ± 0.64).

<sup>††</sup> X value (mmol/L) is decreased by 5% in CRD (0.46 ± 0.08) vs controls (1.07 ± 0.22).

\*X ratio in CRD is 0.04 ± 0.02 and 0.01 ± 0.005 in controls.

**Table 2 Chylomicron Retention Disease Diagnosis**

<b>Clinical</b>	
<b>Anthropometry</b>	Constant but unspecific failure to thrive in early infancy (1-6 months)
<b>Digestive</b>	Chronic malabsorptive diarrhea in early infancy, frequent vomiting and abdominal distension in early infancy
<b>Neurology</b>	Areflexia, ↓ deep proprioception, and ataxia are uncommon during childhood and there is no retinopathy
<b>Biological (Fasting State)</b>	
<b>Lipids</b>	In patients with a suggestive profile: ↓ HDL and N <sup>al</sup> TG are the most discriminative specificities of CRD. ↓↓ Total cholesterol and ↓↓ LDL: intensity of decrease only around 50% normal values
<b>Neuromuscular</b>	↑ (1.5-4N) CK discriminative but inconstant abnormalities for CRD
<b>Blood Cell Count</b>	Absence of acanthocytosis in infancy is more frequent in CRD than in AB or HB
<b>Hepatic</b>	Frequent and early but not specific ↑ (1.5-3N) AST and/or ALT, with normal GGT, bilirubin and alkaline phosphatase
<b>Liposoluble vitamins</b>	Unspecific decrease ↓↓↓ E is the most severe and only permanent vitamin deficiency even with supplementation, ↓↓ A, ↓ - N <sup>al</sup> D, ↓ - N <sup>al</sup> K
<b>Coagulation</b>	↓ - N <sup>al</sup> INR. Decreased INR if there is vitamin K deficiency
<b>Plasma fatty acid</b>	Abnormal profile, omega 6 linoleic acid deficiency, normal omega 3
<b>Fasting lipids in parents</b>	N <sup>al</sup>

**Oral Fat Load**

TGs are normal at baseline but do not increase postprandially and lack of change in low HDL after fat load

**Upper Endoscopy** (fasting state or after enriched fat diet for 3 days)

Unspecific white duodenal mucosa

Optic microscopy Villi are normal but the enterocytes are grossly distended by lipid droplets

Electron microscopy Chylomicron-like aggregates, membrane bound?

**Genotyping**

Mutations in *SAR1B*, Chromosome 5

**Summary**

- 1) Chronic diarrhea in young infants (< 6 Mo). Normal TG with decreased total cholesterol, LDL-C and HDL-C
- 2) Failure to thrive
- 3) White duodenal mucosa at endoscopy → genetic hypocholesterolemia?
- 4) Genetic mutation of *SAR1B* → CRD confirmed

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; TG, triglycerides; INR, international normalized ratio; N<sup>al</sup>, Normal.

electromyographic abnormalities (electromyography with a reduction in sensory nerve conduction velocity and decreased sensory nerve action potential amplitudes). The youngest was 6.5 years old and only one had areflexia as early as age 11. Vitamin E status plays a pivotal role in neurological degenerative complications [34,35]. In our study, it is relevant to note that the patients with the more pronounced abnormalities had also the lowest vitamin E levels at diagnosis.

Muscular pain and cramps are rare, but classical complaints have been reported by patients. Recently, cardiomyopathy with a decrease in ejection fraction to 40% (normal > 60%) has been described in adults with CRD [15], but its prevalence is unknown. In our cohort, all patients had normal echocardiography, and no signs of cardiomyopathy were found before 23.5 years of age. Muscle histology did not reveal significant lipid accumulation or necrosis, but rather only mild and nonspecific abnormalities: a mild increase in lipid content, focal disorganization of the Z line with the loss of a few Z lines

in specific regions of the muscle specimen (personal data), and a variation in muscle fiber diameter with numerous lobulated fibers [15].

With regard to ophthalmic complications, minimal visual abnormalities were previously been reported: micronystagmus, mild deficit in the perception of the blue-yellow axis, and delayed dark adaptation [27]. In our populations, ophthalmic complications were mild, evidenced only through functional testing (abnormal visual evoked potentials characterized by waves of higher amplitude and increased latencies, as well as abnormal scotopic electroretinograms). In conclusion, in children, the absence of severe neurologic impairment and retinopathy is compatible with a diagnosis of CRD.

Poor mineralization and delayed bone maturation have previously been observed in CRD [21], probably as a consequence of malabsorption, malnutrition and vitamin D deficiency.

Interestingly, *Sar1b* GTPase is expressed not only in the intestine but also in the liver, muscle and brain. The

same mutation may be involved in different tissue-specific failures, for example, hepatocyte transport of nascent VLDL from the RE to the Golgi thanks to a Sar1b-dependant mechanism [36]. We can hypothesize that this dysregulation may be involved in the hepatic steatosis described in CRD. Furthermore, the myocardium has been shown to express the *Sar1b* gene and secrete apo B lipoproteins [37,38]. This suggests that the recent description of cardiomyopathy in CRD may be related to the tissue-specific expression of abnormal Sar1b protein. Finally, mild musculoskeletal and neurological abnormalities could also be related to impaired Sar1b in various systems [7,11].

### Biological Signs

Hypocholesterolemia associated with chronic diarrhea is common and nonspecific. However, CRD may be suspected with a particular lipid profile. First, the more than 50% decrease in total cholesterol ( $1.49 \pm 0.56$  in CRD vs  $3.73 \pm 0.80$  mmol/L in control patients), LDL-C ( $0.69 \pm 0.38$  in CRD vs  $2.33 \pm 0.64$  mmol/L in control patients) and HDL-C ( $0.46 \pm 0.08$  in CRD vs  $1.07 \pm 0.22$  mmol/L in control patients) in the presence of normal triglycerides (TG) ( $0.73$  mmol/L) is almost pathognomonic [30,39]. In contrast, both AB and homozygous HB have hardly any measurable TGs much lower total cholesterol levels and no LDL-C. Interestingly, in CRD, the intense hypocholesterolemia is not associated with consequences as severe as in the AB or HB homozygotes. First, the dyslipidemia is much less severe than in AB and HB. Secondly, in CRD, the chylomicrons are not secreted in the classic COP II way, but are built into the RE. Intestinal biopsies show chylomicron-like particles in membrane-bound compartments, reminiscent of the vesiculated channels of the smooth ER and in big membrane-bound compartments [19]. We can, therefore, presume that some fat is transported via LDL particles throughout the day and hardly detectable during the 5-hour fat loading test. However, at the puncture, no data support this possibility.

CRD and AB are recessive autosomal diseases, unlike HB which is a dominant form of hypocholesterolemia. Therefore, parental lipid screening may clarify the diagnosis. The absence of hypocholesterolemia in the two parents favors CRD.

Interestingly, the measurement of creatine kinase (CK) may orient towards the diagnosis. Recently and for the first time, muscular abnormalities have been described in CRD patients [15]. In our cohort, CK levels were elevated ( $5 \times N$ ) in all patients in whom the measurement was made at diagnosis, except one. The highest level ( $10 \times N$ ) was found in a patient who had the most severe level of neurological impairment (areflexia and abnormal electromyography). However, the CK level does not always correlate well with the severity of the neurological impairment.

In conclusion, an elevated level of CK in a patient with hypocholesterolemia can suggest CRD.

Acanthocytes can be seen in advanced liver disease, rare vitamin E genetic deficiency or neurodegenerative syndromes (McLeod), AB, or homozygous HB. In CRD, acanthocytosis is rare, and sometimes transient. It is dependent on the vitamin E level which is a key to red cell membrane integrity. Therefore, the presence of acanthocytosis is hardly compatible with CRD.

As previously mentioned, hepatic abnormalities may be present. Nonspecific hepatic cytolysis is very frequent, but moderate, ( $1.5-3 \times N$ ), and poorly correlates with steatosis and/or hepatomegaly.

Malabsorption of fat leads to deficiency of fat soluble vitamins and essential fatty acid (EFA). Steatorrhea at the time of diagnosis (usually a few months after the onset of the first symptoms) is invariably present and depends on the quantity of fat ingested. With a low-fat regimen, steatorrhea may be falsely negative. The calculation of % fat absorption on a normal fat diet is a key diagnostic test in all patients suspected of CRD.

Fat malabsorption alters fat-soluble vitamins in variable ways. Vitamin E is the most affected among the liposoluble vitamins in CRD, because its transport is highly dependent on apo B-containing lipoproteins [40]. Vitamin E deficiency is constant at diagnosis in young children. In CRD, the decrease is drastic and most of the time permanent, even with vitamin E supplementation. Vitamin A is often decreased, but easily corrected with oral supplementation. Finally, vitamin D or K insufficiency detected in half the patients can also be corrected with supplements.

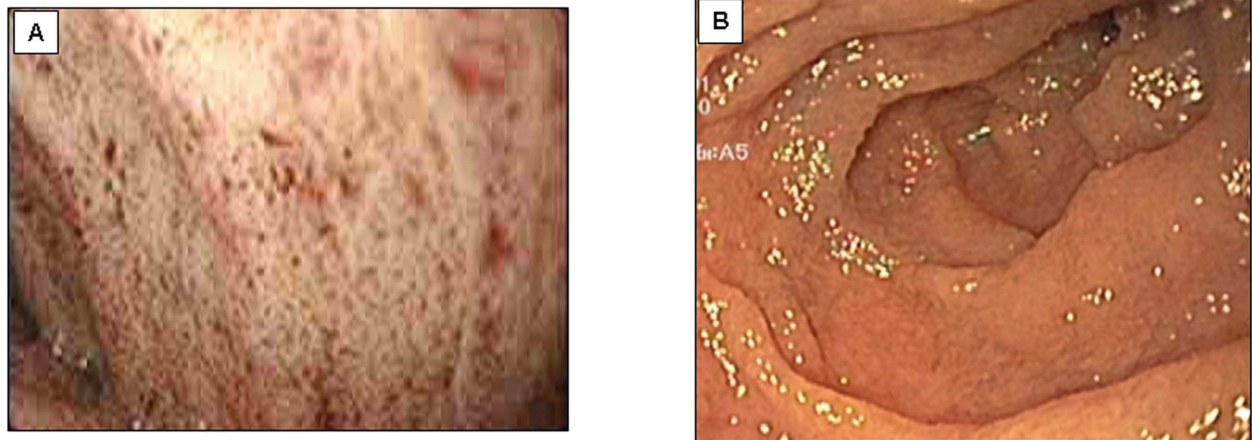
Fat malabsorption also affects the EFA profile. At diagnosis, our CRD patients had abnormal plasma fatty acid profiles, as evidenced by n-6 deficiency (linoleic acid; C18:2n-6) and, surprisingly, normal omega-3 levels. In addition, EFA deficiency manifested by a high 20:3n-9/20:4n-6 ratio, ( $0.04 \pm 0.02$  in CRD vs  $0.01 \pm 0.005$  in control patients); normal value  $<0.02$  was observed in the Canadian cohort [30].

The oral fat loading test helps evaluate intestinal fat absorption. Patients fast for 12 h and ingest 50 g of fat per  $1.73 \text{ m}^2$  surface area (flavored commercial cream). Plasma lipids are measured at 2, 3 and 5 h following the fat meal. All patients with CRD do not respond to an oral fat loading test: TGs are normal or slightly decreased at baseline and do not increase at 3 and 5 h while low HDL-C stays low and no chylomicrons are identified. However, this test does not discriminate CRD from the other genetic disorders with hypocholesterolemia.

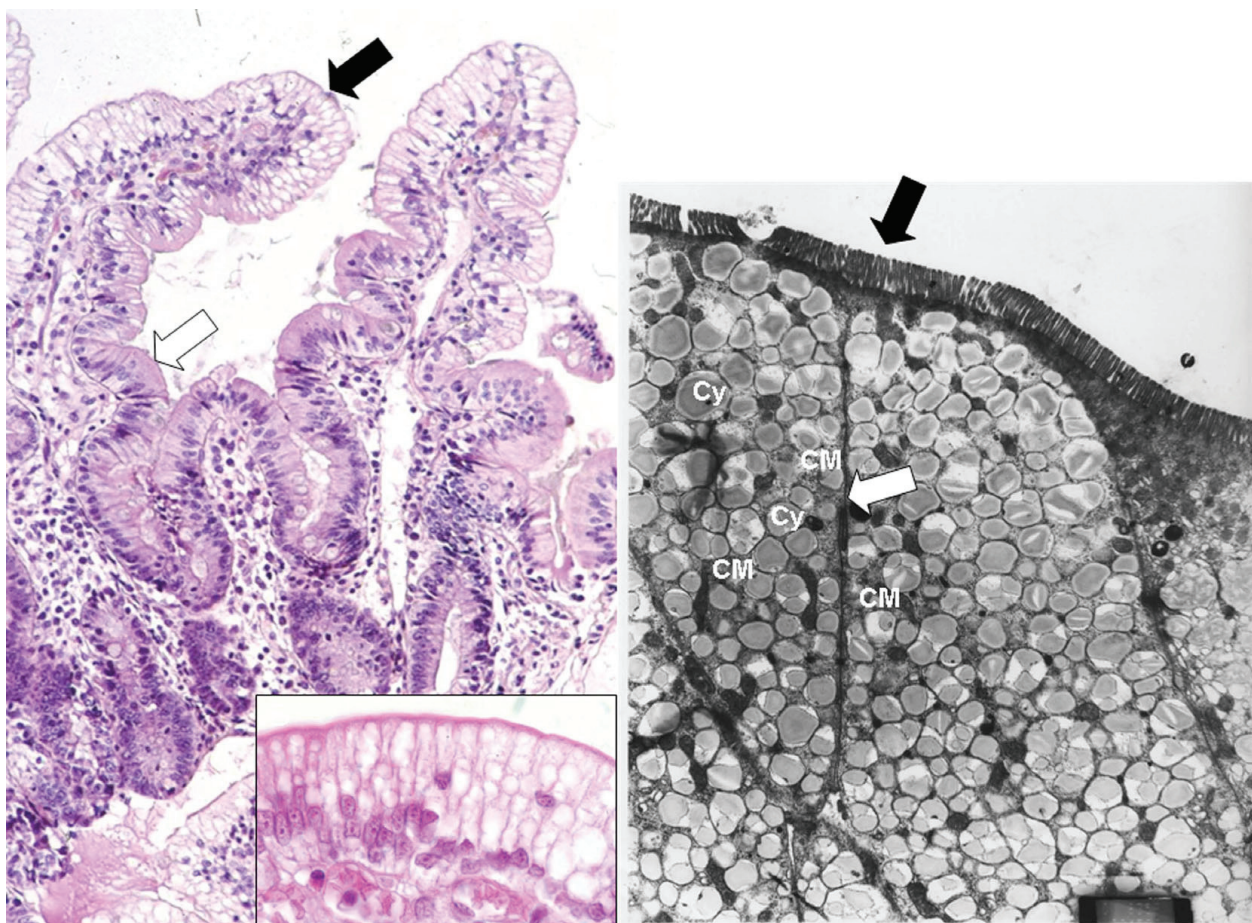
### Endoscopy and Histology

Upper endoscopy reveals a white duodenal mucosa with normal esophageal and normal gastric mucosa (Figure 2).





**Figure 2 Endoscopy of a CRD patient.** Upper endoscopy reveals a white duodenal mucosa in CRD (Panel A) compared with normal subjects (Panel B).



**Figure 3 Histology of a jejunal biopsy from a CRD patient.** Panel A: photomicrograph of hematoxylin-eosin staining showing vacuolization of enterocytes and well preserved villous structure. The distribution of vacuolization, which corresponds to lipid droplets, is heterogeneous: fat filled enterocytes (black arrow) in the upper part of the villus are associated with normal enterocytes in the crypts (white arrow) ( $\times 20$ ). Panel B: Higher magnification ( $\times 100$ ) of the same patient's biopsy. Panel C: Electronic microscopy. The pictures show the apical pole of the enterocytes exhibiting well-preserved microvilli (black arrow), numerous chylomicrons (CM) and fat droplets of homogenous size gorging the cytoplasm (Cy). The intercellular membranes demonstrate a complete juxtapposition of intercellular membranes where lipid particles are absent (white arrow) ( $\times 4000$ ).

To increase endoscopic sensitivity, a TG-rich diet is begun three days before the exam to improve the fat loading of enterocytes.

Histology shows multi-vacuolated enterocytes in intestinal villi of normal architecture (Figure 3). However, some patients demonstrate mild atrophic villi [21], which may be confused with celiac disease if lipid vacuoles are not identified. Furthermore, in the same patient, villi are affected to a variable extent and, among different patients, the percent of lipid-laden villi and the region of affected villi can vary substantially [19]. In most cases, the vacuolization is seen only in the upper one-third of the villi.

### Genetics

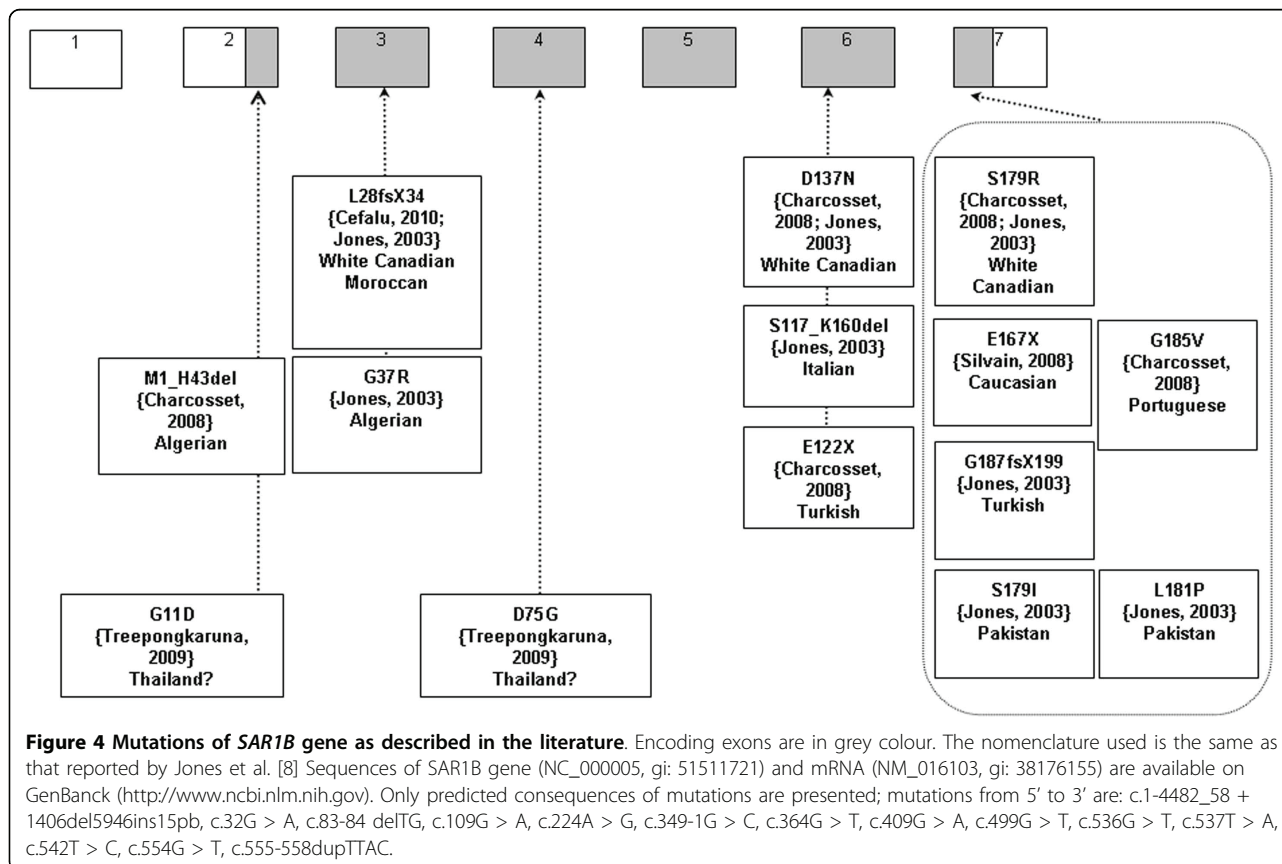
Finally, identification of the *SAR1B* gene mutation confirms the diagnosis. Since the discovery of *SAR1B* as the gene that causes CRD [8], 14 different mutations in about 30 patients have been described (Figure 4) [8,11,16,41]. Only two families have had frame shift mutations that cause CRD. Until now, missense mutations have represented the majority of *SAR1B* mutations. We previously reported the absence of a correlation in genotype-phenotype in a cohort of 16 patients with CRD [30] and Charcosset et al. analyzed

the putative consequences of different mutations including frame shift and missense mutations in CRD. Truncating variants would be expected to induce more severe phenotypes than just missense variants. However, the most deleterious mutation of lipid levels or growth reported in our cohort was a missense mutation (409G > A) [30]. Furthermore, the variation in clinical expression with the same mutation in different families [11] and even in the same family with the very surprising asymptomatic homozygote CRD mother, described by Cefalu et al [41], suggests that modifier genes may modulate the transport of the COP II vesicles and that CRD expression is more complex than a simple autosomal recessive disorder.

### CRD Management

Follow-up should be directed toward monitoring nutrition and growth, compliance to treatment and the presence of complications involving the liver, the neuromuscular system including the retina as well as bone health. Table 3 proposes a long term management program proposed for patients with CRD.

Growth is a pediatric-specific goal in patients with malabsorption syndromes. With early diagnosis and treatment, catch-up growth can be expected. However,





**Table 3 Chylomicron Retention Disease Follow-Up**

<i>Early Follow-Up (Annual)</i>	
	<b>Clinical</b>
<b>Anthropometry</b>	Weight and height to draw growth curve
<b>Digestive</b>	Appetite, diarrhea, abdominal distension, vomiting, hepatic size?
<b>Neurological</b>	Developmental retardation, areflexia, ataxia, dysarthria, deep proprioception loss, muscular weakness or pain, cramps?
<b>Dietary counseling</b>	Sufficient caloric intake, low fat diet (fat <30% total energy), EFA supplementation?
	<b>Biological</b>
<b>Lipids</b>	Total and LDL cholesterol, HDL-C, TG
<b>Hepatic</b>	AST, ALT, GGT, total bilirubin, alkaline phosphatase?
<b>Vitamins</b>	Plasma levels of vitamins A, D, E and K or INR (vit K deficiency)
<b>Essential Fatty Acids</b>	Deficiency induced by low fat diet?
<b>Blood cell count</b>	Anemia?
<i>Delayed Follow-Up (every 3 years)</i>	
	1) After the age of 10 years
<b>Hepatic</b>	Ultrasonography (steatosis, portal hypertension, yearly), Elastometry Fibroscan®? (further studies are needed)
<b>Neurological exam</b>	Clinical, creatine kinase, electromyography
<b>Ophthalmologic exam</b>	Fundus, color vision, visual evoked potentials, electroretinography
<b>Total body composition</b>	Bone mineral content for whole body
	2) Adult age
<b>Echocardiography</b>	Ejection fraction

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine kinase; EFA, essential fatty acids; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglycerides.

seven of our patients with a delayed diagnosis did not even reach the 20<sup>th</sup> percentile of their predicted growth potential of the 40<sup>th</sup> percentile. Tracking the growth curve is essential in the follow-up of CRD children. Annual evaluation is appropriate.

The evolution of hepatic cytolysis seems favorable. However, the lack of very long-term data means that patients should be followed carefully. Therefore, measurement of hepatic transaminase levels and ultrasonography should both be carried out. An evaluation every three years after the age of ten seems a reasonable frequency for these non-invasive low-cost exams. Liver stiffness measured by elastometry (Fibroscan) could be a useful tool to detect early fibrosis, but this proposal needs further evaluation.

Neurological, muscular and ophthalmologic complications in CRD are less severe than in ABL or homozygous HBL, but may occur during infancy and require rigorous follow-up and compliance with vitamin treatments. The lack of data on long-term outcome in treated patients with CRD means that rigorous follow-up is required. Although high CK levels may indicate severe muscular impairment, they are inadequate to evaluate neuromuscular progression. Therefore, beginning at pre-puberty (ten years old), neurological and ophthalmologic examinations may be necessary every three years to detect complications such as developmental retardation, areflexia, ataxia, dysarthria, loss of deep proprioception, muscular weakness and decreased night vision. Furthermore, it seems reasonable

to schedule a specialized neurology and ophthalmology consultation every three years to conduct electromyography, measure visual evoked potentials, and perform electroretinography, because electrical abnormalities occur before clinical symptoms. Finally, we suggest echocardiography in adulthood (>18 years), since early detection of cardiac impairment may motivate patients who have discontinued their vitamin therapy to restart it. It may also help to schedule treatment before clinical manifestations of cardiac insufficiency develop. A frequency of every three years seems reasonable for this noninvasive exam.

Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) may be performed to measure the bone mineral content of the total skeleton, the best index of bone mineralization in children [42,43].

#### CRD Treatment

Table 4 summarizes our proposed treatment protocol. A low-fat diet containing an appropriate amount and ratio of n-6/n-3 is necessary to improve digestive symptoms. In very young children, milk preparations with medium-chain TG may improve diarrhea and correct malnutrition within a few days but tolerance can be a problem. In older children, a regimen low in long-chain fatty acids is usually sufficient to decrease symptoms.

Vitamins E and A are implicated in neurological, muscular and ophthalmic complications. High dosages of vitamin E (100 IU/kg/d) have been reported to

**Table 4 Chylomicron Retention Disease Treatment**

Early diagnosis without neurological complications: PO	Delayed diagnosis and neurological complications: PO + IV
<b>Diet</b>	
Low-fat diet	
Enriched in essential fatty acids (vegetable oils, fish...)	
± Enriched in medium-chain triglycerides	
<b>Liposoluble Vitamins PO</b>	
Vitamin E (hydrosoluble form): 50 IU/kg/d	
Vitamin A: 15,000 IU/d (adjust according to plasma levels)	
Vitamin D: 800-1200 IU/kg/d or 100,000 IU/2 month if < 5 y old, and 600,000 IU/2 month if > 5 y old	
Vitamin K: 15 mg/week (adjust according to INR and plasma levels)	
<b>One perfusion/month</b>	
Fatty acids: intralipid 20% 2 g/kg/month	
Vitamin E: 4 to 6 mg/kg/month	
Vitamin A: 500 IU/kg/month	

PO, per os; IV, intravenous.

prevent, slow or improve neurological complications in different hypocholesterolemia disorders such as ABL [35,44-48]. Furthermore, these high intakes are safe. Relatively few side effects in the short term have been reported in double-blind studies of vitamin E at doses as high as 2000 or 3200 IU/d [49]. Alpha-tocopherol either in aqueous or lipid form is the most effective form of vitamin E to prevent neurological complications. Indeed, nerve tissue is characterized by slow exchange and high selectivity for alpha-tocopherol [50]. Lipid malabsorption is a common feature of several diseases, such as celiac disease, cystic fibrosis and cholestasis. In the attempt to promote liposoluble vitamin absorption, new pharmacologic formulations of vitamin E have been developed. Tocopheryl polyethylene glycol succinate is a hydrosoluble form of vitamin E. This water-soluble formulation showed a marked and statistically significant increase in the absorption of gamma-tocopherol in malabsorbing patients with cystic fibrosis (CF) compared with a classic oil-based formulation [51]. Recently, intestinal absorption of water-soluble vitamin E (tocofersolan) was compared with a water-miscible form in 12 CF or cholestatic children [52]. Oral tocofersolan was more bio available than the water-soluble formulation in children with chronic cholestasis and similarly bio available in CF. This suggests that water-soluble vitamin E may represent an alternative to painful intramuscular vitamin E injections in chronic cholestasis, or other oral formulations in CF. However, the mechanism responsible for fat malabsorption in CRD concerns the absorptive phase as opposed to the digestive phase in CF and cholestatic syndromes. To our knowledge, no specific studies with these new vitamin E preparations have been conducted in CRD. For CRD, further investigation on the efficacy of water-soluble vitamin E is

needed. Our 16 CRD patients received an average of  $51 \pm 32$  IU/kg/d of vitamin E with some receiving a dosage as high as 100 IU/kg/d. Despite higher dosages of oral vitamins E and A and, in some cases, compliance ensured by intravenous administration, four of the seven French patients developed mild clinical signs of neurological impairment. This may be due to the delayed diagnosis or influence of the mutation. However, the majority of patients (12/16 patients) with a medium dosage of 50 IU/kg/d, sometimes as low as 20 IU/kg/d, did not develop clinical or electrical neuro-ophthalmologic complications when the treatment was given during the first years of life. Therefore, it seems reasonable to prescribe only 50 IU/kg/d of vitamin E to patients with CRD if the disease is diagnosed during the first year of life.

To prevent complications, our data do not suggest that the intravenous route is warranted. The oral route is sufficient, as illustrated by the nine patients in the Canadian cohort who were treated orally early on and who remained free of neurological complications (including two patients aged 22).

Determination of the appropriate dosage of vitamin E can be problematic. In our cohort, plasma concentration measurements were too imprecise to serve as a guide for clinicians. Plasma levels after supplementation reached only one half to two thirds of normal levels, independent of the vitamin E dose. Among the 16 patients with 20, 40 or 100 IU/kg/d, one may find the same plasma vitamin E levels of around 60% of the lower normal range. This level is comparable with that obtained in ABL after oral supplementation with high doses (45% of the normal range for 100 IU/kg/d of vitamin E) [53]. Furthermore, plasma levels of vitamin E did not necessarily correlate with vitamin E dosages. The severity of steatorrhea was not correlated with vitamin E

and A deficiency in our patients. Therefore, vitamin treatment cannot be adjusted to the severity of fat malabsorption. An interesting alternative could be to measure vitamin E levels in subcutaneous adipose tissue. It was previously demonstrated that after supplementation, adipose tissue concentrations reach normal levels, even if plasma levels remain low [54].

Experience with our 16 patients suggests that vitamin A at a dosage of 15000 IU/d is effective in combination with vitamin E to prevent ophthalmologic complications in CRD.

When vitamin D treatment (800 to 1200 IU/d) is started early, it prevents osteopenia, as illustrated by the nine Canadian patients.

Vitamin K was administered at the same dosage of 15 mg/week in the two groups. The plasma values were not measured, but coagulation screening was normal and no hemorrhages were detected in any patient during the entire follow-up.

Patients with lipid malabsorption are at an increased risk for EFA deficiency. Such as mentioned previously, a low-fat diet is necessary to improve digestive symptoms, but it may increase the risk of EFA deficiency. Therefore, dietary counseling is needed not only to decrease fat intake but also to maintain sufficient caloric and EFA intake. It was recommended that the nine Canadian patients add one to three teaspoons per day of soybean oil to meals and increase fish consumption to two to three times per week. The objective was to reach 3-5% of total calories with omega 6, and 0.5-1% with omega 3. The French cohort (seven patients) had the same dietary recommendations, but each month four of them also received an infusion of 80 g of lipid emulsion containing 8 g of EFA (linoleic, 80% olive oil and 20% purified soy oil). The other three patients drank 25 g per day of oral supplements containing medium-chain TG (Liprocil, 80% MCT, Nestlé, France). Intravenous and oral supplementations were unable to normalize the EFA plasma levels. Furthermore, the clinical impact of this supplementation is not obvious, since the Canadian cohort had less supplementation and worse plasma levels, but fewer complications. This discrepancy may be explained by a difference between plasma fatty acid levels and the fatty acid concentration in tissues, since dietary fatty acids are mainly carried by chylomicron vesicles, which are dramatically decreased in CRD. Adipose tissue biopsies could provide some answers to this question. Simple counseling to increase oral EFAs with vegetable oils and fish seems appropriate in CRD, as illustrated by the excellent clinical progression of the nine Canadian patients despite the low plasma omega-6 levels. However, prospective clinical studies with fatty acid supplementation are needed to evaluate the optimal dose, route of administration and long-term impact of

EFA treatment. Similarly, the role of medium-chain TG supplementation in CRD patients remains to be defined.

## Conclusions

CRD diagnosis and management remain challenging for clinicians. Significant progress has been made with regard to the pathogenesis of CRD, the relationship between genotype and phenotype and its outcome. Thanks to the experience of two medical centers and a review of the literature, this paper proposes clinical guidelines for the diagnosis, follow-up and treatment of CRD.

The major clinical and biological features of CRD are summarized in Table 2:

In infants under six months the disease presents as chronic malabsorptive diarrhea with malnutrition associated with an altered lipid profile: TGs are normal but both LDL-C and HDL-C are below 50% of normal levels, vitamin E deficiency and elevated CK are associated. In older children: there is in variably a history of chronic diarrhea with stunting of growth and delayed puberty eventually associated with mild neurological impairment and elevated CK. Hypocholesterolemia is also present with the same pattern, but may be overlooked. Chronic mild cytolysis of liver cells with an echographic pattern of steatosis may be an indication for screening. In both situations, endoscopy reveals a white duodenal mucosa by fat-laden enterocytes.

For follow-up (Table 3): During childhood, standard clinical examination and biological evaluations should be performed annually, focusing on nutrition growth, gastrointestinal, liver and neurological manifestations and complications.

In children over the age of ten, neurology and ophthalmology consultations bone densitometry should be obtained every three years. An echocardiogram can be added to those when adulthood is reached.

## Abbreviations

Å: ångström; ABL: abetalipoproteinemia; Apo: apolipoprotein; COPII: coating protein complex type II; CK: creatine kinase; CRD: chylomicron retention disease; EFAD: essential fatty acid deficiency; EFA: essential fatty acid; HBL: hypobetalipoproteinemia; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; TG: triglycerides; VLDL: very-low density lipoprotein.

## Acknowledgements

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (EL, MOP 10584) and the J.A. de Séve Research Chair in Nutrition (EL). Dr. Peretti's fellowship was supported by a Lavoisier grant from the French Ministry of Foreign Affairs. The authors wish to thank Mrs. Schohraya Spahis for her technical assistance.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Nutrition, CHU Sainte-Justine Research Center, Université de Montréal, 3175, Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

<sup>2</sup>Université Lyon 1; UMR 870, INSERM 8-870, INRA U-1235, Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69002, France. <sup>3</sup>Department of Nutrition-Hepatogastroenterology, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, Université Lyon 1,

Lyon F-69003, France. <sup>4</sup>UF Dyslipidemia Laboratory, Centre de Biologie Est, Biochemistry Laboratory, and Department of Endocrinology, Hôpital Neurologique et Cardiologique, Hospices Civils de Lyon, Lyon F-69003, France. <sup>5</sup>Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine Research Center, Université de Montréal, 3175, Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

#### Authors' contributions

NP, AS, CCR, AL, EL: conception, acquisition/analysis of the data, manuscript writing; CD, MC, AL: conception and acquisition/analysis of the data; JC, LPC, PM, SL: analysis of the data and manuscript revision. All the authors have read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 22 January 2010 Accepted: 29 September 2010

Published: 29 September 2010

#### References

- Mansbach CM, Siddiqi SA: **The biogenesis of chylomicrons.** *Annu Rev Physiol* 2010, **72**:315-333.
- Kindel T, Lee DM, Tso P: **The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons.** *Atheroscler Suppl* 2010, **11**:11-16.
- Leiper JM, Bayliss JD, Pease RJ, Brett DJ, Scott J, Shoulders CC: **Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells.** *J Biol Chem* 1994, **269**:21951-21954.
- Noto D, Cefalu AB, Cannizzaro A, Mina M, Fayer F, Valenti V, Barbagallo CM, Tuttolomondo A, Pinto A, Sciume C, Licata G, Averna M: **Familial hypobetalipoproteinemia due to apolipoprotein B R463W mutation causes intestinal fat accumulation and low postprandial lipemia.** *Atherosclerosis* 2009, **206**:193-198.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE: **Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia.** *Science* 1992, **258**:999-1001.
- Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ: **Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia.** *Nature* 1993, **365**:65-69.
- Shoulders CC, Stephens DJ, Jones B: **The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b.** *Curr Opin Lipidol* 2004, **15**:191-197.
- Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC: **Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders.** *Nat Genet* 2003, **34**:29-31.
- Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R: **COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum.** *Cell* 1994, **77**:895-907.
- Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T: **COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes.** *Cell* 1998, **93**:263-275.
- Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnott D, Levy E, Lachaux A: **Anderson or chylomicron retention disease: Molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein.** *Mol Genet Metab* 2008, **93**:74-84.
- Kirchhausen T: **Three ways to make a vesicle.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:187-198.
- Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM: **COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle.** *J Cell Sci* 2003, **116**:415-427.
- Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS, Mansbach CM: **Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER.** *J Cell Sci* 2006, **119**:943-950.
- Silvain M, Bligny D, Aparicio T, Laforet P, Grodet A, Peretti N, Menard D, Djouadi F, Jardel C, Begue JM, Walker F, Schmitz J, Lachaux A, Aggerbeck LP, Samson-Bouma ME: **Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the SARA2 gene associated with muscular and cardiac abnormalities.** *Clin Genet* 2008, **74**:546-552.
- Treepongkaruna S, Chongviriyaphan N, Suthutvoravut U, Charoenpipop D, Choubtum L, Wattanasirichaigoon D: **Novel missense mutations of SAR1B gene in an infant with chylomicron retention disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, **48**:370-373.
- Anderson CM, Townley RR, Freeman P: **Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood.** *Med J Aust* 1961, **48**(2):617-622.
- Bouma ME, Beucler I, Aggerbeck LP, Infante R, Schmitz J: **Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease.** *J Clin Invest* 1986, **78**:398-410.
- Dannoura AH, Berriot-Varoqueaux N, Amati P, Abadie V, Verthier N, Schmitz J, Wetterau JR, Samson-Bouma ME, Aggerbeck LP: **Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:2494-2508.
- Gauthier S, Sniderman A: **Action tremor as a manifestation of chylomicron retention disease.** *Ann Neurol* 1983, **14**:591.
- Lacaille F, Bratos M, Bouma ME, Jos J, Schmitz J, Rey J: **[Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases].** *Arch Fr Pediatr* 1989, **46**:491-498.
- Nemeth A, Myrdal U, Veress B, Rudling M, Berglund L, Angelin B: **Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicron retention.** *Eur J Clin Invest* 1995, **25**:271-280.
- Patel S, Pessah M, Beucler I, Navarro J, Infante R: **Chylomicron retention disease: exclusion of apolipoprotein B gene defects and detection of mRNA editing in an affected family.** *Atherosclerosis* 1994, **108**:201-207.
- Pessah M, Benlian P, Beucler I, Loux N, Schmitz J, Junien C, Infante R: **Anderson's disease: genetic exclusion of the apolipoprotein-B gene in two families.** *J Clin Invest* 1991, **87**:367-370.
- Polonovski C, Navarro J, Fontaine JL, de GF, Saudubray JM, Cathelineau L: **[Anderson's disease].** *Ann Pediatr (Paris)* 1970, **17**:342-354.
- Rey J, Jos J, Rey F, Leporrier M, Dechaux M, Ramon J, Frezal J: **[Idiopathic disorder of intestinal fat transport (Anderson's disease). A further case].** *Arch Fr Pediatr* 1973, **30**:564-565.
- Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, Orquin J, Brochu P, Weber AM, Morin CL: **Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease.** *Gastroenterology* 1987, **92**:390-399.
- Scott BB, Miller JP, Losowsky MS: **Hypobetalipoproteinemia—a variant of the Bassen-Kornzweig syndrome.** *Gut* 1979, **20**:163-168.
- Strich D, Goldstein R, Phillips A, Shemer R, Goldberg Y, Razin A, Freier S: **Anderson's disease: no linkage to the apo B locus.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993, **16**:257-264.
- Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, Seidman E, Brochu P, Vohl MC, Labarge S, Bouvier R, Samson-Bouma ME, Charcosset M, Lachaux A, Levy E: **Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts.** *Mol Genet Metab* 2009, **97**:136-142.
- Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel MC, Cazals-Hatem D, Bruckert E: **Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009, **21**:104-108.
- Braegger CP, Belli DC, Mentha G, Steinmann B: **Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinemia after liver transplantation.** *Eur J Pediatr* 1998, **157**:576-578.
- Partin JS, Partin JC, Schubert WK, McAdams AJ: **Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: Evolution of micronodular cirrhosis.** *Gastroenterology* 1974, **67**:107-118.
- Kayden HJ: **The neurologic syndrome of vitamin E deficiency: a significant cause of ataxia.** *Neurology* 1993, **43**:2167-2169.
- Sokol RJ: **Vitamin E and neurologic deficits.** *Adv Pediatr* 1990, **37**:119-148.
- Siddiqi SA: **VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes.** *Biochem J* 2008, **413**:333-342.
- Boren J, Veniant MM, Young SG: **Apo B100-containing lipoproteins are secreted by the heart.** *J Clin Invest* 1998, **101**:1197-1202.
- Nielsen LB, Veniant M, Boren J, Raabe M, Wong JS, Tam C, Flynn L, Vanni-Reyes T, Gunn MD, Goldberg IJ, Hamilton RL, Young SG: **Genes for apolipoprotein B and microsomal triglyceride transfer protein are**

- expressed in the heart: evidence that the heart has the capacity to synthesize and secrete lipoproteins. *Circulation* 1998, **98**:13-16.
39. Christensen B, Glueck C, Kwiterovich P, Degroot I, Chase G, Heiss G, Mowery R, Tamir I, Rifkind B: **Plasma cholesterol and triglyceride distributions in 13,665 children and adolescents: the Prevalence Study of the Lipid Research Clinics Program.** *Pediatr Res* 1980, **14**:194-202.
  40. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR: **The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia.** *Annu Rev Nutr* 2000, **20**:663-697.
  41. Cefalu AB, Calvo PL, Noto D, Baldi M, Valenti V, Lerro P, Tramuto F, Lezo A, Morra I, Cenacchi G, Barbera C, Averna MR: **Variable phenotypic expression of chylomicron retention disease in a kindred carrying a mutation of the Sara2 gene.** *Metabolism* 2010, **59**:463-467.
  42. Braillon PM, Cochat P: **Analysis of dual energy X-ray absorptiometry whole body results in children, adolescents and young adults.** *Appl Radiat Isot* 1998, **49**:623-624.
  43. Binkovitz LA, Henwood MJ, Sparke P: **Pediatric dual-energy X-ray absorptiometry: technique, interpretation, and clinical applications.** *Semin Nucl Med* 2007, **37**:303-313.
  44. Alex G, Oliver MR, Collins KJ: **Ataxia with isolated vitamin E deficiency: a clinical, biochemical and genetic diagnosis.** *J Paediatr Child Health* 2000, **36**:515-516.
  45. Azizi E, Zaidman JL, Eshchar J, Szeinberg A: **Abetalipoproteinemia treated with parenteral and oral vitamins A and E, and with medium chain triglycerides.** *Acta Paediatr Scand* 1978, **67**:796-801.
  46. Malloy MJ, Kane JP, Hardman DA, Hamilton RL, Dalal KB: **Normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. absence of the B-100 apolipoprotein.** *J Clin Invest* 1981, **67**:1441-1450.
  47. Miller RG, Davis CJ, Illingworth DR, Bradley W: **The neuropathy of abetalipoproteinemia.** *Neurology* 1980, **30**:1286-1291.
  48. Triantafyllidis JK, Kottaras G, Sgourous S, Cheracakis P, Driva G, Konstantellou E, Parasi A, Choremi H, Samouilidou E: **A-beta-lipoproteinemia: clinical and laboratory features, therapeutic manipulations, and follow-up study of three members of a Greek family.** *J Clin Gastroenterol* 1998, **26**:207-211.
  49. Anderson TW, Reid DB: **A double-blind trial of vitamin E in angina pectoris.** *Am J Clin Nutr* 1974, **27**:1174-1178.
  50. Vatsessy GT, Fahn S, Kuskowski MA: **Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. Parkinson Study Group.** *Neurology* 1998, **50**:1900-1902.
  51. Papas K, Kalbfleisch J, Mohon R: **Bioavailability of a novel, water-soluble vitamin E formulation in malabsorbing patients.** *Dig Dis Sci* 2007, **52**:347-352.
  52. Jacquemin E, Hermeziu B, Kibleur Y, Friteau I, Mathieu D, Le CF, Moysse D, Gerardin M, Jacqz-Aigrain E, Munck A: **Bioavailability of oral vitamin E formulations in adult volunteers and children with chronic cholestasis or cystic fibrosis.** *J Clin Pharm Ther* 2009, **34**:515-522.
  53. Muller DP, Lloyd JK, Wolff OH: **The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption.** *J Inherit Metab Dis* 1985, **8**(Suppl 1):88-92.
  54. Kayden HJ, Traber MG: **Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans.** *J Lipid Res* 1993, **34**:343-358.

doi:10.1186/1750-1172-5-24

**Cite this article as:** Peretti et al.: Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010 **5**:24.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





---

# Anderson's Disease/Chylomicron Retention Disease and Mutations in the *SAR1B* Gene

---

A. Sassolas, M. Di Filippo, L.P. Aggerbeck, N. Peretti and M.E. Samson-Bouma

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/45976>

---

## 1. Introduction

Anderson's Disease (AD)/Chylomicron Retention Disease (CMRD) (OMIM #607689) is a rare autosomal recessively inherited lipid malabsorption syndrome characterized by hypocholesterolemia associated with failure to thrive, diarrhea, steatorrhea and abdominal distension that presents most frequently in young infants. Charlotte Anderson first published a description of the disorder in 1961 [1] based upon observations of a young girl of seven months of age who manifested a characteristic macroscopic and microscopic appearance of the intestinal mucosa which was filled with fat. Forty two years later, in 2003, Jones and colleagues [2], in 8 families, identified mutations in the *SAR1B* gene, which encodes for the intracellular trafficking protein SAR1b, and proposed that this was the molecular defect in the disorder. The disease is very rare. From the first clinical description of the disease up to the identification of the causal gene, only 39 patients from 24 families were described in the literature [3-21]. From 2003 to the present, 23 new patients from 14 additional families have been identified. In all, 16 different mutations in the *SAR1B* gene now have been described in 34 patients from 21 families [2, 22-27]. Here, we provide an overview of this disease, including the description of 4 new patients from 3 new families (one new mutation), and we describe the predicted molecular impact on the SAR1b protein of novel or previously-described mutations in the *SAR1B* gene.

## 2. Clinical features

The first symptoms of AD/CMRD, which most frequently occur within a few months after birth, consist of failure to thrive, diarrhea with steatorrhea and abdominal distension. Of the 62 patients described in the literature, only 4 were diagnosed as adults; two sisters presented with diarrhea that was found to have begun in infancy [21, 23], the third adult had severe neurological signs in infancy [6] and the past medical history of the last adult revealed some



clumsiness in walking and running and very loose bowel movements in infancy [7]. These patients may have spontaneously avoided the fat in their diets to minimize symptoms. Non specific malabsorptive diarrhea is present in almost all cases with steatorrhea, even when a low fat diet is observed [28]. The diagnosis is sometimes delayed (often for several years) because the symptoms are non-specific and are attributed to chronic diarrhea (cystic fibrosis or coeliac disease). Thus, 39/45 patients exhibited the first symptoms before one year of age, whereas only 21/52 received the proper diagnosis without undue delay. As consequence of diarrhea, failure to thrive (-1 to -4DS for height and/or weight) is also frequent (45/51 patients) and persists if a low fat diet is not instituted. Other digestive symptoms, such as vomiting or a grossly distended abdomen are commonly observed. Usually, if a low fat diet supplemented with lipid soluble vitamins is instituted, the growth starts again; however, some patients with a delayed diagnosis do not attain a normal height and weight [29]. Tolerance to fat in the diet has been reported in a few cases [14, 16, 22, 24, 27]; however, in most instances, diarrhea begins again when fat is reintroduced in the diet [29].

Hepatic and neurological abnormalities, although sometimes reported in young patients, generally are tardive manifestations, particularly when the diagnosis and the implementation of dietary vitamin supplements are delayed. Several cases of transient hepatomegaly have been described [6, 9, 11, 16, 17, 22] and one or both amino-transaminases (ASAT and ALAT) are frequently reported to be increased (13/15 patients of Charcosset [22]) but confirmed hepatic steatosis are infrequent (three cases described) [11, 25]. However, no instance of cirrhosis has been reported. In young adults or older patients, neurological abnormalities consist mainly of areflexia [11, 12, 14, 22]. In some cases, more severe neurological degeneration consisting of ataxia, sensory neuropathy and/or tremor has been reported [6, 7, 11, 19]. Mild defects in color vision and retinal function also have been observed [11, 14, 28] but no retinis pigmentosa has been reported. Acanthocytosis is very rare and usually transient [6, 12, 17, 27].

Mild muscular abnormalities have been described in several patients and consist mainly of muscular pain and cramps; one patient was described with myopathy [6]. Creatine kinase (CK) levels are often found to be elevated (1,5-2,5 times normal) [23, 27]. Jones et al (2003) have shown that high levels of SAR1B mRNA expression occurs in tissues other than intestine [2] and, therefore, extra-intestinal clinical manifestations might occur in AD/CMRD. Silvain et al have described a cardiomyopathy in an adult and documented the accumulation of lipids in some muscle fibers [23]. Consequently, clinical evaluation and follow-up of these patients should include CK levels and cardiac examination.

Poor mineralization and delayed bone maturation may be present and vitamin D levels may be normal or decreased [5, 12, 18, 21, 23, 28]. Several patients also have exhibited associated infectious diseases [14, 16].

AD/CMRD patients exhibit a particular recessive hypocholesterolemia which differs from other familial hypocholesterolemias. The hypocholesterolemia manifests itself by a decrease of plasma LDL (LDLc) and HDL (HDLc) cholesterol (both by approximately 50%) associated with a normal level of triglycerides (Table 1). The severe decrease of HDLc (the mean level

in patients is 0,49mM) associated with a normal triglyceride level is pathognomonic of AD, if all the secondary causes of malabsorption such as celiac disease, exocrine pancreatic insufficiency (cystic fibrosis or Shwachman-Diamond syndrome), and the Mc Kusick syndrome (small height and malabsorption with exactly the same lipid profile as AD) have been ruled out. Further, other causes of familial hypocholesterolemias must be carefully ruled out; for example, some patients with AD/CMRD have low levels of triglycerides and high levels of HDLc that are similar to those found in atypical abetalipoproteinemia [30, 31] or homozygous hypobetalipoproteinemia (data not shown). Plasma levels of vitamin E, measured before supplementation in patients diagnosed during the last decade, are usually low or very low (but detectable, from 0,5 to 6,8  $\mu$ M, 3 of 19 patients had undetectable levels). In patients described previously, the undetectable levels were probably due to technical limitations (reported values range from 0, 23 to 11,3  $\mu$ M, and 13 of 28 patients had undetectable levels). Mild decreases of vitamin A have also been found [5, 6, 11, 12, 18, 21, 24, 27] but there are normal levels of other fat soluble vitamins in most of the AD/CMRD patients.

Patients data	All published cases	Published cases with mutations
N	62	34
age at onset	56% < 3 mths, 87% < 1 year	53% < 3 mths, 84% < 1 year
age at diagnosis	60% > 1 year, 23% > 10 years	50% > 1 year, 23% > 10 years
major clinical data	90% diarrhea, 88% failure to thrive	90% diarrhea, 57% failure to thrive
TC mM	n=54 M=1,75 (0,86-3,38)	n=34 M=1,81 (1,11-2,82)
TG mM	n=48 M=0,87 (0,36-2,06)	n=33 M=0,92 (0,36-1,98)
HDLc mM	n=26 M=0,49 (0,32-0,83)	n=23 M=0,50 (0,32-0,83)
LDLc mM	n=26 M=0,87 (0,26-1,61)	n=23 M=0,88 (0,31-1,61)
apoB g/l	n=37 M=0,44 (0,20-0,82)	n=21 M=0,49 (0,20-0,82)
apoA1 g/l	n=31 M=0,52 (0,26-0,90)	n=18 M=0,52 (0,38-0,90)
Vitamin E $\mu$ M	n=43 M=2,74 (0 – 11,3)	n=23 M=2,81 (0 – 7,6)

(TC: total cholesterol, TG: triglycerides, HDLc: HDL cholesterol, LDLc: LDL cholesterol)

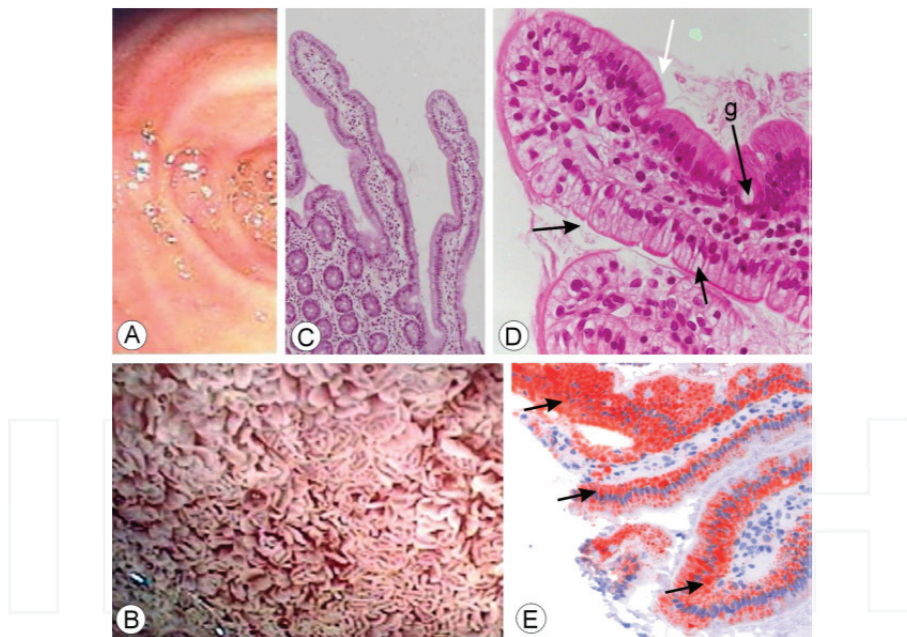
**Table 1.** Mean data for all the published cases

In most cases, an essential fatty acid (FA) deficiency has been not investigated, nevertheless, a decrease of linoleic acid (C18:2 n-6) and normal levels of n-3 FA have been found in two files of patients [10, 28]. For all the patients, the lipid profiles of the heterozygous parents were normal.

Four new cases of AD/CMRD in 3 families have recently been discovered (Table 2, 3). All the individuals presented with diarrhea and failure to thrive (4/4 patients). Interestingly, one of the patients presented with tremor at diagnosis (Table 2). The plasma lipids and vitamin E exhibit a wide range of levels and, in particular, the triglycerides and total and LDL cholesterol values which is an other characteristic of AD.

The inability of the enterocytes to secrete chylomicrons and apoB 48 after a fat load is a common clinical feature of AD/CMRD, ABL (abetalipoproteinemia) and, generally,

homozygous FHBL (familial hypobetalipoproteinemia). When observed with video-endoscopy, the intestine of AD/CMRD patients shows a white mucosa (“*gelée blanche*”). This typical white stippling, like hoar frosting, covers the mucosal surface of the small intestine (Fig 1A, B) even in the fasted state in contrast to healthy individuals. When intestinal biopsies from patients who have fasted are observed by light microscopy, they appear to have a normal number of *villi* of appropriate length. However, the enterocytes are overloaded with birefringent droplets in the cytoplasm (Fig 1 C, D) [1, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16-18, 20, 25, 27]. These droplets are present, mainly, in the upper one-third of the *villus* of the enterocyte and they stain positively with oil red O indicating that they are fat droplets (mainly triglyceride) (Fig 1D, E). In some cases, the droplets are seen to be present preferentially on one side of the *villus* as opposed to both sides, whereas, in other cases (or sometimes in the same case), they may be present on both sides [32]. When the biopsies are examined by electron microscopy, two types of lipid-containing structures, in fact, are observed in the cytoplasm which alter the normal architecture of the cells. Very large lipid droplets (1025 nm average diameter), not in a membrane-bound compartment, are present along with smaller lipoprotein-sized particles (305 nm average diameter) which are present in membrane-bound structures (Fig 2 A, B) [32]. This is in contrast to enterocytes in biopsies



Intestinal endoscopy after a 12-hour fast. In contrast to what is observed in a normal subject (A), video-endoscopy of the duodenum (D) of patient AD2 (B), shows the typical « white hoary frosting » on the small intestinal mucosa. In contrast with a normal subject (C), light microscopy of the duodenal biopsy from AD2 (D) shows the typical vacuolated enterocytes (black arrows) that stain positively with oil red O (E, black arrows). Note the typical heterogeneous aspect of the villi either fat loaded (black arrows) or without lipid droplets (white arrows). Goblet cells are normal (D, arrow g). (C  $\times 100$ ; D  $\times 400$ ; E  $\times 200$ ).

**Figure 1.** Intestinal endoscopy after a 12-hour fast (A, B, C, D, E) (from A. Georges [27])

from patients with ABL which exhibit only (or predominantly) the very large lipid droplets whereas the smaller lipoprotein-sized particles, in membrane bound structures, are absent. In the enterocytes of both AD/CMRD and ABL patients, the Golgi apparatus is often distended but it is, generally, empty and free of lipoprotein-like particles. Further, in AD/CMRD, lipoprotein-like particles are observed, although in only a few cases, in the intercellular spaces between the enterocytes in contrast to ABL where they are never observed in intercellular spaces.

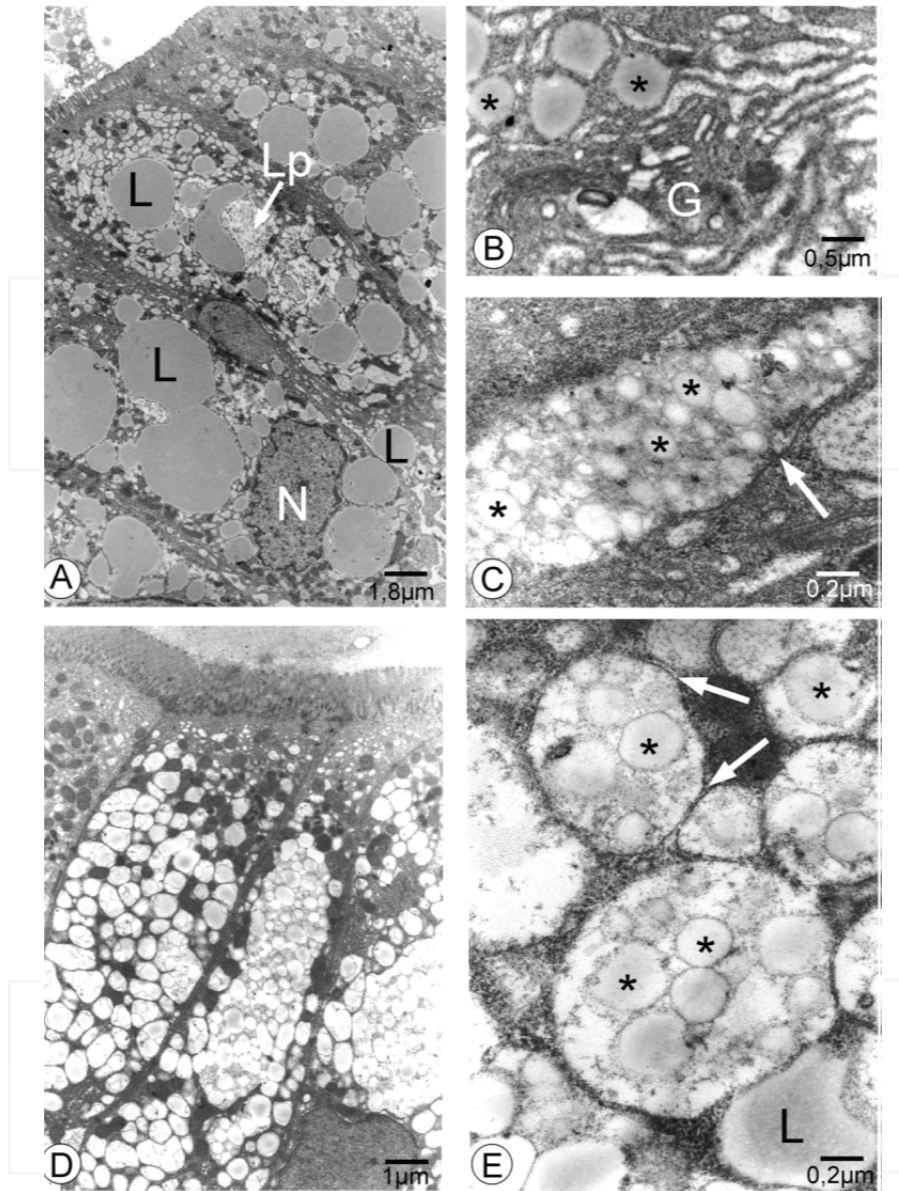
In addition to the lipid profiles of the patient and the parents, the diagnosis is supported by the absence of secretion of chylomicrons after a fat load, the presence of white duodenal mucosa upon endoscopy, the presence of cytosolic lipid droplets and lipoprotein-sized particles in the enterocytes of the intestinal biopsy and, finally, the discovery of a mutation in *SAR1B* gene. It should be noted, however, that the AD/CMRD phenotype has been observed in patients for which there is no mutation in the coding sequence of the *SAR1B* gene ([33] and unpublished data).

### 3. Functions of the *SAR1B* protein

*SAR1* is a well-known GTPase (guanine tri-phosphatase) which belongs to the ARF (ADP-ribosylation factor) family of small GTPases [34, 35]. *SAR1* initiates the assembly of COPII (coat protein complex II) in the endoplasmic reticulum (ER) by binding to SEC12. Then, *SAR1*-GDP is converted into *SAR1*-GTP which undergoes a large conformational change in the two switch regions. The residue Threonine 56, in switch 1, forms bonds to the  $\gamma$  phosphate and  $Mg^{2+}$  and the residue Glycine 78, in switch 2, binds to the  $\gamma$  phosphate. The movements expose the amino terminal, amphipatic  $\alpha 1$  helix (« the membrane anchor ») which then inserts into the ER membrane [36].  $Mg^{2+}$  has an important regulatory role in this conformational change, mostly related to switch 1 [37]. The membrane-bound *SAR1* recruits SEC23-SEC24 and triggers the formation of the pre-budding complex which then recruits SEC13-SEC31 to form the COPII vesicle [36, 38]. SEC24 interacts with specific cargo proteins and concentrates them into the COPII vesicle [39]. *SAR1* GTP hydrolysis is stimulated by SEC23 and SEC31 and permits vesicle fission, allowing transport to the Golgi, and eventual disassembly of the coat for recycling of the components [40-42]. SED4p, a protein with 45% homology to SEC12p, accelerates the dissociation of SEC23-24 from the membrane if no cargo is transported with COPII vesicles and it has been proposed that this restricted disassembly might play a role in concentrating cargoes into COPII vesicles [43].

The typical size of the COPII vesicles ranges from 60 to 70 nm in diameter, which would appear to prohibit these vesicles from carrying chylomicrons (250 nm average diameter) from the ER to the Golgi apparatus [44]. Another vesicle (350-500 nm in diameter), the pre-chylomicron transport vesicle (PCTV), has been shown to be able to transport chylomicrons [45]. The PCTV is composed of several proteins: VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) which is the v-SNARE (vesicle-associated soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), apoprotein B48 (a cargo), FABP1 (also called liver fatty acid-binding protein, LFABP) (budding initiator), the fatty acid transporter CD36 (a fatty





**Electron microscopy of duodenal biopsies of patients with AD.** As shown for AD3 (A, B, C) and AD2 (D, E), two types of particles are apparent in the enterocytes in these patients (A, D): large lipid droplets, free in the cytoplasm (L), and smaller, lipoprotein-sized like particles (Lp), surrounded by a membrane. A higher magnification shows in (B) some individual lipoprotein-sized particles surrounded by a membrane (\*) near a Golgi apparatus (G) which appears distended but devoid of particles and in (C, E) numerous lipoprotein-sized particles accumulated in membrane bound compartment (membrane, white arrow). The intercellular spaces are empty. The cell nucleus is labelled N.

**Figure 2.** Electron microscopy of duodenal biopsies of patients with AD (from A. Georges ref 27)





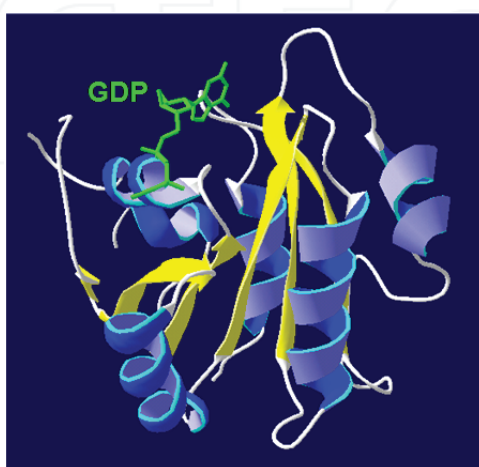
acid translocase) and the COPII proteins [46]. PCTV budding does not require GTP (and, consequently, SAR1) but rather ATP [44]. Further, VAMP7 is necessary for the fusion of the PCTV with the Golgi [44, 47]. The role of Sar1 in the budding of PCTV has been clarified, recently, in an elegant study by Siddiqi and Mansbach (2012) [47]. They showed that the binding of FABP1 to intestinal ER generates PCTV. A cytosolic multi-protein complex (composed of SAR1b, SEC13, SVIP (Small VPC/p97- Interactive Protein) binds all the FABP1 which is subsequently liberated by the phosphorylation of SAR1b by PKC $\zeta$  (Protein Kinase C Zeta).

These findings raise a number of questions as to the mechanism by which *SAR1B* gene mutations could affect PCTV transport to produce AD/CMRD. In particular, it is not clear how mutations that are located in regions involved in the binding and hydrolysis of GDP/GTP (and for which the effect on COPII mediated transport is evident) would affect PCTV transport (see below: Predicted impact of the mutations). Since SAR1b plays a role in both vesicle budding and vesicle fusion to the Golgi apparatus, further studies will be necessary to completely understand the apparently multiple roles that SAR1b plays in PCTV transport. Recently, L Jin and coll showed that the ubiquitylation by CUL3-KLHL2 allow the formation of COPII vesicle of a size sufficient to transport collagen (300-400 nm) [48]. It is of interest to know whether this mechanism also could permit the transport of chylomicrons. These recent data provide novel insights into the possible mechanisms for the transport of chylomicrons (either by PCTVs or COPII vesicles) and are very interesting because impaired COPII function results not only in AD/CMRD but also in collagen deposition defects [49] and lenticulo-structural dysplasia (*SEC23A* mutation). However, given the ubiquitous expression and essential roles of COPII components such as SAR1 and SEC23 as well as other proteins involved in trafficking between ER and Golgi, it is still not entirely clear as to how mutations in these proteins produce diseases with such marked tissue specific effects and low incidence.

#### 4. Structure of the SAR1b protein

Although the SAR1 protein is included in the GTPase superfamily (and, in particular, the RAS superfamily) members of which are present in most living cells, from bacteria to vertebrates, it is only slightly related to other RAS or ARF proteins and is distant from the RAB/YPT1/SEC4 subclass [50, 51]. SAR1 is conserved from an evolutionary standpoint and appears to present in all eukaryotes. However, whereas yeast and insects have a single SAR1 protein, higher organisms express two forms, SAR1b and SAR1a (both with 198 amino acids), which differ by 20 amino-acid residues [52]. The function of SAR1a has not been elucidated yet and, to date, no variant in the *SAR1A* gene has been described. The sequence alignment of SAR1b as compared to SAR1p (Figure 3) illustrates the different regions that are highly conserved across species and shows the different functional motifs in SAR1b that participate in vesicle budding, in GDP/GTP binding and hydrolysis and in interactions with other COP proteins.

Five X-ray crystallographic-derived structures for SAR1b bound to GDP or GTP, alone or complexed with other COPII components, have been deposited in the Protein Data Bank. Three of these structures are derived from *S. cerevisiae* (yeast) recombinant protein and two from *Cricetulus griseus* (hamster) recombinant protein. These structures provide insights into the structural changes that SAR1b may undergo upon GDP/GTP binding as well as demonstrating which parts of the protein constitute interfaces with other COPII components. No X-ray derived structures of SAR1b complexed with components of the PCTV are available to our knowledge. There is also one X-ray derived structure for SAR1a using human recombinant protein.



Using the 1F6B model *Cricetulus griseus* SAR1b [53]  
(which lacks the first twelve AA)  
and Swiss pdb Viewer:  
two residues were modified (I80V, V163I)  
in order to produce a structural module  
having a sequence identical to that of human SAR1b.  
In yellow:  $\beta$  strands  
In blue:  $\alpha$  helices  
In white: loops  
In green: GDP

**Figure 4.** Three dimensional structure of SAR1B protein

The X-ray structures show that SAR1b has six central  $\beta$  strands (5 parallel,  $\beta$ 2 antiparallel) that are sandwiched between three  $\alpha$  helices on each side (Figure 4). In SAR1-GDP (the inactive form), the  $\alpha$ 1helix is retracted into a pocket formed by the  $\beta$ 2-  $\beta$ 3 hairpin. The  $\beta$  strands 1-2-3 are approximately parallel to the membrane allowing their juxtaposition with the membrane (the N and C terminus and  $\beta$ 2-  $\beta$ 3 hairpin would participate in this membrane interaction) [36]. The  $Mg^{2+}$  ion is coordinated by an oxygen atom of the phosphate of the GDP and the hydroxyl oxygen of Threonine residue 39 (in SAR1-GDP) [37]. Many H bonds stabilize the structure and could be altered by mutations (see discussion below), for example Ser 179 with Asp 137 and Leu 181 [2].

The X-ray data also provide insights into the roles played by the different parts of the structure in SAR1b functions (see the protein alignment Figure 3). The amino- (N) terminal part of SAR1b contains the STAR (SAR1 NH2 Terminal Activation Recruitment) motif, a hydrophobic sequence of amino acids (AA) (1-9), a structure different from other ARF superfamily GTPases, which recruits SEC12, and the  $\alpha$ 1 amphipathic helix (AA 15-19, residues VLNFL). The role of the  $\alpha$ 1 amphipathic helix is fundamental as demonstrated by the loss of all export activity of SAR1B following the substitution of the 4 hydrophobic AA by 4 Alanine [53]. Between the STAR motif and the  $\alpha$ 1 helix, a short domain (AA 9-14, YSGFS) participates in deforming the ER membrane [38]. Three other regions contact the membrane, one each in the N- (AA 1-25) and carboxyl- (C) (AA 195-198) termini and a central motif in the  $\beta$ 2-  $\beta$ 3 strand (AA 65-70) [36, 38]. There is one motif that recognizes the guanine base (AA 134-137, NKXD) and two active sites for GTP hydrolysis (AA 32-38, motif GXXXXGK and AA 75-78, motif DXXG) [54]. Close to the GTP hydrolysis site, Threonine 39 is a highly conserved residue and the substitution T39N inhibits SAR1 function by interfering with activation by SEC12 [53].

The two switch regions (AA 48-59 and AA 78-94) contain two very important residues, the Threonine at position 56 and the Glycine at position 78, respectively [53]. A second unique structural region of SAR1, not observed in the ARF GTPases, is a long surface-exposed loop (AA 156-171) which connects the  $\alpha$ 4 helix and the  $\beta$ 6 strand and which regulates the function of SAR1b. The substitution Thr158Ala abolishes the activity of SAR1 [53]. A specific C-terminal motif (AA 171-181, PXEVFMC/VSV/L), present in the  $\beta$ 6 strand, targets SAR1b to the ER [55].

The three-dimensional structure was obtained by crystallography [36, 53] and then by a computational approach. By crystallography (without the nine first and the 48-55 residues), SAR1-GDP appeared as a dimer [37, 53]. Nothing is available about an in vivo GTPase activity with this dimer structure. Moreover, Long and coll (2010) showed that SAR1b may function as a monomer [56], so we will only consider the monomer form.

## 5. Predicted impact of the mutations in the *SAR1B* gene on the structure and function of the protein

Currently, including the 4 new cases belonging to 3 new families reported here (one new missense mutation), mutations in the *SAR1B* gene have been established for 43 individuals with AD/CMRD (belonging to 24 families). There are only 17 unique mutations. The majority of individuals are homozygous for their mutation (38/43) and 5 individuals from 4 families are compound heterozygous. There are a total of 7 nonsense and 10 missense mutations (Table 2). Since structural information concerning SAR1b in PCTV vesicles is not available, the discussion of the possible effects of *SAR1B* gene mutations upon protein function will be limited to the COPII vesicle transport system.

Recently we identified the same mutation (del exon2) as the Algerian family (n°2) in 3 patients from 2 Tunisian families (to be published).

<i>SAR1B</i>	DNA variant	protein mutation	ethnic origin	Family number	sex	status	age dg	references
exon 2 (1-58 bp)	c.32 G>A	p.G11D	thaï	1	M	comp Hz	11m	24
	c.-4482_58 +1406 del 5946 ins 15bp (named del exon 2)	p.M1_H43del p.M1_H43del	algerian algerian	2 2	F M	Ho Ho	6y 8y	22 22
exon 3 (59-178bp)	c.83_84 delTG	p.L28R fsX34	french canad	3	F	comp Hz	?	2, 11
	c.83_84 delTG	p.L28R fsX34	morrocan	4	F	Ho	7m	25
	c.83_84 delTG	p.L28R fsX34	morrocan	5	F	Ho	8m	27
	c.92 T>C	p.L31P	morrocan	6	M	Ho	3m	<i>this article</i>
	c.92 T>C	p.L31P	morrocan	6	M	Ho	15y	<i>this article</i>
	c.109 G>A	p.G37R	algerian	7	F	Ho	3,5y	2, 13
	c.109 G>A	p.G37R	algerian	7	M	Ho	3m	2, 13
	c.109 G>A	p.G37R	morrocan	8	M	Ho	3y	2, 12
	c.142 delG	p.D48T fsX17	turkish	9	M	Ho	10m	27
c.142 delG	p.D48T fsX17	turkish	9	F	Ho	1m	27	
exon 4 (179-244bp)	c.184 G>A	p.E62K	tunisian	10	F	Ho	7y	26
	c.224 A>G	p.D75G	thaï	1	M	comp.Hz	<i>(see family 1 exon 2)</i>	
exon 6 (349-480bp)	c.349-1 G>C	p.S117K160del	italian	11	M	Ho	12y	2, 19
	c.349-1 G>C	p.S117K160del	italian	11	M	Ho	19y	2, 19
	c.364 G>T	p.E122X	turkish	12	M	Ho	3m	22
	c.364 G>T	p.E122X	turkish	12	F	Ho	6y	22
	c.364 G>T	p.E122X	turkish	12	F	Ho	8y	22
	c.364 G>T	p.E122X	turkish	12	M	Ho	11y	22
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	13	M	Ho	?	2, 11
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	13	F	Ho	?	2, 11
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	3	F	comp.Hz	<i>(see family 3 exon 3)</i>	
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	14	M	Ho	3m	22
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	14	M	Ho	2m	22
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	15	M	Ho	3m	22
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	16	F	comp Hz	2w	22
	c.409 G>A	p.D137N	french canad	16	M	comp Hz	3,5m	22
c.409 G>A	p.D137N	french canad	17	F	Ho	50y	<i>this article</i>	
c.409 G>A	p.D137N	caucasian	18	M	Ho	8m	<i>this article</i>	
exon 7 (481-597bp)	c.499 G>T	p.E167X	caucasian	19	F	Ho	34y	21, 23
	c.499 G>T	p.E167X	caucasian	19	F	Ho	38y	23
	c.536 G>T	p.S179I	pakistan	20	F	comp Hz	6m	2
	c.537 T>A	p.S179R	french canad	16	F	comp.Hz	<i>(see family 16 exon 6)</i>	
	c.537 T>A	p.S179R	french canad	18	M	comp.Hz	<i>(see family 16 exon 6)</i>	
	c.537 T>A	p.S179R	french canad	21	F	Ho	10y	22
	c.537 T>A	p.S179R	french canad	21	M	Ho	2m	22
	c.537 T>A	p.S179R	french canad	22	F	Ho	5m	22
	c.542 T>C	p.L181P	pakistan	20	F	comp.Hz	<i>(see family 20 exon 7)</i>	
	c.554 G>T	p.G185V	portuguese	23	F	Ho	2y	22
	c.555-557 dupTTAC	p.G187LfsX13	turkish	24	F	Ho	1y	2, 16
	c.555-557 dupTTAC	p.G187LfsX13	turkish	24	M	Ho	1y	2, 16

(Ho: homozygous, comp Hz: compound heterozygous, age dg: age at diagnosis, m months, y years, w weeks)

**Table 2.** All published mutations in *SAR1B* gene

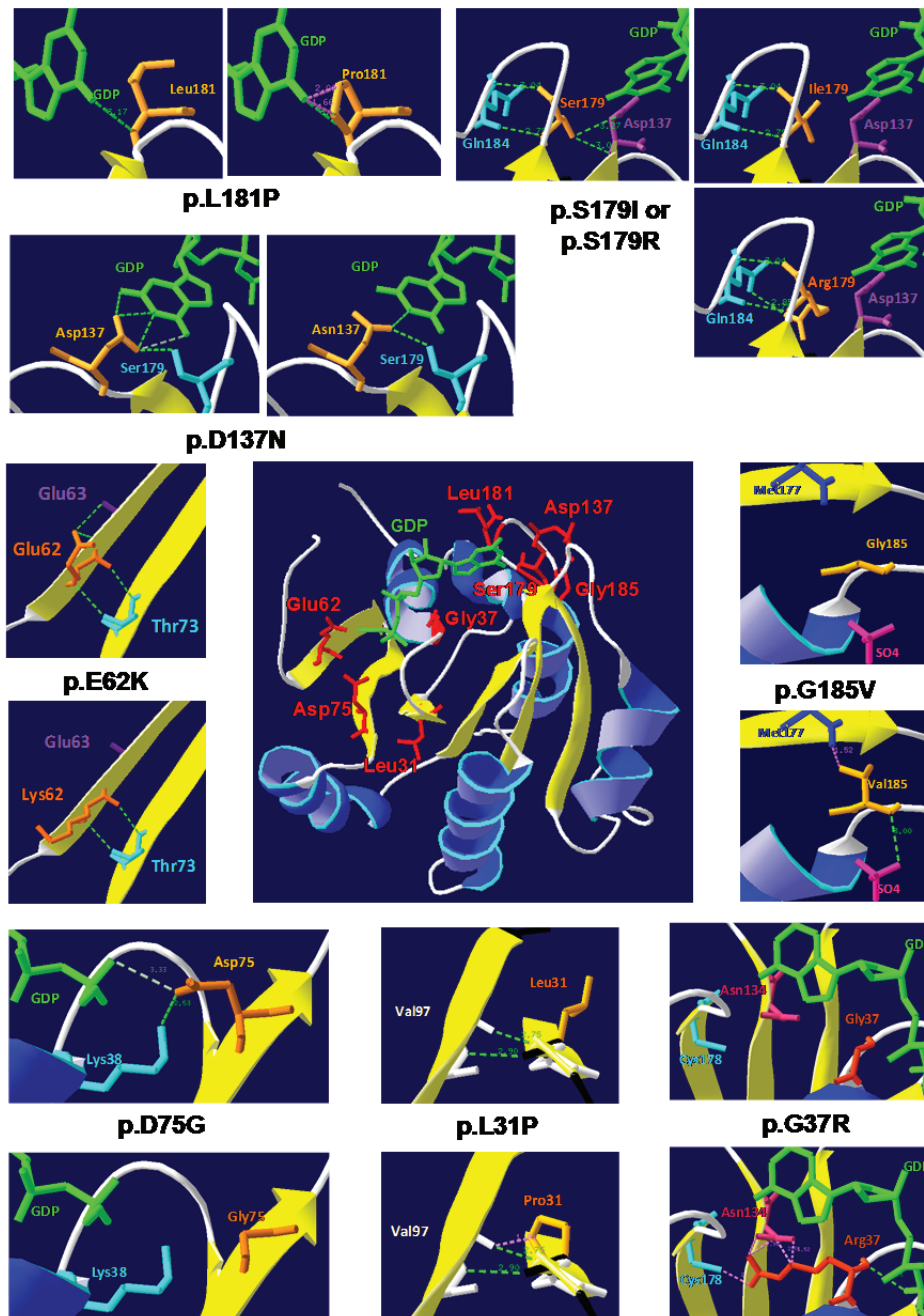
### 5.1. Nonsense mutations

Among the seven non-sense mutations, one deletes exon 2 (p.1-4482\_58+1406 del 5946 ins 15bp, named "del exon 2") and one eliminates exon 6 (p.S117K160del), two are stop codons (p.E122X, p.E167X) which lead to truncated proteins, and two deletions and an insertion produce frameshifts followed by stop codons (p.L28RfsX34, p.D48TfsX17, p.G187LfsX13) leading to truncated proteins and modified C-terminal sequences. The major deletion (5943bp) of exon 2 (family 2 and new Tunisian patients) potentially leads to 4 different proteins [22] each of which lacks part of the N-terminus. The largest fragment lacks the first 43 residues, including the STAR motif, the  $\alpha$ 1 helix, the active site for GTP hydrolysis and Threonine 39. The deletion of exon 6 eliminates the recognition site for the guanine base (AA 134-137) thus abolishing the function of SAR1b. The five other nonsense mutations (resulting in stop codons) produce truncated proteins lacking the C-terminus. The shortest fragment is predicted to have about 33 AA and the longest contains 187/198 AA but, interestingly, all are predicted to abolish the function of the protein in the same manner. This suggests that the C terminal part of the protein plays a major role in the function of SAR1.

### 5.2. Missense mutations

The Swiss-pdb Viewer 3.1 program ([57], available on <http://www.expasy.org/spdbv/>) was used to calculate atomic resolution structural models for SAR1b having missense mutations (Table 3). First, using the 1F6B model [53] and PDB for *Cricetulus griseus* SAR1b (which lacks the first twelve AA and the 48-55 residues), two residues were modified (I80V, V163I) in order to produce a structural module having a sequence identical to that of human SAR1b. The effects of the missense mutations of AD/CMRD on this "humanized" structure were then modelled.

All the missense mutations are located on the exterior of the three dimensional structure, in strategic places near the recognition, binding and hydrolysis sites for the guanine base (in the N- and C-terminii) and/or affect a highly conserved residue in SAR1/Arf proteins. From the N- to the C- terminus the predicted effects may be summarized as the following (Figure 3). The p.G11D mutation is located in the membrane interacting site (anchorage of the N-terminal part of the molecule) and probably prevents binding to SEC12 and fixation to the ER membrane. The substitution G11P, associated with Y9F and S14F, has been described as being deleterious for vesicle release [38], however no model is available for this mutation (since the coordinates of the first 12 residues of the protein could not be established by the X-ray study leading to the 1F6B structure). The new mutation p.L31P affects the AA just before the active site of GTP and could decrease the GTP hydrolysis. The substitution of a linear (leucine) by a cyclic (proline) residue could lead to steric hindrance (Figure 5). The p.G37R and the p.D75G mutations are located in two different GDP hydrolysis sites. Replacement of glycine 37 by arginine creates steric hindrances with C178 and N134 and the replacement of the aspartic acid 75 by glycine abolishes the H bond with L38. All four of these mutations reduce or eliminate the affinity of SAR1b for GDP/GTP and are expected to



Using the 1F6B model *Cricetulus griseus* SAR1b [53] and Swiss Pdb Viewer

**Figure 5.** Localization of missense mutations in the three-dimensional structure of SAR1B



	Energy kJ/mol <sup>a</sup>	Grantham distance <sup>b</sup>	Consequence of mutation on prot. (concerned residue) <sup>a</sup>	Residue conservation <sup>c</sup>				PolyPhen prediction (Score) <sup>d</sup>	SIFT prediction (Score) <sup>e</sup>
				Sar1b prot.	Sar1 prot.	Sar1/ Arf family prot.	Small GTP binding prot.		
wild type	-9 749								
G11D	no modelisation	94	no modelisation	?	0	0	0	possibly damaging (0,927)	affect protein (0,03)
L31P	-6560	98	steric hindrance (Val197)	+	c	c	c	probably damaging (1,0)	affect protein (0,02)
G37R	75988	125	steric hindrances (Asn134, Cys178)	+	+	+	+	probably damaging (1,0)	affect protein (0,00)
E62K	-7777	56	loss of one H-bond (Glu63)	+	c	+	0	possibly damaging (0,955)	affect protein (0,00)
D75G	-9406	94	loss of one H-bond (Lys38)	+	+	+	+	probably damaging (0,99)	affect protein (0,00)
D137N	-10 086	23	loss of one H-bond (GDP)	+	+	+	+	probably damaging (1,0)	affect protein (0,00)
S179I	-8867	142	loss of : one weak H-bond (GDP) and one H-bond (Asp137)	+	+	s	0	probably damaging (1,0)	affect protein (0,00)
S179R	-7550	110	loss of : one weak H-bond (GDP) and one H-bond (Asp137)		+	s	0	probably damaging (1,0)	affect protein (0,00)
L181P	-9023	98	steric hindrances with GDP	c	0	0	0	benign (0,281)	affect protein (0,00)
G185V	127 288	109	Steric hindrance (Met177)	+	+	+	0	probably damaging (1,0)	affect protein (0,00)

<sup>a</sup> Swiss Pdb Viewer 3.7 based upon the template 1F6b lacking the first 12 residues of SAR1b C.g. (resolution: 1,70Å, R value: 0,220, homology 98,9%) modified (p.I80V and p.V163I: homology 100%)

<sup>b</sup> Grantham distance (Alamut)

<sup>c</sup> <http://www.ebi.ac.uk/cluster/>

residue conservation: +, identical; c, conserved substitution; s, semi conserved substitution

<sup>d</sup> PolyPhen-2 v2.2.2r395 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

<sup>e</sup> Sorting Intolerant From Tolerant: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>

**Table 3.** Molecular impact of missense mutations

affect the stability of the protein. The substitution p.E62K affecting a well-conserved AA belongs to some residues forming the interface with SEC23 [36], abolishes the H-bond with Glu63 and is predicted to be deleterious by "in silico" analysis (Polyphen, available on <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> [58] and SIFT available on <http://sift.jcvi.org/> [59-63]). A H-bond with the guanine in the guanine recognition site is abolished by the p.D137N mutation (Figure 5). Similarly the p.S179I and p.S179R mutations abolish the H-bonds with Asp 137 and with the guanine base. The substitution of a leucine for a proline (L181P) leads to steric hindrance with the guanine base and p.G185V modifies a highly conserved residue in the Arf/Sar1 family and is predicted to be deleterious by "in silico" analysis (Polyphen, SIFT). The last four mutations modify the  $\alpha$  helix and  $\beta$  strands in the C-terminus and could affect the stability as well as the conformation of the protein.

## 6. Possible founder effects:

Founder effects are likely in the North African and French Canadian families (Table 2); it is likely that the same founder effect is responsible for the mutations of the North African patients (del exon 2, c.109 G>A). However, it is more uncertain for the c.409G>A and c.83\_84delTG mutations, since the pedigrees of these families are not available. Perhaps there are hot spots, or different founder effects at the same place in the gene.

## 7. The biological and clinical impact of SAR1b mutations:

Table 4 provides the lipid profiles of the patients for which mutations in *SAR1B* have been established. As is typical for individuals affected with AD/CMRD, the mean values of total and HDL-cholesterol, apoAI and apoB are decreased, LDL-cholesterol is mildly decreased and triglycerides are in the normal range, however there is a large range of values for each of these parameters. As previously discussed, some patients present with low triglycerides or apoB levels and could be confused with atypical abetalipoproteinemia (families 7, 12), and those with normal HDL cholesterol (family 10) could be confused with heterozygous FHBL. In homozygous patients, missense mutations are more frequent (12 families) than nonsense (8) and are as severe as nonsense mutations, except for the patient in family 10 (p.E62K) who has a normal HDL cholesterol level. The clinical data are not different among patients with different mutations. Several patients have been diagnosed later (adult or teenager) probably because of a mild intestinal syndrome and false diagnoses. Nevertheless, among the late diagnoses (10 patients after 10 years of age), only 3 have a missense mutation.

It has been suggested previously [22] that there is no apparent correlation between the genotype and the phenotype in AD/CMRD patients. For example, patients (from different families) with the same homozygous *SAR1B* mutation (for example the D137N mutation) exhibit different lipid profiles and vitamin E levels as do patients from the same families with the same mutations (the E122X and the S179R mutations). It is possible that modifier genes could be a cause of the different phenotypes. For example, a decrease in the transcriptional factor SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) has been shown to block the incorporation of SCAP (SREBP chaperone) in COPII vesicles and an acute depletion of

cellular cholesterol concentration has been shown to decrease COPII transport [64, 65]. Other genes that modulate cholesterol homeostasis could interfere such as *MTTP* (microsomal triglycerides transfer protein), *APOB*, *ABCG5/G8* (ATP Binding Cassette G5/G8).

mutation	ethnic origin	family	sex	status	TC	TG	HDLC	LDLC	apoB	apoA1	vitE	references
p.G11D	thai	1	M	comp Hz	1,81	1,29			0,54	0,43	1,5	24
p.M1_H43del	algerian	2	F	Ho	2,01	1,44	0,32	1,04	0,5	0,42	3,3	22
p.M1_H43del	algerian	2	M	Ho	2,32	0,78	0,4	1,57	0,55	0,45	2,6	22
p.L28R fsX34	french canad	3	F	comp Hz	2,2	0,73					1,4	2, 11
p.L28R fsX34	morrocan	4	F	Ho	1,45	0,77	0,36	0,73	0,39	0,4	1,2	25
p.L28R fsX34	morrocan	5	F	Ho	2,31	1,36	0,7	1	0,82	0,5	2,4	27
p.L31P	morrocan	6	M	Ho	1,96	0,89	0,77	0,79	0,37	0,91	1,34	this article
p.L31P	morrocan	6	M	Ho	2,09	0,93	0,59	1,31			3,75	this article
p.G37R	algerian	7	F	Ho	1,26	0,67			0,2	0,39	7,6	2, 13
p.G37R	algerian	7	M	Ho	1,79	1,44			0,33	0,38		2, 13
p.G37R	morrocan	8	M	Ho	1,55	0,59			0,36	0,64	2,9	2, 12
p.D48T fsX17	turkish	9	M	Ho	2,61	1,24	0,57	1,48	0,56	0,7	4,4	27
p.D48T fsX17	turkish	9	F	Ho	2,72	1,36	0,83	1,28	0,43	0,9	6,8	27
p.E62K	tunisian	10	F	Ho	2,59		1,3	1,14	0,4			26
p.D75G	thai	1	M	comp Hz								24
p.S117K160del	italian	11	M	Ho	2,07	0,94	0,52	0,78			1	2, 19
p.S117K160del	italian	11	M	Ho	2,43	1,28	0,7	1,22			5	2, 19
p.E122X	turkish	12	M	Ho	1,99	0,43	0,57	1,23	0,36		4,71	22
p.E122X	turkish	12	F	Ho	1,26	0,5	0,53	0,51	0,38	0,43	0,88	22
p.E122X	turkish	12	F	Ho	1,37	0,72	0,39	0,66	0,33	0,51	1,44	22
p.E122X	turkish	12	M	Ho	1,36	0,45	0,45	0,71	0,35	0,59	1,42	22
p.D137N	french canad	13	M	Ho	1,85	0,94					0	2, 11
p.D137N	french canad	13	F	Ho	2,08	0,59					1,6	2, 11
p.D137N	french canad	2	F	comp Hz								2, 11
p.D137N	french canad	14	M	Ho	1,3	0,45	0,49	0,61				22
p.D137N	french canad	14	M	Ho	0,86	0,37	0,38	0,31				22
p.D137N	french canad	15	M	Ho	1,24	0,82	0,41	0,46				22
p.D137N	french canad	16	F	comp Hz	1,39	0,91	0,36	0,62				22
p.D137N	french canad	16	M	comp Hz	1,11	0,54	0,45	0,42				22
p.D137N	french canad	17	F	Ho	2,52	1,35	0,53	1,38				this article
p.D137N	caucasian	18	M	Ho	1,41	0,85	0,35	0,68	0,24	0,57	2,5	this article
p.E167X	caucasian	19	F	Ho	1,86	0,43			0,44	0,57	<1	21, 23
p.E167X	caucasian	19	F	Ho	2,15	0,36			0,55	0,62	<1	23
p.S179I	pakistan	20	F	comp Hz	1,4	0,79	0,44	0,6	0,59			2
p.S179R	french canad	16	F	comp Hz								22
p.S179R	french canad	16	M	comp Hz								22
p.S179R	french canad	21	F	Ho	2,82	1,36	0,59	1,61				22
p.S179R	french canad	21	M	Ho	1,5	0,78	0,56	0,59				22
p.S179R	french canad	22	F	Ho	1,78	1,28	0,56					22
p.L181P	pakistan	20	F	comp Hz								2
p.G185V	portuguese	23	F	Ho	2,36	1,98	0,49	0,98	0,61	0,46	2,5	22
p.G187L fsX13	turkish	24	F	Ho	2	1,6			0,7	0,5	6,6	2, 16
p.G187L fsX13	turkish	24	M	Ho	1,5	1,5			0,5	0,5	3,6	2, 16

(TC total cholesterol, TG triglycerides, LDLc LDL cholesterol, HDLc HDL cholesterol : mM; apoB, apoA1: g/l; vitE vitamin E:  $\mu$ M)

**Table 4.** Biological data in described cases with mutations

Recently a polymorphism of *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), p.L15\_16insL, has been reported in an AD patient [27]. This polymorphism is frequent (25% heterozygous in normal individuals and 34% in cases of HBL) and weakly hypocholesterolemic (-14%) [66]. Further, mutations or polymorphisms in other COPII and PCTV genes could contribute to the different phenotypes by modifying the network of all their corresponding proteins. However, none of these mutations have been described in cases of AD/CMRD. The search for polymorphisms in multiple proteins is very time-consuming but could be facilitated by the new sequencing methods. Rare polymorphisms in the coding regions of the *SAR1B* and *SAR1A* genes have been described but none of these has been observed in the *SAR1A* gene in any of our patients and only one polymorphism (heterozygous) has been found in the *SAR1B* gene (L45L) in our patients. This polymorphism is found with the same frequency in the patients as in normal individuals (0,18 versus 0,19, respectively). The impact of this polymorphism has not been studied.

## 8. Management of AD/CMRD (for details, see the guidelines of Peretti, 2010 [29])

Treatment consists primarily of a low fat diet, with the appropriate amounts of n-6 and n-3 fatty acids, supplemented with fat soluble vitamins. The failure to thrive of the children is the most important clinical feature and catch-up growth is not observed systematically [29]. The neurological and ophthalmological complications may be less severe than in other familial hypocholesterolemias and may depend upon the levels of the fat soluble vitamins and when vitamin supplementation is instituted. Myolysis and cardiac abnormalities have been observed in some AD/CMRD patients [23] and consequently, measurement of the serum CK level should be included in the evaluation and follow-up of the patients. A moderate degree of fat liver is common, but until now no case of cirrhosis has been published.

## 9. Conclusions and future prospects

Significant advances in the diagnosis of AD/CMRD and in the understanding of lipoprotein secretion have occurred over the last decade. However, many questions remain to be answered. *SAR1b* is a ubiquitous protein, essential for the trafficking of proteins between the ER and the Golgi. Why do the mutations in *SAR1B*, that have been reported to date, apparently affect only the intestine and the transport of chylomicrons in the enterocyte? Although an increase of *SAR1A* mRNA was measured in enterocytes containing mutated *SAR1B* [27], the AD/CMRD phenotype was still manifested by a lack of chylomicron secretion. Under what conditions, if any, could *SAR1a* replace *SAR1b*? Is *SAR1a* the veritable GTPase for COPII vesicles? Do some mutations or polymorphisms in other regulator genes explain the lack of correlation between genotype and phenotype in AD/CMRD? There are some CMRD patients without mutations of *SAR1B*, *SAR1A*, *VAMP7*, *MTTP* genes (unpublished data). What gene mutations could explain the AD/CMRD phenotype in these patients? Novel technologies (such as whole exome and whole genome sequencing) may provide a better understanding of this disease and open novel diagnostic approaches.

### Author details

A. Sassolas<sup>1,2</sup>, M. Di Filippo<sup>1,2</sup>, L.P. Aggerbeck<sup>3</sup>, N. Peretti<sup>2,4</sup> and M.E. Samson-Bouma<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, GHE, Hospices Civils de Lyon, France

<sup>2</sup>INSERM U1060 CarMeN, University of Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup>INSERM UMR-S747, University Paris Descartes, Paris France

<sup>4</sup>Department of Pediatric Gastroenterology, GHE, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>5</sup>INSERM U698, University Denis Diderot, Centre Hospitalier Universitaire Xavier Bichat, Paris, France

### Acknowledgement

We thank the physicians Dr C. Vilain, Dr Damaj and others who have referred new patients for molecular investigation. We thank S. Dumont for technical assistance. This study was partially supported by a grant from French Health Ministry, Rare Diseases Plan.

### 10. References

- [1] Anderson C, Townley R, Freemann J, Johansen P (1961) Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *Med J Aust* 48:617-622.
- [2] Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. (2003) Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet.* 34:29-31.
- [3] Silverberg M, Kessler J, Neumann PZ, Wiglesworth FW (1968) An intestinal lipid transport defect. A possible variant of hypo-beta-lipoproteinemia. *Gastroenterology.* 54:1271.
- [4] Polonovski C, Navarro J, Fontaine JL, de Gouyon F, Saudubray JM, Cathelineau L (1970) [Anderson's disease]. *Ann Pediatr (Paris).* 17:342-354.
- [5] Costil J (1976) Maladie d'Anderson. *Journées parisiennes de pédiatrie.* 229-239.
- [6] Scott BB, Miller JP, Losowsky MS (1979) Hypobetalipoproteinaemia--a variant of the Bassen-Kornzweig syndrome. *Gut.* 20:163-168.
- [7] Gauthier S, Sniderman A (1983) Action tremor as a manifestation of chylomicron retention disease. *Ann Neurol.* 14:591.
- [8] Bouma ME, Beucler I, Aggerbeck LP, Infante R, Schmitz J (1986) Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *J Clin Invest.* 78:398-410.
- [9] Polanco I, Mellado MJ, Lama R, Larrauri J, Zapata A, Redondo E, et al. (1986) [Anderson's disease. Apropos of a new case]. *An Esp Pediatr.* 24:185-188.
- [10] Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, et al. (1987) Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res.* 28:1263-1274.

- [11] Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. (1987) Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 92:390-399.
- [12] Lacaille F, Bratos M, Bouma ME, Jos J, Schmitz J, Rey J (1989) [Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases]. *Arch Fr Pediatr*. 46:491-498.
- [13] Pessah M, Benlian P, Beucler I, Loux N, Schmitz J, Junien C, et al. (1991) Anderson's disease: genetic exclusion of the apolipoprotein-B gene in two families. *J Clin Invest*. 87:367-370.
- [14] Strich D, Goldstein R, Phillips A, Shemer R, Goldberg Y, Razin A, et al. (1993) Anderson's disease: no linkage to the apo B locus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 16:257-264.
- [15] Patel S, Pessah M, Beucler I, Navarro J, Infante R (1994) Chylomicron retention disease: exclusion of apolipoprotein B gene defects and detection of mRNA editing in an affected family. *Atherosclerosis*. 108:201-207.
- [16] Nemeth A, Myrdal U, Veress B, Rudling M, Berglund L, Angelin B (1995) Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicron retention. *Eur J Clin Invest*. 25:271-280.
- [17] Benavent MO, Chirivella Casanova M, Pereda Pérez A, Ribes Konickx C, Ferrer Calvete J (1997) Enfermedad de Anderson (esteatorrea por retencion de quilomicrones): Criterios diagnosticos. *An Esp Pediatr*. 47:195-198.
- [18] Dannoura AH, Berriot-Varoqueaux N, Amati P, Abadie V, Verthier N, Schmitz J, et al. (1999) Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:2494-2508.
- [19] Aguglia U, Annesi G, Pasquinelli G, Spadafora P, Gambardella A, Annesi F, et al. (2000) Vitamin E deficiency due to chylomicron retention disease in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol*. 47:260-264.
- [20] Boldrini R, Biselli R, Bosman C (2001) Chylomicron retention disease--the role of ultrastructural examination in differential diagnosis. *Pathol Res Pract*. 197:753-757.
- [21] Mignard S, Calon E, Hespel JP, Le Treut A (2004) [A severely disturbed lipid profile]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 62:330-333.
- [22] Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnott D, et al. (2008) Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the *SAR1B* gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab*. 93:74-84.
- [23] Silvain M, Bligny D, Aparicio T, Laforet P, Grodet A, Peretti N, et al. (2008) Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the *SARA2* gene associated with muscular and cardiac abnormalities. *Clin Genet*. 74:546-552.
- [24] Treepongkaruna S, Chongviriyaphan N, Suthutvoravut U, Charoenpipop D, Choubtum L, Wattanasirichaigoon D (2009) Novel missense mutations of *SAR1B* gene in an infant with chylomicron retention disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 48:370-373.
- [25] Cefalu AB, Calvo PL, Noto D, Baldi M, Valenti V, Lerro P, et al. (2010) Variable phenotypic expression of chylomicron retention disease in a kindred carrying a mutation of the *Sara2* gene. *Metabolism*. 59:463-467.



- [26] Fancello T, Najah M, Magnolo AL, Jelassi A, Di Leo E, Slimene N, et al. Novel mutations in SAR1B and MTP genes in chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia (2011) 74th European Atherosclerosis Society Congress. Gothenburg, 2011.
- [27] Georges A, Bonneau J, Bonnefont-Rousselot D, Champigneulle J, Rabes JP, Abifadel M, et al. (2011) Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (Chylomicron retention disease). *Orphanet J Rare Dis.* 6:1.
- [28] Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, et al. (2009) Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab.* 97:136-142.
- [29] Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. (2010) Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Disl.* Available: <http://www.ajrd.com/content/5/1/24>. Accessed 2012 Mar 23.
- [30] Sakamoto O, Abukawa D, Takeyama J, Arai N, Nagano M, Hattori H, et al. (2006) An atypical case of abetalipoproteinaemia with severe fatty liver in the absence of steatorrhoea or acanthocytosis. *Eur J Pediatr.* 165:68-70.
- [31] Di Filippo M, Crehalet H, Samson-Bouma ME, Bonnet V, Aggerbeck LP, Rabes JP, et al. (2012) Molecular and functional analysis of two new MTP gene mutations in an atypical case of abetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 53:548-555.
- [32] Dannoura AH, Berriot-Varoqueaux N, Amati P, Abadie V, Verthier N, Schmitz J, et al. (1999) Anderson's disease : exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2494-2508.
- [33] Okada T, Miyashita M, Fukuhara J, Sugitani M, Ueno T, Samson-Bouma ME, et al. (2011) Anderson's disease/chylomicron retention disease in a Japanese patient with uniparental disomy 7 and a normal SAR1B gene protein coding sequence. *Orphanet J Rare Disl.* Available: <http://www.ajrd.com/content/6/1/78>. Accessed 2012 Mar 23.
- [34] Nakano A, Muramatsu M (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 109:2677-2691.
- [35] Barlowe C, Schekman R (1993) SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature.* 365:347-349.
- [36] Bi X, Corpina RA, Goldberg J (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature.* 419:271-277.
- [37] Rao Y, Bian C, Yuan C, Li Y, Chen L, Ye X, et al. (2006) An open conformation of switch I revealed by Sar1-GDP crystal structure at low Mg<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:908-915.
- [38] Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M (2005) Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol.* 171:919-924.
- [39] Mossessova E, Bickford LC, Goldberg J (2003) SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell.* 114:483-495.
- [40] Futai E, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2004) GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes. *Embo J.* 23:4146-4155.

- [41] Jensen D, Schekman R (2011) COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci.* 124:1-4.
- [42] Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R (2011) COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol.* 14:20-28.
- [43] Kodera C, Yorimitsu T, Nakano A, Sato K (2011) Sed4p stimulates Sar1p GTP hydrolysis and promotes limited coat disassembly. *Traffic.* 12:591-599.
- [44] Mansbach CM, Siddiqi SA (2010) The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol.* 72:315-333.
- [45] Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd (2003) COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the prechylomicron transport vesicle. *J Cell Sci.* 116:415-427.
- [46] Siddiqi S, Saleem U, Abumrad NA, Davidson NO, Storch J, Siddiqi SA, et al. (2010) A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res.* 51:1918-1928.
- [47] Siddiqi S, Mansbach CM (2012) Phosphorylation of Sar1b releases the Liver Fatty Acid Binding Protein from a Multiprotein Complex in intestinal cytosol enabling it to bind the Pre-Chylomicron Transport Vesicle. *J Biol Chem.* Paper in Press.
- [48] Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgartel C, Schekman R, et al. (2012) Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature.* 482:495-500.
- [49] Kim SD, Pahuja KB, Ravazzola M, Yoon J, Boyadjiev SA, Hammamoto S, et al. (2012) The SEC23-SEC31 interface plays a critical role for the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* Paper in Press.
- [50] Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* 348:125-132.
- [51] Kuge O, Dascher C, Orci L, Rowe T, Amherdt M, Plutner H, et al. (1994) Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol.* 125:51-65.
- [52] Shoulders CC, Stephens DJ, Jones B (2004) The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol.* 15:191-197.
- [53] Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, et al. (2001) Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol.* 155:937-948.
- [54] Dever TE, Glynias MJ, Merrick WC (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1814-1818.
- [55] d'Enfert C, Gensse M, Gaillardin C (1992) Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *EMBO J.* 11:4205-4211.
- [56] Long KR, Yamamoto Y, Baker AL, Watkins SC, Coyne CB, Conway JF, et al. (2010) Sar1 assembly regulates membrane constriction and ER export. *J Cell Biol.* 190:115-128.
- [57] Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18:2714-2723.

- [58] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 7:248-249.
- [59] Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 11:863-874.
- [60] Ng PC, Henikoff S (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res*. 12:436-446.
- [61] Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 31:3812-3814.
- [62] Ng PC, Henikoff S (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 7:61-80.
- [63] Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 4:1073-1081.
- [64] Espenshade PJ, Li WP, Yabe D (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:11694-11699.
- [65] Ridsdale A, Denis M, Gougeon PY, Ngsee JK, Presley JF, Zha X (2006) Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins. *Mol Biol Cell*. 17:1593-1605.
- [66] Yue P, Averna M, Lin X, Schonfeld G (2006) The c.43\_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum Mutat*. 27:460-466.

INTECH

# A new case of familial combined hypolipidemia (FHBL2) with new homozygous *ANGPTL3* mutation and abnormal oral fat load

Mathilde Di Filippo <sup>1,3</sup>, Oriane Marmontel <sup>1,3</sup>, Philippe Moulin <sup>2,3</sup>, Sybil Charrière <sup>2,3</sup>, André Sérusclat <sup>4</sup>, Laurence Perrot <sup>2</sup>, Séverine Nony <sup>1</sup>, Sabrina Dumont <sup>1</sup>, Dominique Bozon <sup>1</sup>, Agnès Sassolas <sup>1</sup>

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

## Phenotype and genotype study of an hypobetalipoproteinemic patient without any mutation in *APOB* and *SAR1B* genes

- Lipid profiles and oral fat load (50g of fat/m<sup>2</sup> body surface) were performed following a 12-hours overnight fast.
- Proteins of VLDL (d<1.006 mg/ml) were separated by 5% polyacrylamide slab gels containing 0.1% SDS and were visualized by silver staining.
- Systematic sequencing of *SAR1B*, *APOB* and *ANGPTL3* genes were performed by direct sequencing of genomic DNA.
- Impact of intronic variation was studied by *in silico* analysis and confirmed by minigene splicing reporter assay with the minigene pTB vector, transfection in HeLa cells, RT-PCR, electrophoresis and direct sequencing of the transcripts.

## DIAGNOSIS

•Female patient, 79 years of age, no diarrhea, no growth retardation

	Patient	Reference interval
Total Cholesterol (TC) mmol/L	1.92	3.60-6.0
Triglycerides (TG) mmol/L	0,60	<1.70
LDL-cholesterol (LDL-C) mmol/L	1.07	2.00-4.10
HDL-cholesterol (HDL-C) mmol/L	0,58	>1.00
apoA1 g/L	0,75	1.08-2.25
apoB g/L	0.41	0.50-1.20

**Normotriglyceridemic hypocholesterolemia**

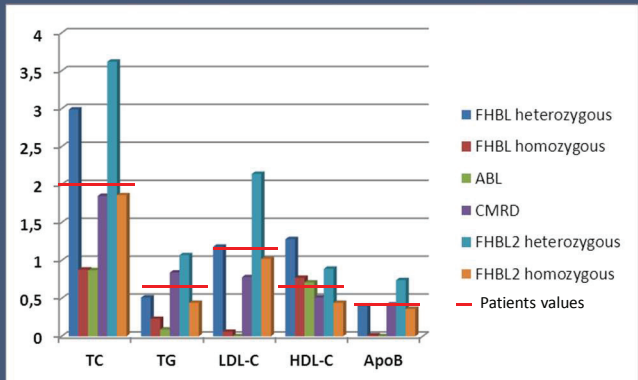
### Secondary hypocholesterolemia ?

<b>Hepatocellular deficiency or liver cytolysis?</b>	<b>NO</b>
-Decrease of ratio esterified cholesterol/total cholesterol : 0.63 (0.73-0.80)	
-BUT normal albumin: 44g/L (35-50)	
prealbumin: 0.30 g/L (0.19-0.33)	
SGOT: 25 U/L (9-40)	
SGPT: 32U/L (9-50)	
<b>Hyperthyroidism?</b>	<b>NO</b>
TSH 1.5mUI/L (0.4-3.1)	
<b>Inflammation ?</b>	<b>NO</b>
CRP 3.2 mg/L (<5.0)	

**Additional assesment?** Persistence of normotriglyceridemic hypocholesterolemia

<b>Primary hypocholesterolemia ?</b>
<b>Dominant or recessive disease?</b> Parents and children not available
<b>Orientation</b> Lipid profile and clinical symptoms

•Lipid profiles

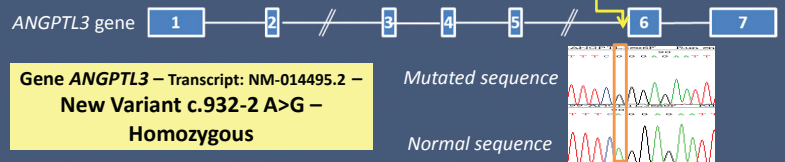


FHBL: Familial Hypobeta-lipoproteinemia ;  
ABL: abetalipoproteinemia ;  
CMRD: Chylomicron Retention Disease

•Clinical symptoms: no diarrhea, no growth retardation

Lipid profile: compatible with CMRD, homozygous FHBL2  
Asymptomatic : Compatible with heterozygous FHBL, FHBL2  
ABL: rare atypical cases

Molecular diagnosis			
FHBL	ABL	CMRD	FHBL2
<i>APOB</i> gene No mutation	<i>MTP</i> gene p.[R46G];[=] tolerated	<i>SAR1B</i> gene No mutation	<i>ANGPTL3</i> gene c.[932-2A>G]; [932-2A>G] <b>MUTATION</b>



**Gene *ANGPTL3* – Transcript: NM-014495.2 –  
New Variant c.932-2 A>G –  
Homozygous**

## SUPPLEMENTAL EXPLORATION

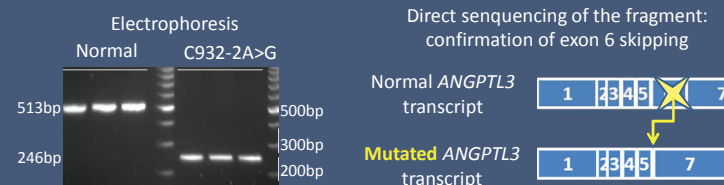
### Phenotypical exploration

- BMI: 31.5**
- Intima media thickness: 0.80 (<1.1 mm)
- Thrombophilia
- Fatty liver:** due to hypocholesterolemia and/or obesity ?
- Acanthocytosis:** due to hypocholesterolemia
- Vitamin E deficiency** (4.3 mg/L, reference interval 8-13) but normal vitamin A level (0.75mg/L, reference interval 0.40-0.80)
- Low levels of ApoA2: 0.37 g/L (reference interval 0.40-0.60g/L)
- Very low levels of ApoC2: 13 mg/L (reference interval 21-47 mg/L)
- ApoC3: 16 mg/L (reference interval 60-120 mg/L)
- Abnormal C2/C3 ratio:0,81 (reference interval 0.30-0.50)
- Low response after **oral fat load:**

	T0	T3h	Expected T3h
Triglycerides mmol/L (g/L)	0.44	0.59	2 fold T0
Triglycerides in chylomicron (%)		13.6	50%
apoB electrophoresis		Low amount of apoB48	Large amount of apoB48

### In vitro splicing assay

- Possible consequences of the mutation:
  - either activation of cryptic site located at 932-23 or 935
  - and/or exon6 skipping
- Minigene splicing reporter assay:



**In HeLa cells: complete absence of normal transcript –  
Exon 6 skipping (deletion of 267bp)  
Homozygous FHBL2 patient**

Among the 21 homozygous or compound heterozygous previously-published FHBL2 patients, our case is the second who exhibits fatty liver and the first showing an alteration of the postprandial release of chylomicron and/or an activation of their lipolysis.





# Phenotypical and molecular characterization of familial heterozygous hypobetalipoproteinemia (FHBL)

Di Filippo, M,<sup>(1,2)</sup>; Chebel, S,<sup>(1)</sup>; Peretti, N,<sup>(2,3)</sup>; Samson-Bouma, ME,<sup>(4)</sup>; Benlian, P,<sup>(5)</sup>; Rabès, JP,<sup>(6)</sup>; Carrié, A,<sup>(7)</sup>; Lapoirie, M,<sup>(8)</sup>; Nouvel, M,<sup>(8)</sup>; Lachaux, A,<sup>(3)</sup>; Moulin, P,<sup>(2,8)</sup>; Sassolas, A,<sup>(1,2)</sup>

<sup>1</sup>Dept of Biochemistry, CBPE, Hospices Civils de Lyon, France; <sup>2</sup>Inserm U1060 CarMeN, Univ Lyon1, LYON, France; <sup>3</sup>Dept of pediatric Gastroenterology, Hospices Civils de Lyon, France; <sup>4</sup>Inserm U698, Université D Diderot, CHU X. Bichat, PARIS, France; <sup>5</sup>U4M, CHRU Lille, France; <sup>6</sup>Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Ambroise Paré (APHP & UVSQ), Boulogne-Billancourt, France; <sup>7</sup>Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique, Service de Biochimie Endocrinienne et Oncologique, APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>8</sup>Dept of Endocrinology, Hôpital L Pradel, Hospices Civils de Lyon, France

Familial hypobetalipoproteinemia (FHBL; MIM 170730) is an heterogeneous autosomal codominant disorder. *APOB* gene mutations are found in half of the cases : more than 100 mutations have been described leading to truncated ApoB however only few missense were published.

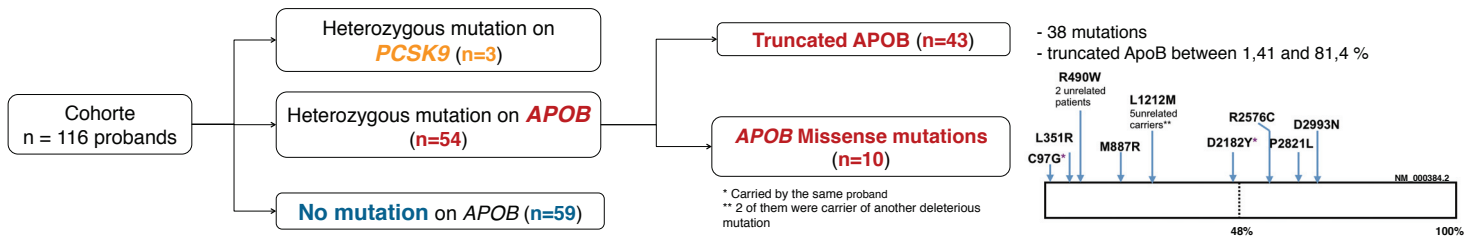
**OBJECTIVES**  
The aim of our work was to define genetic and clinical abnormalities in heterozygous FHBL patients and to study genotype phenotype correlation

## MATERIAL AND METHODS

**Patients** 116 families were referred to our lab for diagnosis of familial hypobetalipoproteinemia. A single heterozygous proband (adult or child) has been selected for this study. We collected **sex, age, BMI**.  
**Glycemia** (plasma) and **lipid profile** (serum) were obtained with commercial available kits (Abbott®). LDL-cholesterol was determined with Friedewald formula.  
**Liver exploration** was performed by determination of ALAT and ASAT levels, ultrasonography and/or Fibroscan®. Hepatic exploration was available for 49 patients

**Molecular analysis**  
▪DNA extraction (EDTA) : kit Nucléon® Amersham  
▪Screening of mutations on the *APOB* and *PCSK9* genes systematically (direct sequencing, Applied®)  
▪Bioinformatic analysis was performed with Alamut v2.0  
**Statistical analysis**  
Differences between groups were assessed by Mann-Whitney test. Calculations were performed using the statistical package SPSS version 17.0

## RESULTS – DISCUSSION



**Phenotypical comparison of patients without mutation (negative) versus patients with APOB mutations (APOBm)**

		negative	APOBm	p
BMI	kg/m <sup>2</sup>	22.2+/-13.3	29.3+/-6.3	0.14
Age at lipid profile	year	14.5+/-12.2	34.4+/-22.	<0.01
Glycemia	mmol/L	4.6+/-1.3	5.6+/-2.4	<0.01
Total Cholesterol	mmol/L	2.78+/-0.59	2.50+/-0.63	0.19
Triglycerides	mmol/L	0.55+/-0.28	0.38+/-0.41	<0.01
HDL-C	mmol/L	1.30+/-0.43	1.43+/-0.46	0.18
LDL-C	mmol/L	1.17+/-0.37	0.89+/-0.46	0.03
ApoB	g/L	0.36+/-0.11	0.27+/-0.13	<0.01
ASAT	U/L	31+/-26	47+/-20	0.10
ALAT	U/L	26+/-31	80+/-42	<0.01
Liver steatosis	Nb of cases	8	11	0.19
Liver fibrosis	Nb of cases	5	8	
Liver cirrhosis	Nb of cases	0	5	

- Carriers of documented APOB mutation presented with**
- Higher age at diagnosis
  - Lower triglycerides, LDL-C and ApoB levels
  - More **metabolic damage**:  
→ Higher glycemia  
→ A high prevalence of **type 2 diabetes**  
→ A trend toward higher BMI
  - More **liver damage**:  
→ Higher ALAT levels  
→ A high frequency of liver impairments

**Phenotypical comparison in patients with APOB mutations**

Lipid profil was available for 43 patients with truncated ApoB and 11 patients with missense mutations.

		ApoB missense	ApoB truncation	p
BMI	kg/m <sup>2</sup>	27.0+/-3.2	29.7+/-6.9	0.32
Age at lipid profile	year	19.2+/-26.2	37.7+/-21.5	0.26
Glycemia	mmol/L	5.2+/-2.7	6.3+/-2.3	0.56
Total Cholesterol	mmol/L	2.83+/-0.43	2.42+/-0.69	0.22
Triglycerides	mmol/L	0.70+/-0.55	0.33+/-0.35	0.01
HDL-C	mmol/L	1.15+/-0.28	1.50+/-0.46	<0.01
LDL-C	mmol/L	1.26+/-0.40	0.83+/-0.46	0.04
ApoB	g/L	0.44+/-0.12	0.25+/-0.11	<0.01
ASAT	U/L	36+/-14	57+/-22	0.32
ALAT	U/L	62+/-28	93+/-45	0.20

- Carriers of APOB truncation presented with**
- Lower lipid profile  
In the group with truncated ApoB it was no statistical difference in lipid profile of patients with truncation <30% (n = 9) and those with truncation >50% (n = 11)
  - Excepted a higher HDL cholesterol

**Phenotypical comparison in patients with APOB truncations : impact of diabetes on lipid profile**

		Non diabetic	T2M	p
BMI	kg/m <sup>2</sup>	26.0+/-3.1	32.5+/-7.0	0,03
Age at lipid profile	year	31.0+/-19.2	61.2+/-10.0	0.02
Triglycerides	mmol/L	0.32+/-0.11	0.50+/-0.32	0,08
ApoB	g/L	0.21+/-0.10	0.36+/-0.09	0.02
ASAT	U/L	33+/-18	59+/-21	0.08

## CONCLUSION

These findings suggest that patients with familial heterozygous hypobetalipoproteinemia should be investigated for NASH and related disorders as more as they are carriers of an *APOB* mutation.

FHBL typical profile may be less severe in case of missense mutations and even partially blunted (absence of decrease in triglycerides ) by a type 2 diabetes, which however may increase the risk of fibrosis.

In addition, the lower HDLc in patients with missense mutations raise two questions:  
-The underlying mechanism  
-The consequences in terms of cardiovascular risk which is considered decreased in heterozygous hypobetalipoproteinemia

## **Bibliographie**



- [1] Bassen FA, Kornzweig AL. Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood* 1950;5:381-387.
- [2] Anderson C, Townley R, Freemann J, Johansen P. Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *Med J Aust* 1961;48:617-622.
- [3] Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992;258:999-1001.
- [4] Linton MF, Farese RV, Jr., Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1993;34:521-541.
- [5] Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, et al. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia. *Nature* 1993;365:65-69.
- [6] Young SG, Pullinger CR, Zysow BR, Hofmann-Radvani H, Linton MF, Farese RV, Jr., et al. Four new mutations in the apolipoprotein B gene causing hypobetalipoproteinemia, including two different frameshift mutations that yield truncated apolipoprotein B proteins of identical length. *J Lipid Res* 1993;34:501-507.
- [7] Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003;34:29-31.
- [8] Young SG, Bertics SJ, Curtiss LK, Dubois BW, Witztum JL. Genetic analysis of a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. Evidence for two separate gene defects: one associated with an abnormal apolipoprotein B species, apolipoprotein B-37; and a second associated with low plasma concentrations of apolipoprotein B-100. *J Clin Invest* 1987;79:1842-1851.
- [9] Young SG, Bertics SJ, Curtiss LK, Witztum JL. Characterization of an abnormal species of apolipoprotein B, apolipoprotein B-37, associated with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1987;79:1831-1841.
- [10] Young SG, Northey ST, McCarthy BJ. Low plasma cholesterol levels caused by a short deletion in the apolipoprotein B gene. *Science* 1988;241:591-593.
- [11] Tarugi P, Averna M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem* 2011;54:81-107.
- [12] Akdim F, Visser ME, Tribble DL, Baker BF, Stroes ES, Yu R, et al. Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2010;105:1413-1419.
- [13] Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010;375:998-1006.
- [14] Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, Blom DJ, Marais AD, Hegele RA, et al. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2013;381:40-46.
- [15] Cuchel M, Rader DJ. Microsomal transfer protein inhibition in humans. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:246-250.
- [16] Davis KA, Miyares MA. Lomitapide: A novel agent for the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Health Syst Pharm* 2014;71:1001-1008.
- [17] Fisher E, Lake E, McLeod RS. Apolipoprotein B100 quality control and the regulation of hepatic very low density lipoprotein secretion. *J Biomed Res* 2014;28:178-193.
- [18] Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med* 2012;272:185-196.
- [19] van der Graaf A, Fouchier SW, Vissers MN, Defesche JC, Wiegman A, Sankatsing RR, et al. Familial defective apolipoprotein B and familial hypobetalipoproteinemia in one family: two neutralizing mutations. *Ann Intern Med* 2008;148:712-714.
- [20] Huijgen R, Sjouke B, Vis K, de Randamie JS, Defesche JC, Kastelein JJ, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-CI Levels. *Hum Mutat* 2011;33:448-455.
- [21] Lusis AJ, West R, Mehrabian M, Reuben MA, LeBoeuf RC, Kaptein JS, et al. Cloning and expression of apolipoprotein B, the major protein of low and very low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4597-4601.
- [22] Blanc V, Davidson NO. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010;2:594-602.
- [23] Kane JP, Hardman DA, Paulus HE. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2465-2469.
- [24] Yang CY, Lee FS, Chan L, Sparrow DA, Sparrow JT, Gotto AM, Jr. Determination of the molecular mass of apolipoprotein B-100. A chemical approach. *Biochem J* 1986;239:777-780.
- [25] Chen SH, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee BR, Weng SA, et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 1987;238:363-366.
- [26] Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 2002;277:17377-17380.
- [27] Segrest JP, Jones MK, Dashti N. N-terminal domain of apolipoprotein B has structural homology to lipovitellin and microsomal triglyceride transfer protein: a "lipid pocket" model for self-assembly of apob-containing lipoprotein particles. *J Lipid Res* 1999;40:1401-1416.
- [28] Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001;42:1346-1367.
- [29] Mann CJ, Anderson TA, Read J, Chester SA, Harrison GB, Kochl S, et al. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J Mol Biol* 1999;285:391-408.
- [30] Krisko A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B100 tertiary structure. *Proteins* 2007;66:342-358.
- [31] Hussain MM, Bakillah A, Nayak N, Shelness GS. Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 1998;273:25612-25615.
- [32] Jiang ZG, Liu Y, Hussain MM, Atkinson D, McKnight CJ. Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system. *J Mol Biol* 2008;383:1181-1194.

- [33] Nicodeme E, Benoist F, McLeod R, Yao Z, Scott J, Shoulders CC, et al. Identification of domains in apolipoprotein B100 that confer a high requirement for the microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 1999;274:1986-1993.
- [34] Kreuzer J, White AL, Knott TJ, Jien ML, Mehrabian M, Scott J, et al. Amino terminus of apolipoprotein B suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J Lipid Res* 1997;38:324-342.
- [35] Sivaram P, Choi SY, Curtiss LK, Goldberg IJ. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:9409-9412.
- [36] Jiang ZG, Gantz D, Bullitt E, McKnight CJ. Defining lipid-interacting domains in the N-terminal region of apolipoprotein B. *Biochemistry* 2006;45:11799-11808.
- [37] Shelness GS, Hou L, Ledford AS, Parks JS, Weinberg RB. Identification of the lipoprotein initiating domain of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 2003;278:44702-44707.
- [38] Wang L, Martin DD, Genter E, Wang J, McLeod RS, Small DM. Surface study of apoB1694-1880, a sequence that can anchor apoB to lipoproteins and make it nonexchangeable. *J Lipid Res* 2009;50:1340-1352.
- [39] Wang L, Walsh MT, Small DM. Apolipoprotein B is conformationally flexible but anchored at a triolein/water interface: a possible model for lipoprotein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6871-6876.
- [40] Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2003;44:22-32.
- [41] Yang CY, Chen SH, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, et al. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* 1986;323:738-742.
- [42] Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 1998;101:1084-1093.
- [43] Burch WL, Herscovitz H. Disulfide bonds are required for folding and secretion of apolipoprotein B regardless of its lipidation state. *J Biol Chem* 2000;275:16267-16274.
- [44] Tran K, Boren J, Macri J, Wang Y, McLeod R, Avramoglu RK, et al. Functional analysis of disulfide linkages clustered within the amino terminus of human apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1998;273:7244-7251.
- [45] Yang CY, Kim TW, Weng SA, Lee BR, Yang ML, Gotto AM, Jr. Isolation and characterization of sulfhydryl and disulfide peptides of human apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5523-5527.
- [46] Vukmirica J, Nishimaki-Mogami T, Tran K, Shan J, McLeod RS, Yuan J, et al. The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL. *J Lipid Res* 2002;43:1496-1507.
- [47] Dunphy JT, Linder ME. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1436:245-261.
- [48] Zhao Y, McCabe JB, Vance J, Berthiaume LG. Palmitoylation of apolipoprotein B is required for proper intracellular sorting and transport of cholesterol esters and triglycerides. *Mol Biol Cell* 2000;11:721-734.
- [49] Pontrelli L, Sidiropoulos KG, Adeli K. Translational control of apolipoprotein B mRNA: regulation via cis elements in the 5' and 3' untranslated regions. *Biochemistry* 2004;43:6734-6744.
- [50] Sidiropoulos KG, Meshkani R, Avramoglu-Kohen R, Adeli K. Insulin inhibition of apolipoprotein B mRNA translation is mediated via the PI-3 kinase/mTOR signaling cascade but does not involve internal ribosomal entry site (IRES) initiation. *Arch Biochem Biophys* 2007;465:380-388.
- [51] Brodsky JL, Fisher EA. The many intersecting pathways underlying apolipoprotein B secretion and degradation. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:254-259.
- [52] Boren J, Graham L, Wettsten M, Scott J, White A, Olofsson SO. The assembly and secretion of ApoB 100-containing lipoproteins in Hep G2 cells. ApoB 100 is cotranslationally integrated into lipoproteins. *J Biol Chem* 1992;267:9858-9867.
- [53] Boren J, Rustaeus S, Olofsson SO. Studies on the assembly of apolipoprotein B-100- and B-48-containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 1994;269:25879-25888.
- [54] Rustaeus S, Lindberg K, Stillemark P, Claesson C, Asp L, Larsson T, et al. Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. *J Nutr* 1999;129:463S-466S.
- [55] Tran K, Thorne-Tjomslund G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L, et al. Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 2002;277:31187-31200.
- [56] Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B secretory regulation by degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1334-1338.
- [57] Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem* 1987;262:16394-16402.
- [58] Williams KJ, Brocia RW, Fisher EA. The unstirred water layer as a site of control of apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 1990;265:16741-16744.
- [59] Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest* 2000;105:521-532.
- [60] Rutledge AC, Su Q, Adeli K. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochem Cell Biol* 2010;88:251-267.
- [61] Dixon JL, Furukawa S, Ginsberg HN. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1991;266:5080-5086.
- [62] Benoist F, Grand-Perret T. Co-translational degradation of apolipoprotein B100 by the proteasome is prevented by microsomal triglyceride transfer protein. Synchronized translation studies on HepG2 cells treated with an inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 1997;272:20435-20442.
- [63] Zhou M, Fisher EA, Ginsberg HN. Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem* 1998;273:24649-24653.
- [64] Fisher EA, Lapiere LR, Junkins RD, McLeod RS. The AAA-ATPase p97 facilitates degradation of apolipoprotein B by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Lipid Res* 2008;49:2149-2160.

- [65] Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL, Fisher EA. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem* 2001;276:24891-24900.
- [66] Liang JS, Kim T, Fang S, Yamaguchi J, Weissman AM, Fisher EA, et al. Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 2003;278:23984-23988.
- [67] Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 2005;7:766-772.
- [68] Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, et al. Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 2006;126:727-739.
- [69] Xie W, Ng DT. ERAD substrate recognition in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:533-539.
- [70] Pan M, Maitin V, Parathath S, Andreo U, Lin SX, St Germain C, et al. Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5862-5867.
- [71] Butkinaree C, Guo L, Ramkhalawon B, Wanschel A, Brodsky JL, Moore KJ, et al. A regulator of secretory vesicle size, Kelch-like protein 12, facilitates the secretion of apolipoprotein B100 and very-low-density lipoproteins--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:251-254.
- [72] Zhong S, Magnolo AL, Sundaram M, Zhou H, Yao EF, Di Leo E, et al. Nonsynonymous mutations within APOB in human familial hypobetalipoproteinemia: evidence for feedback inhibition of lipogenesis and postendoplasmic reticulum degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 2010;285:6453-6464.
- [73] Farese RV, Jr., Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1774-1778.
- [74] Huang LS, Voyiaziakis E, Markenson DF, Sokol KA, Hayek T, Breslow JL. apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J Clin Invest* 1995;96:2152-2161.
- [75] Young SG, Cham CM, Pitas RE, Burri BJ, Connolly A, Flynn L, et al. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine. *J Clin Invest* 1995;96:2932-2946.
- [76] Homanics GE, Smith TJ, Zhang SH, Lee D, Young SG, Maeda N. Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2389-2393.
- [77] Liao W, Ning G. Knockdown of apolipoprotein B, an atherogenic apolipoprotein, in HepG2 cells by lentivirus-mediated siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:478-483.
- [78] Croke RM, Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Koo S, Perera RJ. An apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. *J Lipid Res* 2005;46:872-884.
- [79] 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;84:6919-6923.
- [80] Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001;276:9214-9218.
- [81] Motazacker MM, Pirruccello J, Huijgen R, Do R, Gabriel S, Peter J, et al. Advances in genetics show the need for extending screening strategies for autosomal dominant hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2012;33:1360-1366.
- [82] Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1025-1029.
- [83] Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, et al. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995;95:1225-1234.
- [84] Alves AC, Etxebarria A, Soutar AK, Martin C, Bourbon M. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet* 2014;23:1817-1828.
- [85] Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem* 1990;265:9800-9807.
- [86] Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:136-150.
- [87] Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000;20:663-697.
- [88] Gordon DA, Jamil H. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:72-83.
- [89] Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)* 2012;9:14.
- [90] Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, et al. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 2002;277:16470-16477.
- [91] Swift LL, Zhu MY, Kakkad B, Jovanovska A, Neely MD, Valyi-Nagy K, et al. Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res* 2003;44:1841-1849.
- [92] Gordon DA, Jamil H, Sharp D, Mullaney D, Yao Z, Gregg RE, et al. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7628-7632.
- [93] Leiper JM, Bayliss JD, Pease RJ, Brett DJ, Scott J, Shoulders CC. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem* 1994;269:21951-21954.

- [94] Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, et al. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet* 1993;2:2109-2116.
- [95] Swift LL, Kakkad B, Boone C, Jovanovska A, Jerome WG, Mohler PJ, et al. Microsomal triglyceride transfer protein expression in adipocytes: a new component in fat metabolism. *FEBS Lett* 2005;579:3183-3189.
- [96] Mohler PJ, Zhu MY, Blade AM, Ham AJ, Shelness GS, Swift LL. Identification of a novel isoform of microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 2007;282:26981-26988.
- [97] Bradbury P, Mann CJ, Kochl S, Anderson TA, Chester SA, Hancock JM, et al. A common binding site on the microsomal triglyceride transfer protein for apolipoprotein B and protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1999;274:3159-3164.
- [98] Rava P, Hussain MM. Acquisition of triacylglycerol transfer activity by microsomal triglyceride transfer protein during evolution. *Biochemistry* 2007;46:12263-12274.
- [99] Sundaram M, Yao Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab (Lond)* 2010;7:35.
- [100] Read J, Anderson TA, Ritchie PJ, Vanloo B, Amey J, Levitt D, et al. A mechanism of membrane neutral lipid acquisition by the microsomal triglyceride transfer protein. *J Biol Chem* 2000;275:30372-30377.
- [101] Khatun I, Walsh MT, Hussain MM. Loss of both phospholipid and triglyceride transfer activities of microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 2013;54:1541-1549.
- [102] Wu X, Zhou M, Huang LS, Wetterau J, Ginsberg HN. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:10277-10281.
- [103] Gordon DA, Jamil H, Gregg RE, Olofsson SO, Boren J. Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem* 1996;271:33047-33053.
- [104] Rusinol AE, Jamil H, Vance JE. In vitro reconstitution of assembly of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1997;272:8019-8025.
- [105] Rava P, Ojakian GK, Shelness GS, Hussain MM. Phospholipid transfer activity of microsomal triacylglycerol transfer protein is sufficient for the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins. *J Biol Chem* 2006;281:11019-11027.
- [106] Khatun I, Zeissig S, Iqbal J, Wang M, Curiel D, Shelness GS, et al. Phospholipid transfer activity of microsomal triglyceride transfer protein produces apolipoprotein B and reduces hepatosteatosis while maintaining low plasma lipids in mice. *Hepatology* 2012;55:1356-1368.
- [107] Dashti N, Manchekar M, Liu Y, Sun Z, Segrest JP. Microsomal triglyceride transfer protein activity is not required for the initiation of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 2007;282:28597-28608.
- [108] Jamil H, Chu CH, Dickson JK, Jr., Chen Y, Yan M, Biller SA, et al. Evidence that microsomal triglyceride transfer protein is limiting in the production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in hepatic cells. *J Lipid Res* 1998;39:1448-1454.
- [109] Wang Y, Tran K, Yao Z. The activity of microsomal triglyceride transfer protein is essential for accumulation of triglyceride within microsomes in McA-RH7777 cells. A unified model for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1999;274:27793-27800.
- [110] Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, et al. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 1999;103:1287-1298.
- [111] Sturley SL, Hussain MM. Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *J Lipid Res* 2012;53:1800-1810.
- [112] Lehner R, Lian J, Quiroga AD. Luminal lipid metabolism: implications for lipoprotein assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1087-1093.
- [113] Hagan DL, Kienzle B, Jamil H, Hariharan N. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. Cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem* 1994;269:28737-28744.
- [114] Spann NJ, Kang S, Li AC, Chen AZ, Newberry EP, Davidson NO, et al. Coordinate transcriptional repression of liver fatty acid-binding protein and microsomal triglyceride transfer protein blocks hepatic very low density lipoprotein secretion without hepatosteatosis. *J Biol Chem* 2006;281:33066-33077.
- [115] Iqbal J, Dai K, Seimon T, Jungreis R, Oyadomari M, Kuriakose G, et al. IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab* 2008;7:445-455.
- [116] Ameen C, Edvardsson U, Ljungberg A, Asp L, Akerblad P, Tuneld A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005;280:1224-1229.
- [117] Huang J, Iqbal J, Saha PK, Liu J, Chan L, Hussain MM, et al. Molecular characterization of the role of orphan receptor small heterodimer partner in development of fatty liver. *Hepatology* 2007;46:147-157.
- [118] Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 1999;274:24714-24720.
- [119] Kamagate A, Qu S, Perdomo G, Su D, Kim DH, Slusher S, et al. FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2347-2364.
- [120] Wolfrum C, Stoffel M. Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab* 2006;3:99-110.
- [121] Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, Nitz I, Helwig U, Folsch UR, et al. Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene. *Hum Mutat* 2008;29:123-129.
- [122] Liao W, Kobayashi K, Chan L. Adenovirus-mediated overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP): mechanistic studies on the role of MTP in apolipoprotein B-100 biogenesis. *Biochemistry* 1999;38:7532-7544.



- [123] Tietge UJ, Bakillah A, Maugeais C, Tsukamoto K, Hussain M, Rader DJ. Hepatic overexpression of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) results in increased in vivo secretion of VLDL triglycerides and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1999;40:2134-2139.
- [124] Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, et al. Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8686-8691.
- [125] Chang BH, Liao W, Li L, Nakamuta M, Mack D, Chan L. Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J Biol Chem* 1999;274:6051-6055.
- [126] Bjorkegren J, Beigneux A, Bergo MO, Maher JJ, Young SG. Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. *J Biol Chem* 2002;277:5476-5483.
- [127] Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, et al. Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mtp deficiency. *J Biol Chem* 2006;281:4075-4086.
- [128] Iqbal J, Parks JS, Hussain MM. Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *J Biol Chem* 2013;288:30432-30444.
- [129] Xie Y, Luo J, Kennedy S, Davidson NO. Conditional intestinal lipotoxicity in Apobec-1/- Mtp-IKO mice: a survival advantage for mammalian intestinal apolipoprotein B mRNA editing. *J Biol Chem* 2007;282:33043-33051.
- [130] Xie Y, Kennedy S, Sidhu R, Luo J, Ory DS, Davidson NO. Liver X receptor agonist modulation of cholesterol efflux in mice with intestine-specific deletion of microsomal triglyceride transfer protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1624-1631.
- [131] Iqbal J, Li X, Chang BH, Chan L, Schwartz GJ, Chua SC, Jr., et al. An intrinsic gut leptin-melanocortin pathway modulates intestinal microsomal triglyceride transfer protein and lipid absorption. *J Lipid Res* 2010;51:1929-1942.
- [132] Leung GK, Veniant MM, Kim SK, Zlot CH, Raabe M, Bjorkegren J, et al. A deficiency of microsomal triglyceride transfer protein reduces apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 2000;275:7515-7520.
- [133] Lieu HD, Withycombe SK, Walker Q, Rong JX, Walzem RL, Wong JS, et al. Eliminating atherosclerosis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion. *Circulation* 2003;107:1315-1321.
- [134] Haghpassand M, Wilder D, Moberly JB. Inhibition of apolipoprotein B and triglyceride secretion in human hepatoma cells (HepG2). *J Lipid Res* 1996;37:1468-1480.
- [135] Jamil H, Gordon DA, Eustice DC, Brooks CM, Dickson JK, Jr., Chen Y, et al. An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11991-11995.
- [136] Chandler CE, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, et al. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J Lipid Res* 2003;44:1887-1901.
- [137] Liao W, Hui TY, Young SG, Davis RA. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res* 2003;44:978-985.
- [138] Wang L, Fast DG, Attie AD. The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 1997;272:27644-27651.
- [139] Maattanen P, Gehring K, Bergeron JJ, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:500-511.
- [140] Grubb S, Guo L, Fisher EA, Brodsky JL. Protein disulfide isomerases contribute differentially to the endoplasmic reticulum-associated degradation of apolipoprotein B and other substrates. *Mol Biol Cell* 2012;23:520-532.
- [141] Wang S, Chen Z, Lam V, Han J, Hassler J, Finck BN, et al. IRE1alpha-XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metab* 2012;16:473-486.
- [142] Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:87-123.
- [143] Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol* 2012;14:20-28.
- [144] Nemeth A, Myrdal U, Veress B, Rudling M, Berglund L, Angelin B. Studies on lipoprotein metabolism in a family with jejunal chylomicron retention. *Eur J Clin Invest* 1995;25:271-280.
- [145] Schekman R, Orci L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 1996;271:1526-1533.
- [146] Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, et al. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 1998;93:263-275.
- [147] Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 2001;3:531-537.
- [148] Venditti R, Wilson C, De Matteis MA. Exiting the ER: what we know and what we don't. *Trends Cell Biol* 2014;24:9-18.
- [149] Springer S, Spang A, Schekman R. A primer on vesicle budding. *Cell* 1999;97:145-148.
- [150] Aridor M, Fish KN, Bannykh S, Weissman J, Roberts TH, Lippincott-Schwartz J, et al. The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J Cell Biol* 2001;152:213-229.
- [151] D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:2464-2472.
- [152] Dong C, Zhou F, Fugetta EK, Filipeanu CM, Wu G. Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell Signal* 2008;20:1035-1043.
- [153] Quintero CA, Giraudo CG, Villarreal M, Montich G, Maccioni HJ. Identification of a site in Sar1 involved in the interaction with the cytoplasmic tail of glycolipid glycosyltransferases. *J Biol Chem* 2010;285:30340-30346.
- [154] Zhuang X, Chowdhury S, Northup JK, Ray K. Sar1-dependent trafficking of the human calcium receptor to the cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:874-880.
- [155] Gusarova V, Brodsky JL, Fisher EA. Apolipoprotein B100 exit from the endoplasmic reticulum (ER) is COPII-dependent, and its lipidation to very low density lipoprotein occurs post-ER. *J Biol Chem* 2003;278:48051-48058.
- [156] Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM, 2nd. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2003;116:415-427.

- [157] Kumar NS, Mansbach CM, 2nd. Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am J Physiol* 1999;276:G378-386.
- [158] Siddiqi SA. VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J* 2008;413:333-342.
- [159] Kuge O, Dascher C, Orci L, Rowe T, Amherdt M, Plutner H, et al. Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol* 1994;125:51-65.
- [160] Fromme JC, Orci L, Schekman R. Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* 2008;18:330-336.
- [161] Loftus AF, Hsieh VL, Parthasarathy R. Modulation of membrane rigidity by the human vesicle trafficking proteins Sar1A and Sar1B. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;426:585-589.
- [162] Fryer LG, Jones B, Duncan EJ, Hutchison CE, Ozkan T, Williams PA, et al. The endoplasmic reticulum coat protein II transport machinery coordinates cellular lipid secretion and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2014;289:4244-4261.
- [163] He H, Dai F, Yu L, She X, Zhao Y, Jiang J, et al. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene Expr* 2002;10:231-242.
- [164] Shen KA, Hammond CM, Moore HP. Molecular analysis of SAR1-related cDNAs from a mouse pituitary cell line. *FEBS Lett* 1993;335:380-385.
- [165] Jardim DL, da Cunha AF, Duarte Ada S, dos Santos CO, Saad ST, Costa FF. Expression of Sara2 human gene in erythroid progenitors. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:328-333.
- [166] Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, et al. Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol* 2001;155:937-948.
- [167] d'Enfert C, Wuestehube LJ, Lila T, Schekman R. Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J Cell Biol* 1991;114:663-670.
- [168] Nakano A, Muramatsu M. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 1989;109:2677-2691.
- [169] d'Enfert C, Barlowe C, Nishikawa S, Nakano A, Schekman R. Structural and functional dissection of a membrane glycoprotein required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 1991;11:5727-5734.
- [170] Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 2002;419:271-277.
- [171] Aridor M, Balch WE. Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2000;275:35673-35676.
- [172] Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, Alber S, et al. Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *EMBO J* 2003;22:4059-4069.
- [173] Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 2005;122:605-617.
- [174] Yoshihisa T, Barlowe C, Schekman R. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 1993;259:1466-1468.
- [175] Rao Y, Bian C, Yuan C, Li Y, Chen L, Ye X, et al. An open conformation of switch I revealed by Sar1-GDP crystal structure at low Mg<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:908-915.
- [176] Fromme JC, Ravazzola M, Hamamoto S, Al-Balwi M, Eyaad W, Boyadjiev SA, et al. The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Dev Cell* 2007;13:623-634.
- [177] Bi X, Mancias JD, Goldberg J. Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell* 2007;13:635-645.
- [178] Ong YS, Tang BL, Loo LS, Hong W. p125A exists as part of the mammalian Sec13/Sec31 COPII subcomplex to facilitate ER-Golgi transport. *J Cell Biol* 2010;190:331-345.
- [179] Oka T, Nakano A. Inhibition of GTP hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast. *J Cell Biol* 1994;124:425-434.
- [180] Futai E, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes. *EMBO J* 2004;23:4146-4155.
- [181] Settles EI, Loftus AF, McKeown AN, Parthasarathy R. The vesicle trafficking protein Sar1 lowers lipid membrane rigidity. *Biophys J* 2010;99:1539-1545.
- [182] Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol* 2005;171:919-924.
- [183] Long KR, Yamamoto Y, Baker AL, Watkins SC, Coyne CB, Conway JF, et al. Sar1 assembly regulates membrane constriction and ER export. *J Cell Biol* 2010;190:115-128.
- [184] Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, et al. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994;77:895-907.
- [185] Sato K, Nakano A. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* 2007;581:2076-2082.
- [186] Kim SD, Pahuja KB, Ravazzola M, Yoon J, Boyadjiev SA, Hammamoto S, et al. The SEC23-SEC31 interface plays a critical role for the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2012;Paper in Press.
- [187] Levy E, Harmel E, Laville M, Sanchez R, Emonnot L, Sinnett D, et al. Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2692-2699.
- [188] Levy E, Spahis S, Garofalo C, Marciel V, Montoudis A, Sinnett D, et al. Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *J Nutr Biochem* 2014;25:540-548.
- [189] Marciel V, Seidman E, Sinnett D, Sanchez R, Spahis S, Sane A, et al. Tissue distribution and regulation of the small Sar1b GTPase in mice. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:1815-1826.
- [190] Cutrona MB, Beznoussenko GV, Fusella A, Martella O, Moral P, Mironov AA. Silencing of mammalian Sar1 isoforms reveals COPII-independent protein sorting and transport. *Traffic* 2013;14:691-708.



- [191] Aridor M, Shome K, Romero G. Assay and measurement of phospholipase D activation by Sar1. *Methods Enzymol* 2005;404:108-115.
- [192] Asp L, Claesson C, Boren J, Olofsson SO. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000;275:26285-26292.
- [193] Asp L, Magnusson B, Rutberg M, Li L, Boren J, Olofsson SO. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:566-570.
- [194] Alexander CA, Hamilton RL, Havel RJ. Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. *J Cell Biol* 1976;69:241-263.
- [195] Higgins JA. Evidence that during very low density lipoprotein assembly in rat hepatocytes most of the triacylglycerol and phospholipid are packaged with apolipoprotein B in the Golgi complex. *FEBS Lett* 1988;232:405-408.
- [196] Bamberger MJ, Lane MD. Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2390-2394.
- [197] Rusinol A, Verkade H, Vance JE. Assembly of rat hepatic very low density lipoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1993;268:3555-3562.
- [198] Yamaguchi J, Gamble MV, Conlon D, Liang JS, Ginsberg HN. The conversion of apoB100 low density lipoprotein/high density lipoprotein particles to apoB100 very low density lipoproteins in response to oleic acid occurs in the endoplasmic reticulum and not in the Golgi in McA RH7777 cells. *J Biol Chem* 2003;278:42643-42651.
- [199] Gusarova V, Seo J, Sullivan ML, Watkins SC, Brodsky JL, Fisher EA. Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2007;282:19453-19462.
- [200] Swift LL, Farkas MH, Major AS, Valyi-Nagy K, Linton MF, Fazio S. A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J Biol Chem* 2001;276:22965-22970.
- [201] Li X, Ye J, Zhou L, Gu W, Fisher EA, Li P. Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation. *J Lipid Res* 2012;53:1877-1889.
- [202] Wong DM, Webb JP, Malinowski PM, Macri J, Adeli K. Proteomic profiling of the prechylomicron transport vesicle involved in the assembly and secretion of apoB-48-containing chylomicrons in the intestinal enterocytes. *Proteomics* 2009;9:3698-3711.
- [203] Hesse D, Radloff K, Jaschke A, Lagerpusch M, Chung B, Tailleux A, et al. Hepatic trans-Golgi action coordinated by the GTPase ARFRP1 is crucial for lipoprotein lipidation and assembly. *J Lipid Res* 2014;55:41-52.
- [204] Yang LY, Kuksis A, Myher JJ, Steiner G. Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: structural studies. *J Lipid Res* 1995;36:125-136.
- [205] Demignot S, Beilstein F, Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie* 2014;96:48-55.
- [206] Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:200-206.
- [207] Magnusson B, Asp L, Bostrom P, Ruiz M, Stillemark-Billton P, Linden D, et al. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1566-1571.
- [208] Chen Z, Norris JY, Finck BN. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) stimulates VLDL assembly through activation of cell death-inducing DFFA-like effector B (CideB). *J Biol Chem* 2010;285:25996-26004.
- [209] Ye J, Li JZ, Liu Y, Li X, Yang T, Ma X, et al. Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab* 2009;9:177-190.
- [210] Li JZ, Ye J, Xue B, Qi J, Zhang J, Zhou Z, et al. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes* 2007;56:2523-2532.
- [211] Tiwari S, Siddiqi S, Siddiqi SA. CideB protein is required for the biogenesis of very low density lipoprotein (VLDL) transport vesicle. *J Biol Chem* 2013;288:5157-5165.
- [212] Zhang LJ, Wang C, Yuan Y, Wang H, Wu J, Liu F, et al. Cideb facilitates the lipidation of chylomicrons in the small intestine. *J Lipid Res* 2014;55:1279-1287.
- [213] Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schurmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep* 2013;33:1-9.
- [214] Mueller AG, Moser M, Kluge R, Leder S, Blum M, Buttner R, et al. Embryonic lethality caused by apoptosis during gastrulation in mice lacking the gene of the ADP-ribosylation factor-related protein 1. *Mol Cell Biol* 2002;22:1488-1494.
- [215] Jaschke A, Chung B, Hesse D, Kluge R, Zahn C, Moser M, et al. The GTPase ARFRP1 controls the lipidation of chylomicrons in the Golgi of the intestinal epithelium. *Hum Mol Genet* 2012;21:3128-3142.
- [216] Hommel A, Hesse D, Volker W, Jaschke A, Moser M, Engel T, et al. The ARF-like GTPase ARFRP1 is essential for lipid droplet growth and is involved in the regulation of lipolysis. *Mol Cell Biol* 2010;30:1231-1242.
- [217] Hesse D, Jaschke A, Kanzleiter T, Witte N, Augustin R, Hommel A, et al. GTPase ARFRP1 is essential for normal hepatic glycogen storage and insulin-like growth factor 1 secretion. *Mol Cell Biol* 2012;32:4363-4374.
- [218] Mansbach CM, Dowell R. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res* 2000;41:605-612.
- [219] Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, et al. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003;36:529-535.
- [220] Guilmeau S, Niot I, Laigneau JP, Devaud H, Petit V, Brousse N, et al. Decreased expression of Intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes. *Histochem Cell Biol* 2007;128:115-123.
- [221] Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, et al. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007;282:17974-17984.
- [222] Siddiqi S, Saleem U, Abumrad NA, Davidson NO, Storch J, Siddiqi SA, et al. A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res* 2010;51:1918-1928.

- [223] Cistola DP, Sacchettini JC, Banaszak LJ, Walsh MT, Gordon JI. Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. A comparative <sup>13</sup>C NMR study. *J Biol Chem* 1989;264:2700-2710.
- [224] Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996;35:243-282.
- [225] Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* 1996;271:13317-13323.
- [226] Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, Binas B, Choi V, Mandap B, et al. Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G803-814.
- [227] Gajda AM, Zhou YX, Agellon LB, Fried SK, Kodukula S, Fortson W, et al. Direct comparison of mice null for liver or intestinal fatty acid-binding proteins reveals highly divergent phenotypic responses to high fat feeding. *J Biol Chem* 2013;288:30330-30344.
- [228] Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, et al. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem* 2003;278:51664-51672.
- [229] Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 2006;44:1191-1205.
- [230] Martin GG, Atshaves BP, McIntosh AL, Mackie JT, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid binding protein gene ablation potentiates hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed female mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G36-48.
- [231] Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Crooke RM, Graham MJ, et al. Decreased body weight and hepatic steatosis with altered fatty acid ethanolamide metabolism in aged L-Fabp <sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res* 2012;53:744-754.
- [232] Green PH, Glickman RM, Saudek CD, Blum CB, Tall AR. Human intestinal lipoproteins. Studies in chyluric subjects. *J Clin Invest* 1979;64:233-242.
- [233] Stan S, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E. Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions. *Biochim Biophys Acta* 2003;1631:177-187.
- [234] Weinberg RB, Gallagher JW, Fabritius MA, Shelness GS. ApoA-IV modulates the secretory trafficking of apoB and the size of triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 2012;53:736-743.
- [235] Gallagher JW, Weinberg RB, Shelness GS. apoA-IV tagged with the ER retention signal KDEL perturbs the intracellular trafficking and secretion of apoB. *J Lipid Res* 2004;45:1826-1834.
- [236] Weinstock PH, Bisgaier CL, Hayek T, Aalto-Setälä K, Sehayek E, Wu L, et al. Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein A-IV knockout mice. *J Lipid Res* 1997;38:1782-1794.
- [237] VerHague MA, Cheng D, Weinberg RB, Shelness GS. Apolipoprotein A-IV expression in mouse liver enhances triglyceride secretion and reduces hepatic lipid content by promoting very low density lipoprotein particle expansion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2501-2508.
- [238] Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:472-484.
- [239] de Silva HV, Lauer SJ, Wang J, Simonet WS, Weisgraber KH, Mahley RW, et al. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J Biol Chem* 1994;269:2324-2335.
- [240] Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 1990;249:790-793.
- [241] Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest* 1992;90:1889-1900.
- [242] Wei J, Ouyang H, Wang Y, Pang D, Cong NX, Wang T, et al. Characterization of a hypertriglyceridemic transgenic miniature pig model expressing human apolipoprotein CIII. *FEBS J* 2012;279:91-99.
- [243] Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1994;269:23610-23616.
- [244] Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, van der Boom H, van Berkel TJ, Havekes LM. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. *J Lipid Res* 2001;42:1578-1585.
- [245] Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 1985;75:384-390.
- [246] Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res* 2010;51:150-161.
- [247] Qin W, Sundaram M, Wang Y, Zhou H, Zhong S, Chang CC, et al. Missense mutation in APOC3 within the C-terminal lipid binding domain of human ApoC-III results in impaired assembly and secretion of triacylglycerol-rich very low density lipoproteins: evidence that ApoC-III plays a major role in the formation of lipid precursors within the microsomal lumen. *J Biol Chem* 2011;286:27769-27780.
- [248] Zheng C, Khoo C, Ikewaki K, Sacks FM. Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of LDL subfractions. *J Lipid Res* 2007;48:1190-1203.
- [249] Cohn JS, Tremblay M, Batal R, Jacques H, Rodriguez C, Steiner G, et al. Increased apoC-III production is a characteristic feature of patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2004;177:137-145.
- [250] Field FJ, Mathur SN. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog Lipid Res* 1995;34:185-198.
- [251] Hoeg JM, Sviridov DD, Tennynson GE, Demosky SJ, Jr., Meng MS, Bojanovski D, et al. Both apolipoproteins B-48 and B-100 are synthesized and secreted by the human intestine. *J Lipid Res* 1990;31:1761-1769.

- [252] Mansbach CM, 2nd, Nevin P. Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *J Lipid Res* 1998;39:963-968.
- [253] Cartwright IJ, Higgins JA. Isolated rabbit enterocytes as a model cell system for investigations of chylomicron assembly and secretion. *J Lipid Res* 1999;40:1357-1365.
- [254] Li PS, Fu ZY, Zhang YY, Zhang JH, Xu CQ, Ma YT, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1. *Nat Med* 2014;20:80-86.
- [255] Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 2000;148:1-15.
- [256] Morita SY, Kawabe M, Nakano M, Handa T. Pluronic L81 affects the lipid particle sizes and apolipoprotein B conformation. *Chem Phys Lipids* 2003;126:39-48.
- [257] Fatma S, Yakubov R, Anwar K, Hussain MM. Pluronic L81 enhances triacylglycerol accumulation in the cytosol and inhibits chylomicron secretion. *J Lipid Res* 2006;47:2422-2432.
- [258] Morel E, Demignot S, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, Delers F. Lipid-dependent bidirectional traffic of apolipoprotein B in polarized enterocytes. *Mol Biol Cell* 2004;15:132-141.
- [259] Teng B, Verp M, Salomon J, Davidson NO. Apolipoprotein B messenger RNA editing is developmentally regulated and widely expressed in human tissues. *J Biol Chem* 1990;265:20616-20620.
- [260] Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1993;34:1367-1383.
- [261] Glickman RM, Rogers M, Glickman JN. Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5296-5300.
- [262] Hadjiagapiou C, Giannoni F, Funahashi T, Skarosi SF, Davidson NO. Molecular cloning of a human small intestinal apolipoprotein B mRNA editing protein. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1874-1879.
- [263] Lellek H, Kirsten R, Diehl I, Apostel F, Buck F, Greeve J. Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex. *J Biol Chem* 2000;275:19848-19856.
- [264] Mehta A, Kinter MT, Sherman NE, Driscoll DM. Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 2000;20:1846-1854.
- [265] Navaratnam N, Patel D, Shah RR, Greeve JC, Powell LM, Knott TJ, et al. An additional editing site is present in apolipoprotein B mRNA. *Nucleic Acids Res* 1991;19:1741-1744.
- [266] Blanc V, Xie Y, Luo J, Kennedy S, Davidson NO. Intestine-specific expression of Apobec-1 rescues apolipoprotein B RNA editing and alters chylomicron production in Apobec1  $-/-$  mice. *J Lipid Res* 2012;53:2643-2655.
- [267] Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 2003;19:207-216.
- [268] Kendrick JS, Chan L, Higgins JA. Superior role of apolipoprotein B48 over apolipoprotein B100 in chylomicron assembly and fat absorption: an investigation of apobec-1 knock-out and wild-type mice. *Biochem J* 2001;356:821-827.
- [269] Hirano K, Young SG, Farese RV, Jr., Ng J, Sande E, Warburton C, et al. Targeted disruption of the mouse apobec-1 gene abolishes apolipoprotein B mRNA editing and eliminates apolipoprotein B48. *J Biol Chem* 1996;271:9887-9890.
- [270] Morrison JR, Paszty C, Stevens ME, Hughes SD, Forte T, Scott J, et al. Apolipoprotein B RNA editing enzyme-deficient mice are viable despite alterations in lipoprotein metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7154-7159.
- [271] Nakamura M, Chang BH, Zsigmond E, Kobayashi K, Lei H, Ishida BY, et al. Complete phenotypic characterization of apobec-1 knockout mice with a wild-type genetic background and a human apolipoprotein B transgenic background, and restoration of apolipoprotein B mRNA editing by somatic gene transfer of Apobec-1. *J Biol Chem* 1996;271:25981-25988.
- [272] Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, et al. Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G344-352.
- [273] Blanc V, Henderson JO, Newberry EP, Kennedy S, Luo J, Davidson NO. Targeted deletion of the murine apobec-1 complementation factor (acf) gene results in embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2005;25:7260-7269.
- [274] Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, Fan J, Arnold KS, Taylor S, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8483-8487.
- [275] Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1183-1194.
- [276] Mansbach CM, Siddiqi SA. The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol* 2010;72:315-333.
- [277] Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:281-285.
- [278] Hamilton RL, Wong JS, Cham CM, Nielsen LB, Young SG. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res* 1998;39:1543-1557.
- [279] Zilversmit DB. Formation and transport of chylomicrons. *Fed Proc* 1967;26:1599-1605.
- [280] Siddiqi SA, Mansbach CM, 2nd. PKC zeta-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 2008;121:2327-2338.
- [281] Siddiqi S, Mani AM, Siddiqi SA. The identification of the SNARE complex required for the fusion of VLDL-transport vesicle with hepatic cis-Golgi. *Biochem J* 2010;429:391-401.
- [282] Siddiqi S, Mansbach CM, 2nd. Phosphorylation of Sar1b protein releases liver fatty acid-binding protein from multiprotein complex in intestinal cytosol enabling it to bind to endoplasmic reticulum (ER) and bud the pre-chylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* 2012;287:10178-10188.
- [283] Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Peggs K, Gorelick FS, Mansbach CM, 2nd. The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* 2006;281:20974-20982.
- [284] Siddiqi S, Siddiqi SA, Mansbach CM, 2nd. Sec24C is required for docking the prechylomicron transport vesicle with the Golgi. *J Lipid Res* 2010;51:1093-1100.
- [285] Kumar NS, Mansbach CM. Determinants of triacylglycerol transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in intestine. *Am J Physiol* 1997;273:G18-30.
- [286] Berriot-Varoqueaux N, Dannoura AH, Moreau A, Verthier N, Sassolas A, Cadiot G, et al. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology* 2001;121:1101-1108.

- [287] Olofsson SO, Bjursell G, Bostrom K, Carlsson P, Elovson J, Protter AA, et al. Apolipoprotein B: structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. *Atherosclerosis* 1987;68:1-17.
- [288] Cartwright IJ, Higgins JA. Increased dietary triacylglycerol markedly enhances the ability of isolated rabbit enterocytes to secrete chylomicrons: an effect related to dietary fatty acid composition. *J Lipid Res* 1999;40:1858-1866.
- [289] Iqbal J, Anwar K, Hussain MM. Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:31610-31620.
- [290] Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, et al. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta* 2011;412:1306-1318.
- [291] Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:353-363.
- [292] Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest* 1993;91:748-758.
- [293] Schneeman BO, Kotite L, Todd KM, Havel RJ. Relationships between the responses of triglyceride-rich lipoproteins in blood plasma containing apolipoproteins B-48 and B-100 to a fat-containing meal in normolipidemic humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2069-2073.
- [294] Chan JW, Motton D, Rutledge JC, Keim NL, Huser T. Raman spectroscopic analysis of biochemical changes in individual triglyceride-rich lipoproteins in the pre- and postprandial state. *Anal Chem* 2005;77:5870-5876.
- [295] Olofsson SO, Asp L, Boren J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:341-346.
- [296] Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:151-157.
- [297] Zhang J, Herscovitz H. Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem* 2003;278:7459-7468.
- [298] Rustaeus S, Stillemark P, Lindberg K, Gordon D, Olofsson SO. The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein B-100 very low density lipoprotein in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* 1998;273:5196-5203.
- [299] Pan M, Liang JS, Fisher EA, Ginsberg HN. The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis. *J Biol Chem* 2002;277:4413-4421.
- [300] Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1079-1086.
- [301] Swift LL. Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1996;271:31491-31495.
- [302] Hossain T, Riad A, Siddiqi S, Parthasarathy S, Siddiqi SA. Mature VLDL triggers the biogenesis of a distinct vesicle from the trans-Golgi network for its export to the plasma membrane. *Biochem J* 2014;459:47-58.
- [303] Fisher EA, Khanna NA, McLeod RS. Ubiquitination regulates the assembly of VLDL in HepG2 cells and is the committing step of the apoB-100 ERAD pathway. *J Lipid Res* 2011;52:1170-1180.
- [304] Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131-1135.
- [305] Flamment M, Kammoun HL, Hainault I, Ferre P, Foufelle F. Endoplasmic reticulum stress: a new actor in the development of hepatic steatosis. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:239-246.
- [306] Qiu W, Avramoglu RK, Rutledge AC, Tsai J, Adeli K. Mechanisms of glucosamine-induced suppression of the hepatic assembly and secretion of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2006;47:1749-1761.
- [307] Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316-332.
- [308] Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 2002;16:452-466.
- [309] Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492-1496.
- [310] Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, et al. The unfolded protein response transducer IRE1alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J* 2011;30:1357-1375.
- [311] Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, et al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:725-730.
- [312] Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1091-1095.
- [313] Haas ME, Attie AD, Biddinger SB. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:391-397.
- [314] Phung TL, Roncone A, Jensen KL, Sparks CE, Sparks JD. Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1997;272:30693-30702.
- [315] Tsai J, Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Adeli K. MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:211-218.
- [316] Sparks JD, Sparks CE. Overindulgence and metabolic syndrome: is FoxO1 a missing link? *J Clin Invest* 2008;118:2012-2015.
- [317] Andreo U, Guo L, Chirieac DV, Tuyama AC, Montenont E, Brodsky JL, et al. Insulin-stimulated degradation of apolipoprotein B100: roles of class II phosphatidylinositol-3-kinase and autophagy. *PLoS One* 2013;8:e57590.



- [318] Allister EM, Borradaile NM, Edwards JY, Huff MW. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and apolipoprotein B100 secretion by the citrus flavonoid naringenin and by insulin involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in hepatocytes. *Diabetes* 2005;54:1676-1683.
- [319] Kim DH, Zhang T, Lee S, Calabuig-Navarro V, Yamauchi J, Piccirillo A, et al. FoxO6 integrates insulin signaling with MTP for regulating VLDL production in the liver. *Endocrinology* 2014;155:1255-1267.
- [320] Kern PA, Martin RA, Carty J, Goldberg IJ, Ong JM. Identification of lipoprotein lipase immunoreactive protein in pre- and postheparin plasma from normal subjects and patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990;31:17-26.
- [321] Zhang J, Hashmi S, Cheema F, Al-Nasser N, Bakheet R, Parhar RS, et al. Regulation of lipoprotein assembly, secretion and fatty acid beta-oxidation by Kruppel-like transcription factor, klf-3. *J Mol Biol* 2013;425:2641-2655.
- [322] Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS, Mansbach CM, 2nd. Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci* 2006;119:943-950.
- [323] Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 1992;33:167-178.
- [324] Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9647-9651.
- [325] Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 1992;287 ( Pt 2):337-347.
- [326] Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* 2002;80:753-769.
- [327] Olafsen T, Young SG, Davies BS, Beigneux AP, Kenanova VE, Voss C, et al. Unexpected expression pattern for glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1 (GPIHBP1) in mouse tissues revealed by positron emission tomography scanning. *J Biol Chem* 2010;285:39239-39248.
- [328] van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem* 1994;269:4626-4633.
- [329] Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E271-288.
- [330] Davis RC, Wong H, Nikazy J, Wang K, Han Q, Schotz MC. Chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. *J Biol Chem* 1992;267:21499-21504.
- [331] Wong H, Yang D, Hill JS, Davis RC, Nikazy J, Schotz MC. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5594-5598.
- [332] Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem* 2002;269:4701-4710.
- [333] Peterson J, Fujimoto WY, Brunzell JD. Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res* 1992;33:1165-1170.
- [334] Olivecrona T, Liu G, Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G. Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem Soc Trans* 1993;21:509-513.
- [335] Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1992;1123:1-17.
- [336] Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989;320:1060-1068.
- [337] Faustinella F, Smith LC, Semenkovich CF, Chan L. Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. *J Biol Chem* 1991;266:9481-9485.
- [338] Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, et al. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem* 1994;269:10319-10323.
- [339] Lookene A, Groot NB, Kastelein JJ, Olivecrona G, Bruin T. Mutation of tryptophan residues in lipoprotein lipase. Effects on stability, immunoreactivity, and catalytic properties. *J Biol Chem* 1997;272:766-772.
- [340] Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. *J Lipid Res* 2001;42:1180-1186.
- [341] Goulbourne CN, Gin P, Tatar A, Nobumori C, Hoenger A, Jiang H, et al. The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell Metab* 2014;19:849-860.
- [342] Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtiss LK, Gretch DG, Sturley SL, et al. Lipoprotein lipase association with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1995;270:8081-8086.
- [343] Hussain MM, Obunike JC, Shaheen A, Hussain MJ, Shelness GS, Goldberg IJ. High affinity binding between lipoprotein lipase and lipoproteins involves multiple ionic and hydrophobic interactions, does not require enzyme activity, and is modulated by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 2000;275:29324-29330.
- [344] Boren J, Lookene A, Makoveichuk E, Xiang S, Gustafsson M, Liu H, et al. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J Biol Chem* 2001;276:26916-26922.
- [345] Ma Y, Henderson HE, Liu MS, Zhang H, Forsythe IJ, Clarke-Lewis I, et al. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1994;35:2049-2059.
- [346] McIlhargey TL, Yang Y, Wong H, Hill JS. Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase. *J Biol Chem* 2003;278:23027-23035.
- [347] Razzaghi H, Day BW, McClure RJ, Kamboh MI. Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. *J Mol Graph Model* 2001;19:487-494, 587-490.
- [348] Voss CV, Davies BS, Tat S, Gin P, Fong LG, Pelletier C, et al. Mutations in lipoprotein lipase that block binding to the endothelial cell transporter GPIHBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7980-7984.
- [349] Adeyo O, Goulbourne CN, Bensadoun A, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 and the intravascular processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Intern Med* 2012;272:528-540.
- [350] Gin P, Goulbourne CN, Adeyo O, Beigneux AP, Davies BS, Tat S, et al. Chylomicronemia mutations yield new insights into interactions between lipoprotein lipase and GPIHBP1. *Hum Mol Genet* 2012;21:2961-2972.

- [351] Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 2011;52:1869-1884.
- [352] Wassef L, Quadro L. Uptake of dietary retinoids at the maternal-fetal barrier: in vivo evidence for the role of lipoprotein lipase and alternative pathways. *J Biol Chem* 2011;286:32198-32207.
- [353] Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gafvels M, Kozarsky KF, et al. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J Biol Chem* 1995;270:26550-26557.
- [354] Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996;37:693-707.
- [355] Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hammerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:471-481.
- [356] Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 1997;38:1722-1729.
- [357] Mamputu JC, Levesque L, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2212-2219.
- [358] Kota RS, Ramana CV, Tenorio FA, Enelow RI, Rutledge JC. Differential effects of lipoprotein lipase on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma-mediated gene expression in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:31076-31084.
- [359] Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:919-933.
- [360] Enerback S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1993;1169:107-125.
- [361] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002;43:1997-2006.
- [362] Yang LX, Razzaghi H, Hokanson JE, Kamboh MI. Identification and characterization of a novel 5 bp deletion in a putative insulin response element in the lipoprotein lipase gene. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:1057-1065.
- [363] Kinnunen PK, Jackson RL, Smith LC, Gotto AM, Jr., Sparrow JT. Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:4848-4851.
- [364] Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, et al. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* 1986;78:1287-1295.
- [365] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294:169-173.
- [366] Calandra S, Priore Oliva C, Tarugi P, Bertolini S. APOA5 and triglyceride metabolism, lesson from human APOA5 deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:122-127.
- [367] Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17450-17455.
- [368] Liu J, Afroza H, Rader DJ, Jin W. Angiotensin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. *J Biol Chem* 2010;285:27561-27570.
- [369] Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol* 2014;8:287-295.
- [370] Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013;27:459-484.
- [371] Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:1-12.
- [372] Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagne SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 1996;335:848-854.
- [373] Beigneux AP, Gin P, Davies BS, Weinstein MM, Bensadoun A, Ryan RO, et al. Glycosylation of Asn-76 in mouse GPIHBP1 is critical for its appearance on the cell surface and the binding of chylomicrons and lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 2008;49:1312-1321.
- [374] Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 2007;5:279-291.
- [375] Davies BS, Beigneux AP, Barnes RH, 2nd, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab* 2010;12:42-52.
- [376] Ioka RX, Kang MJ, Kamiyama S, Kim DH, Magoori K, Kamataki A, et al. Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J Biol Chem* 2003;278:7344-7349.
- [377] Weinstein MM, Yin L, Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Estrada K, et al. Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J Biol Chem* 2008;283:34511-34518.
- [378] Weinstein MM, Goulbourne CN, Davies BS, Tu Y, Barnes RH, 2nd, Watkins SM, et al. Reciprocal metabolic perturbations in the adipose tissue and liver of GPIHBP1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:230-235.
- [379] Gin P, Yin L, Davies BS, Weinstein MM, Ryan RO, Bensadoun A, et al. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J Biol Chem* 2008;283:29554-29562.
- [380] Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 2010;211:1-8.
- [381] Franssen R, Young SG, Peelman F, Hertecant J, Sierts JA, Schimmel AW, et al. Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIHBP1 defects. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:169-178.
- [382] Beigneux AP, Davies BS, Tat S, Chen J, Gin P, Voss CV, et al. Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2011;286:19735-19743.



- [383] Sonnenburg WK, Yu D, Lee EC, Xiong W, Gololobov G, Key B, et al. GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *J Lipid Res* 2009;50:2421-2429.
- [384] Gin P, Beigneux AP, Voss C, Davies BS, Beckstead JA, Ryan RO, et al. Binding preferences for GPIHBP1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein of capillary endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:176-182.
- [385] Plengpanich W, Young SG, Khovidhunkit W, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, et al. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem* 2014;289:19491-19499.
- [386] Charriere S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, et al. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1675-1679.
- [387] Rios JJ, Shastry S, Jasso J, Hauser N, Garg A, Bensadoun A, et al. Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. *J Inherit Metab Dis* 2011;35:531-540.
- [388] Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, et al. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:956-962.
- [389] Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, Makoveichuk E, Lindberg A, Hayden MR, et al. Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *J Lipid Res* 2010;51:1535-1545.
- [390] Coca-Prieto I, Kroupa O, Gonzalez-Santos P, Magne J, Olivecrona G, Ehrenborg E, et al. Childhood-onset chylomicronaemia with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel GPIHBP1 mutation. *J Intern Med* 2011;270:224-228.
- [391] Berge KE, Retterstol K, Romeo S, Pirazzi C, Leren TP. Type 1 hyperlipoproteinemia due to a novel deletion of exons 3 and 4 in the GPIHBP1 gene. *Atherosclerosis* 2014;234:30-33.
- [392] Gonzaga-Jauregui C, Mir S, Penney S, Jhangiani S, Midgen C, Finegold M, et al. Whole-Exome Sequencing Reveals GPIHBP1 Mutations in A Case of Infantile Colitis with Severe Hypertriglyceridemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014.
- [393] Yamamoto H, Onishi M, Miyamoto N, Oki R, Ueda H, Ishigami M, et al. Novel combined GPIHBP1 mutations in a patient with hypertriglyceridemia associated with CAD. *J Atheroscler Thromb* 2013;20:777-784.
- [394] O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 2005;51:351-359.
- [395] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001;276:44512-44520.
- [396] Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:397-404.
- [397] Lookene A, Beckstead JA, Nilsson S, Olivecrona G, Ryan RO. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 2005;280:25383-25387.
- [398] Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2005;280:21553-21560.
- [399] Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vriens C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* 2004;279:27941-27947.
- [400] Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, Burgess BL, Beckstead JA, Young SG, et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav<sup>-/-</sup> mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2504-2509.
- [401] Marçais C, Verges B, Charriere S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, et al. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* 2005;115:2862-2869.
- [402] Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. *J Intern Med* 2008;263:450-458.
- [403] Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* 2011;219:15-21.
- [404] Mendoza-Barbera E, Julve J, Nilsson SK, Lookene A, Martin-Campos JM, Roig R, et al. Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 2013;54:649-661.
- [405] Gonzales JC, Gordts PL, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J Clin Invest* 2013;123:2742-2751.
- [406] Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* 2003;278:34438-34444.
- [407] Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, Kamari Y, Harats D, Rubin EM, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2573-2579.
- [408] Gao X, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;427:361-365.
- [409] Charriere S, Bernard S, Aqallal M, Merlin M, Billon S, Perrot L, et al. Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2008;394:99-103.
- [410] Pullinger CR, Auouzerat BE, Movsesyan I, Durlach V, Sijbrands EJ, Nakajima K, et al. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients. *J Lipid Res* 2008;49:1846-1854.

- [411] Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1866-1871.
- [412] Kluger M, Heeren J, Merkel M. Apoprotein A-V: an important regulator of triglyceride metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:281-288.
- [413] Charriere S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, Charcosset M, et al. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis* 2009;207:150-156.
- [414] Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Guido V, Priore Oliva C, Calandra S, et al. Two novel rare variants of APOA5 gene found in subjects with severe hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* 2011;412:2194-2198.
- [415] Albers K, Schlein C, Wenner K, Lohse P, Bartelt A, Heeren J, et al. Homozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide results in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia in a breast-fed infant. *Atherosclerosis* 2014;233:97-103.
- [416] Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S, et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2006;188:215-217.
- [417] Henneman P, Schaap FG, Rensen PC, van Dijk KW, Smelt AH. Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. *J Intern Med* 2008;263:107-108.
- [418] Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR, et al. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2010;42:684-687.
- [419] Talmud PJ. Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. *Atherosclerosis* 2007;194:287-292.
- [420] Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:411-417.
- [421] Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism* 2012;61:906-921.
- [422] Ekman R, Nilsson-Ehle P. Effects of apolipoproteins on lipoprotein lipase activity of human adipose tissue. *Clin Chim Acta* 1975;63:29-35.
- [423] Shachter NS, Hayek T, Leff T, Smith JD, Rosenberg DW, Walsh A, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Clin Invest* 1994;93:1683-1690.
- [424] Shen Y, Lookene A, Zhang L, Olivecrona G. Site-directed mutagenesis of apolipoprotein CII to probe the role of its secondary structure for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2010;285:7484-7492.
- [425] Reina M, Brunzell JD, Deeb SS. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Lipid Res* 1992;33:1823-1832.
- [426] Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice. Apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1997;99:2672-2681.
- [427] Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem* 1991;266:18259-18267.
- [428] Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem* 1991;266:8651-8654.
- [429] Jong MC, van Ree JH, Dahlmans VE, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Reduced very-low-density lipoprotein fractional catabolic rate in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J* 1997;321 ( Pt 2):445-450.
- [430] Larsson M, Vorrso E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem* 2013;288:33997-34008.
- [431] Tetali SD, Budamagunta MS, Simion C, den Hartigh LJ, Kalai T, Hideg K, et al. VLDL lipolysis products increase VLDL fluidity and convert apolipoprotein E4 into a more expanded conformation. *J Lipid Res* 2010;51:1273-1283.
- [432] den Hartigh LJ, Altman R, Hutchinson R, Petrolova J, Budamagunta MS, Tetali SD, et al. Postprandial apoE isoform and conformational changes associated with VLDL lipolysis products modulate monocyte inflammation. *PLoS One* 2012;7:e50513.
- [433] Clark AB, Quarfordt SH. Apolipoprotein effects on the lipolysis of perfused triglyceride by heparin-immobilized milk lipase. *J Biol Chem* 1985;260:4778-4783.
- [434] Fielding PE, Ishikawa Y, Fielding CJ. Apolipoprotein E mediates binding of normal very low density lipoprotein to heparin but is not required for high affinity receptor binding. *J Biol Chem* 1989;264:12462-12466.
- [435] Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 1993;268:10160-10167.
- [436] Krul ES, Tikkanen MJ, Schonfeld G. Heterogeneity of apolipoprotein E epitope expression on human lipoproteins: importance for apolipoprotein E function. *J Lipid Res* 1988;29:1309-1325.
- [437] Sehayek E, Lewin-Velvert U, Chajek-Shaul T, Eisenberg S. Lipolysis exposes unreactive endogenous apolipoprotein E-3 in human and rat plasma very low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991;88:553-560.
- [438] Lund-Katz S, Weisgraber KH, Mahley RW, Phillips MC. Conformation of apolipoprotein E in lipoproteins. *J Biol Chem* 1993;268:23008-23015.
- [439] Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997;38:2173-2192.
- [440] Lichtenstein L, Kersten S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIIIBP1. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:415-420.
- [441] Cazes A, Galaup A, Chomel C, Bignon M, Brechot N, Le Jan S, et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res* 2006;99:1207-1215.
- [442] Robciuc MR, Tahvanainen E, Jauhainen M, Ehnholm C. Quantitation of serum angiopoietin-like proteins 3 and 4 in a Finnish population sample. *J Lipid Res* 2009;51:824-831.

- [443] Lafferty MJ, Bradford KC, Erie DA, Neher SB. Angiopoietin-like protein 4 inhibition of lipoprotein lipase: evidence for reversible complex formation. *J Biol Chem* 2013;288:28524-28534.
- [444] Nilsson SK, Anderson F, Ericsson M, Larsson M, Makoveichuk E, Lookene A, et al. Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:1370-1378.
- [445] Mattijssen F, Alex S, Swarts HJ, Groen AK, van Schothorst EM, Kersten S. Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion. *Mol Metab* 2014;3:135-144.
- [446] Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet* 2007;39:513-516.
- [447] Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V, Drenos F, et al. ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2319-2325.
- [448] Holmen OL, Zhang H, Fan Y, Hovelson DH, Schmidt EM, Zhou W, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nat Genet* 2014;46:345-351.
- [449] Arca M, Minicocci I, Maranghi M. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:313-320.
- [450] Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010;363:2220-2227.
- [451] Robciuc MR, Maranghi M, Lahikainen A, Rader D, Bensadoun A, Oorni K, et al. Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1706-1713.
- [452] Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* 2005;146:4943-4950.
- [453] Lee AH. The role of CREB-H transcription factor in triglyceride metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:141-146.
- [454] Luebke-Wheeler J, Zhang K, Battle M, Si-Tayeb K, Garrison W, Chhinder S, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced acute phase response by regulating expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H. *Hepatology* 2008;48:1242-1250.
- [455] Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med* 2011;17:812-815.
- [456] Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006;124:587-599.
- [457] Xu X, Park JG, So JS, Hur KY, Lee AH. Transcriptional regulation of apolipoprotein A-IV by the transcription factor CREBH. *J Lipid Res* 2014;55:850-859.
- [458] Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:66-72.
- [459] Reardon MF, Sakai H, Steiner G. Roles of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in the catabolism in vivo of triglyceride-rich lipoproteins. *Arteriosclerosis* 1982;2:396-402.
- [460] Ly HL, Mortimer BC, Baker E, Redgrave TG. Clearance from plasma of lymph chylomicrons and chylomicron remnants labelled with 125I-tyramine-cellobiose. *Biochem J* 1992;286 ( Pt 3):937-943.
- [461] Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2007;39:1483-1487.
- [462] Doolittle MH, Peterfy M. Mechanisms of lipase maturation. *Clin Lipidol* 2010;5:71-85.
- [463] Davies BS, Goulbourne CN, Barnes RH, 2nd, Turlo KA, Gin P, Vaughan S, et al. Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. *J Lipid Res* 2012;53:2690-2697.
- [464] Dijk W, Kersten S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. *Trends Endocrinol Metab* 2014;25:146-155.
- [465] Cupp M, Bensadoun A, Melford K. Heparin decreases the degradation rate of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem* 1987;262:6383-6388.
- [466] Semb H, Olivecrona T. Mechanisms for turnover of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1987;921:104-115.
- [467] Cisar LA, Hoogewerf AJ, Cupp M, Rapport CA, Bensadoun A. Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *J Biol Chem* 1989;264:1767-1774.
- [468] Parthasarathy N, Goldberg IJ, Sivaram P, Mulloy B, Flory DM, Wagner WD. Oligosaccharide sequences of endothelial cell surface heparan sulfate proteoglycan with affinity for lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1994;269:22391-22396.
- [469] Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest* 2008;118:3247-3259.
- [470] Williams KJ. Some things just have to be done in vivo: GPIHBP1, caloric delivery, and the generation of remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:792-795.
- [471] Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 1994;264:1948-1951.
- [472] Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J* 2000;351 Pt 3:607-612.
- [473] Brunzell JD, Hazzard WR, Porte D, Jr., Bierman EL. Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man. *J Clin Invest* 1973;52:1578-1585.
- [474] Connelly PW, Maguire GF, Vezina C, Hegele RA, Kuksis A. Kinetics of lipolysis of very low density lipoproteins by lipoprotein lipase. Importance of particle number and noncompetitive inhibition by particles with low triglyceride content. *J Biol Chem* 1994;269:20554-20560.
- [475] Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D, Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1999;40:1655-1663.

- [476] Nozaki S, Kubo M, Sudo H, Matsuzawa Y, Tarui S. The role of hepatic triglyceride lipase in the metabolism of intermediate-density lipoprotein--postheparin lipolytic activities determined by a sensitive, nonradioisotopic method in hyperlipidemic patients and normals. *Metabolism* 1986;35:53-58.
- [477] Ishikawa Y, Fielding CJ, Fielding PE. A change in apolipoprotein B expression is required for the binding of apolipoprotein E to very low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1988;263:2744-2749.
- [478] Gomez-Coronado D, Saez GT, Lasuncion MA, Herrera E. Different hydrolytic efficiencies of adipose tissue lipoprotein lipase on very-low-density lipoprotein subfractions separated by heparin-Sepharose chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1993;1167:70-78.
- [479] Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem* 1989;264:4349-4355.
- [480] Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brunzell JD. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1996;37:2394-2404.
- [481] Zheng C, Murdoch SJ, Brunzell JD, Sacks FM. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:891-896.
- [482] Marzetta CA, Foster DM, Brunzell JD. Conversion of plasma VLDL and IDL precursors into various LDL subpopulations using density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res* 1990;31:975-984.
- [483] Goldberg IJ, Le NA, Paterniti JR, Jr., Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J Clin Invest* 1982;70:1184-1192.
- [484] Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007;446:1030-1037.
- [485] Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* 2007;117:94-98.
- [486] Bishop JR, Stanford KI, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:307-313.
- [487] Williams KJ, Chen K. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:218-228.
- [488] Matikainen N, Burza MA, Romeo S, Hakkarainen A, Adiels M, Folkersen L, et al. Genetic variation in SULF2 is associated with postprandial clearance of triglyceride-rich remnant particles and triglyceride levels in healthy subjects. *PLoS One* 2013;8:e79473.
- [489] Chatterjee C, Sparks DL. Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia. *Am J Pathol* 2011;178:1429-1433.
- [490] Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1750-1754.
- [491] Karakas SE, Khilnani S, Divens C, Almario R, Jen KL. Changes in plasma lipoproteins during lipolysis in vivo in the hypertriglyceridemic state. *Am J Clin Nutr* 1994;59:378-383.
- [492] Mera Y, Hata T, Ishii Y, Tomimoto D, Kawai T, Ohta T, et al. JTT-130, a novel intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, reduces food preference for fat. *J Diabetes Res* 2014;2014:583752.
- [493] Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 2009;10:109-121.
- [494] Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, Tanaka T, Smith CE, Lai CQ, et al. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. *Am J Hum Genet* 2013;92:5-14.
- [495] Caussy C, Charriere S, Marçais C, Di Filippo M, Sassolas A, Delay M, et al. An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site. *Am J Hum Genet* 2014;94:129-134.
- [496] Corella D, Sorli JV, Estruch R, Coltell O, Ortega-Azorin C, Portoles O, et al. MicroRNA-410 regulated lipoprotein lipase variant rs13702 is associated with stroke incidence and modulated by diet in the randomized controlled PREDIMED trial. *Am J Clin Nutr* 2014;100:719-731.
- [497] He PP, Ouyang XP, Tang YY, Liao L, Wang ZB, Lv YC, et al. MicroRNA-590 attenuates lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting lipoprotein lipase gene in human THP-1 macrophages. *Biochimie* 2014.
- [498] Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, et al. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab* 2009;97:136-142.
- [499] Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:24.
- [500] Korn ED. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil. *J Biol Chem* 1955;215:15-26.
- [501] Henderson HE, Bijvoet SM, Mannens MA, Bruin T, Erkelens DW, Hayden MR, et al. Ile225Thr loop mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene is a de novo event. *Am J Med Genet* 1998;78:313-316.
- [502] Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem* 2004;50:1725-1732.
- [503] Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:515-545.
- [504] Aguilar-Salinas CA, Barrett PH, Parhofer KG, Young SG, Tessereau D, Bateman J, et al. Apoprotein B-100 production is decreased in subjects heterozygous for truncations of apoprotein B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:71-80.
- [505] Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* 2007;193:445-448.
- [506] Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005;37:161-165.
- [507] Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;354:1264-1272.



- [508] Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJ, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1236-1245.
- [509] Turlo K, Leung CS, Seo JJ, Goulbourne CN, Adeyo O, Gin P, et al. Equivalent binding of wild-type lipoprotein lipase (LPL) and S447X-LPL to GPIHBP1, the endothelial cell LPL transporter. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:963-969.
- [510] Subramanian S, Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:819-825.
- [511] Pang J, Chan DC, Watts GF. Origin and therapy for hypertriglyceridaemia in type 2 diabetes. *World J Diabetes* 2014;5:165-175.
- [512] Resnick HE, Foster GL, Bardsley J, Ratner RE. Achievement of American Diabetes Association clinical practice recommendations among U.S. adults with diabetes, 1999-2002: the National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2006;29:531-537.
- [513] Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1697-1703.
- [514] Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755-765.
- [515] Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 2002;11:3039-3046.
- [516] Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F, et al. The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis* 2007;191:409-417.
- [517] Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, Kolz M, Heid IM, Meisinger C, et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J Lipid Res* 2007;48:2614-2621.
- [518] Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem* 2005;280:28215-28220.
- [519] Ahituv N, Akiyama J, Chapman-Helleboid A, Fruchart J, Pennacchio LA. In vivo characterization of human APOA5 haplotypes. *Genomics* 2007;90:674-679.
- [520] Pullinger CR, Zysow BR, Hennessy LK, Frost PH, Malloy MJ, Kane JP. Molecular cloning and characteristics of a new apolipoprotein C-II mutant identified in three unrelated individuals with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet* 1993;2:69-74.
- [521] Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2002;277:4334-4342.
- [522] Havel RJ, Kotite L, Kane JP. Isoelectric heterogeneity of the cofactor protein for lipoprotein lipase in human blood plasma. *Biochem Med* 1979;21:121-138.
- [523] 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;30:520-529.
- [524] Cariou B, Ouguerram K, Zair Y, Guerois R, Langhi C, Kourimate S, et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:2191-2197.
- [525] Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel MC, et al. Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:104-108.
- [526] Huijgen R, Sjouke B, Vis K, de Randamie JS, Defesche JC, Kastelein JJ, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-CI Levels. *Hum Mutat* 2012;33:448-455.
- [527] Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, et al. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology* 1987;92:390-399.
- [528] Dannoura AH, Berriot-Varoqueaux N, Amati P, Abadie V, Verthier N, Schmitz J, et al. Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2494-2508.
- [529] Bouma ME, Beucler I, Aggerbeck LP, Infante R, Schmitz J. Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunoenzymatic and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *J Clin Invest* 1986;78:398-410.
- [530] Georges A, Bonneau J, Bonnefont-Rousselot D, Champigneulle J, Rabes JP, Abifadel M, et al. Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (Chylomicron retention disease). *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:1.
- [531] Minehira K, Young SG, Villanueva CJ, Yetukuri L, Oresic M, Hellerstein MK, et al. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res* 2008;49:2038-2044.
- [532] Josekutty J, Iqbal J, Iwawaki T, Kohno K, Hussain MM. Microsomal triglyceride transfer protein inhibition induces endoplasmic reticulum stress and increases gene transcription via I $\alpha$ 1/cJun to enhance plasma ALT/AST. *J Biol Chem* 2013;288:14372-14383.
- [533] Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003;38:133-140.
- [534] Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004;40:781-786.
- [535] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461-1465.
- [536] Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Stahlman M, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol* 2012;57:1276-1282.

- [537] Peter A, Kovarova M, Nadalin S, Cermak T, Konigsrainer A, Machicao F, et al. PNPLA3 variant I148M is associated with altered hepatic lipid composition in humans. *Diabetologia* 2014;57:2103-2107.
- [538] Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:325-334.
- [539] Ruhanen H, Perttala J, Holtta-Vuori M, Zhou Y, Yki-Jarvinen H, Ikonen E, et al. PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. *J Lipid Res* 2014;55:739-746.
- [540] Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2014;46:352-356.
- [541] Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014;5:4309.
- [542] Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, Silveira A, Franco-Cereceda A, Hamsten A, et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:8913-8918.
- [543] Ouguerram K, Zair Y, Kasbi-Chadli F, Nazih H, Bligny D, Schmitz J, et al. Low rate of production of apolipoproteins B100 and AI in 2 patients with Anderson disease (chylomicron retention disease). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1520-1525.
- [544] Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgartel C, Schekman R, et al. Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* 2012;482:495-500.
- [545] Levy E, Chouraqui JP, Roy CC. Steatorrhea and disorders of chylomicron synthesis and secretion. *Pediatr Clin North Am* 1988;35:53-67.
- [546] Rivier AS, Castillon GA, Michon L, Fukasawa M, Romanova-Michaelides M, Jaensch N, et al. Exit of GPI-anchored proteins from the ER differs in yeast and mammalian cells. *Traffic* 2010;11:1017-1033.
- [547] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052-1062.
- [548] Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Intestinal nuclear receptors in HDL cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 2014.
- [549] Gabelli C, Bilato C, Martini S, Tennyson GE, Zech LA, Corsini A, et al. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia. Increased LDL catabolism in hypobetalipoproteinemia due to a truncated apolipoprotein B species, apo B-87Padova. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1189-1196.
- [550] Katsuda S, Kawashiri MA, Inazu A, Tada H, Tsuchida M, Kaneko Y, et al. Apolipoprotein B gene mutations and fatty liver in Japanese hypobetalipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 2009;399:64-68.
- [551] Yao ZM, Blackhart BD, Linton MF, Taylor SM, Young SG, McCarthy BJ. Expression of carboxyl-terminally truncated forms of human apolipoprotein B in rat hepatoma cells. Evidence that the length of apolipoprotein B has a major effect on the buoyant density of the secreted lipoproteins. *J Biol Chem* 1991;266:3300-3308.
- [552] Welty FK, Hubl ST, Pierotti VR, Young SG. A truncated species of apolipoprotein B (B67) in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1991;87:1748-1754.
- [553] Groenewegen WA, Averna MR, Pulai J, Krul ES, Schonfeld G. Apolipoprotein B-38.9 does not associate with apo[a] and forms two distinct HDL density particle populations that are larger than HDL. *J Lipid Res* 1994;35:1012-1025.
- [554] Fabbri E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010;51:679-689.
- [555] Arca M, Pigna G, Favocchia C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:684-686.
- [556] Chan DC, Barrett PH, Ooi EM, Ji J, Chan DT, Watts GF. Very low density lipoprotein metabolism and plasma adiponectin as predictors of high-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obese and nonobese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:989-997.
- [557] Verges B, Adiels M, Boren J, Hugh Barrett P, Watts GF, Chan D, et al. Interrelationships between the kinetics of VLDL subspecies and HDL catabolism in abdominal obesity: a multicentre tracer kinetic study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;jc20142365.
- [558] Konige M, Wang H, Sztalryd C. Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:393-401.
- [559] Minicocci I, Santini S, Cantisani V, Stitzel N, Kathiresan S, Arroyo JA, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res* 2013;54:3481-3490.
- [560] Barlowe C. Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat. *Cell* 2003;114:395-397.
- [561] Boyadjiev SA, Fromme JC, Ben J, Chong SS, Nauta C, Hur DJ, et al. Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. *Nat Genet* 2006;38:1192-1197.
- [562] Schwarz K, Iolascon A, Verissimo F, Trede NS, Horsley W, Chen W, et al. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nat Genet* 2009;41:936-940.
- [563] Russo R, Esposito MR, Iolascon A. Inherited hematological disorders due to defects in coat protein (COP)II complex. *Am J Hematol* 2013;88:135-140.
- [564] Kim SD, Pahuja KB, Ravazzola M, Yoon J, Boyadjiev SA, Hammamoto S, et al. The [corrected] SEC23-SEC31 [corrected] interface plays critical role for export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2012;287:10134-10144.
- [565] Aguglia U, Annesi G, Pasquinelli G, Spadafora P, Gambardella A, Annesi F, et al. Vitamin E deficiency due to chylomicron retention disease in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol* 2000;47:260-264.
- [566] Silvain M, Bligny D, Aparicio T, Laforet P, Grodet A, Peretti N, et al. Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the SARA2 gene associated with muscular and cardiac abnormalities. *Clin Genet* 2008;74:546-552.
- [567] Annesi G, Aguglia U, Tarantino P, Annesi F, De Marco EV, Civitelli D, et al. SIL1 and SARA2 mutations in Marinesco-Sjogren and chylomicron retention diseases. *Clin Genet* 2007;71:288-289.



- [568] Bartels ED, Nielsen JM, Hellgren LI, Ploug T, Nielsen LB. Cardiac expression of microsomal triglyceride transfer protein is increased in obesity and serves to attenuate cardiac triglyceride accumulation. *PLoS One* 2009;4:e5300.
- [569] Cefalu AB, Calvo PL, Noto D, Baldi M, Valenti V, Lerro P, et al. Variable phenotypic expression of chylomicron retention disease in a kindred carrying a mutation of the Sara2 gene. *Metabolism* 2010;59:463-467.
- [570] Magnolo L, Najah M, Fancello T, Di Leo E, Pinotti E, Brini I, et al. Novel mutations in SAR1B and MTTP genes in Tunisian children with chylomicron retention disease and abetalipoproteinemia. *Gene* 2013;512:28-34.
- [571] Okada T, Miyashita M, Fukuhara J, Sugitani M, Ueno T, Samson-Bouma ME, et al. Anderson's disease/chylomicron retention disease in a Japanese patient with uniparental disomy 7 and a normal SAR1B gene protein coding sequence. *Orphanet J Rare Dis*; 2011. p. 78.
- [572] Sue N, Jack BH, Eaton SA, Pearson RC, Funnell AP, Turner J, et al. Targeted disruption of the basic Kruppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2008;28:3967-3978.
- [573] Bell-Anderson KS, Funnell AP, Williams H, Mat Jusoh H, Scully T, Lim WF, et al. Loss of Kruppel-like factor 3 (KLF3/BKLF) leads to upregulation of the insulin-sensitizing factor adipolin (FAM132A/CTRP12/C1qdc2). *Diabetes* 2013;62:2728-2737.
- [574] Hrizo SL, Gusarova V, Habel DM, Goeckeler JL, Fisher EA, Brodsky JL. The Hsp110 molecular chaperone stabilizes apolipoprotein B from endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). *J Biol Chem* 2007;282:32665-32675.
- [575] Magne J, Aminoff A, Perman Sundelin J, Mannila MN, Gustafsson P, Hultenby K, et al. The minor allele of the missense polymorphism Ser251Pro in perilipin 2 (PLIN2) disrupts an alpha-helix, affects lipolysis, and is associated with reduced plasma triglyceride concentration in humans. *FASEB J* 2013;27:3090-3099.
- [576] Liu H, Labour C, Xu CF, Ferrell R, Lins L, Brasseur R, et al. Characterization of the lipid-binding properties and lipoprotein lipase inhibition of a novel apolipoprotein C-III variant Ala23Thr. *J Lipid Res* 2000;41:1760-1771.
- [577] Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* 2008;322:1702-1705.
- [578] von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1991;87:1724-1731.
- [579] Peterson J, Ayyobi AF, Ma Y, Henderson H, Reina M, Deeb SS, et al. Structural and functional consequences of missense mutations in exon 5 of the lipoprotein lipase gene. *J Lipid Res* 2002;43:398-406.
- [580] Blackett P, Tryggestad J, Krishnan S, Li S, Xu W, Alaupovic P, et al. Lipoprotein abnormalities in compound heterozygous lipoprotein lipase deficiency after treatment with a low-fat diet and orlistat. *J Clin Lipidol* 2013;7:132-139.
- [581] Emi M, Wilson DE, Iverius PH, Wu L, Hata A, Hegele R, et al. Missense mutation (Gly----Glu188) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency. *J Biol Chem* 1990;265:5910-5916.
- [582] Gin P, Beigneux AP, Davies B, Young MF, Ryan RO, Bensadoun A, et al. Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:1464-1468.
- [583] Wang J, Hegele RA. Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPI-HBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650). *Lipids Health Dis* 2007;6:23.
- [584] Chan LY, Lam CW, Mak YT, Tomlinson B, Tsang MW, Baum L, et al. Genotype-phenotype studies of six novel LPL mutations in Chinese patients with hypertriglyceridemia. *Hum Mutat* 2002;20:232-233.
- [585] Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, Bujo H, Takahashi K, Saito Y, et al. Mutations in Japanese subjects with primary hyperlipidemia--results from the Research Committee of the Ministry of Health and Welfare of Japan since 1996. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:131-145.
- [586] Henderson H, Leisegang F, Hassan F, Hayden M, Marais D. A novel Glu421Lys substitution in the lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced hypertriglyceridemic pancreatitis. *Clin Chim Acta* 1998;269:1-12.
- [587] Murase T, Ebara T, Okubo M. Lipoprotein lipase activity in heterozygotes for lipoprotein lipase gene mutations reveals a gender bias. *Ann Clin Biochem* 2014;51:294-297.
- [588] Sun G, Bi N, Li G, Zhu X, Zeng W, Wu G, et al. Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids* 2006;143:22-28.
- [589] Okubo M, Ishihara M, Iwasaki T, Ebara T, Aoyama Y, Murase T, et al. A novel APOA5 splicing mutation IVS2+1g>a in a Japanese chylomicronemia patient. *Atherosclerosis* 2009;207:24-25.
- [590] Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res* 1996;37:2627-2637.
- [591] Dussallant C, Serrano V, Maiz A, Eyheramendy S, Cataldo LR, Chavez M, et al. APOA5 Q97X mutation identified through homozygosity mapping causes severe hypertriglyceridemia in a Chilean consanguineous family. *BMC Med Genet* 2012;13:106.
- [592] Henderson HE, Hassan F, Marais D, Hayden MR. A new mutation destroying disulphide bridging in the C-terminal domain of lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:189-194.
- [593] Rios JJ, Shastri S, Jasso J, Hauser N, Garg A, Bensadoun A, et al. Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. *J Inher Metab Dis* 2012;35:531-540.
- [594] Han DH, Moh IH, Kim DM, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, et al. Gestational hyperlipidemia and acute pancreatitis with underlying partial lipoprotein lipase deficiency and apolipoprotein E3/E2 genotype. *Korean J Intern Med* 2013;28:609-613.
- [595] Yamada N, Murase T. Modulation, by apolipoprotein E, of lipoprotein lipase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:710-715.
- [596] McConathy WJ, Wang CS. Inhibition of lipoprotein lipase by the receptor-binding domain of apolipoprotein E. *FEBS Lett* 1989;251:250-252.

- [597] Rensen PC, van Berkel TJ. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1996;271:14791-14799.
- [598] Borensztajn J, Kotlar TJ, Matza CA. Heparin-binding apoproteins. Effects on lipoprotein lipase and hepatic uptake of remnants. *Biochem J* 1986;233:909-912.
- [599] van Barlingen HH, de Jong H, Erkelens DW, de Bruin TW. Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J Lipid Res* 1996;37:754-763.
- [600] Weisgraber KH, Rall SC, Jr., Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, Sparrow JT. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem* 1986;261:2068-2076.
- [601] Seip RL, Zoeller RF, Angelopoulos TJ, Salonia J, Bilbie C, Moyna NM, et al. Interactive effects of APOE haplotype, sex, and exercise on postheparin plasma lipase activities. *J Appl Physiol* (1985) 2011;110:1021-1028.
- [602] Coca-Prieto I, Valdivielso P, Olivecrona G, Ariza MJ, Rioja J, Font-Ugalde P, et al. Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2009;9:46.
- [603] Brunzell JD, Chait A, Nikkila EA, Ehnholm C, Huttunen JK, Steiner G. Heterogeneity of primary lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism* 1980;29:624-629.
- [604] Pruneta V, Autran D, Ponsin G, Marcais C, Duvillard L, Verges B, et al. Ex vivo measurement of lipoprotein lipase-dependent very low density lipoprotein (VLDL)-triglyceride hydrolysis in human VLDL: an alternative to the postheparin assay of lipoprotein lipase activity? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:797-803.
- [605] Pruneta-Deloche V, Sassolas A, Dallinga-Thie GM, Berthezene F, Ponsin G, Moulin P. Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes. *J Lipid Res* 2004;45:859-865.
- [606] de Man FH, de Beer F, van der Laarse A, Smelt AH, Havekes LM. Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 1997;38:2465-2472.
- [607] Shirodkar AV, Marsden PA. Epigenetics in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2011;26:209-215.