

Université de Montréal

**Identification de biomarqueurs de risque à la
pancréatite aigüe récurrente dans
l'hyperchylomicronémie familiale**

par

Camélia Dubois-Bouchard

Département des Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

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

Décembre, 2014

© Camélia Dubois-Bouchard, 2014

Résumé

L'hyperchylomicronémie familiale est un trait monogénique caractérisé par un taux de triglycérides plasmatiques à jeun supérieur à 10 mmol/L (la normale étant de 1,7 mmol/L). L'hyperchylomicronémie familiale est le plus souvent causée par une déficience dans le gène *LPL*. La déficience en lipoprotéine lipase (LPLD) est aussi associée à un risque élevé de pancréatite. La pancréatite en soi est reconnue comme un trait complexe génétique dont plusieurs gènes sont associés à sa susceptibilité. Étant donné l'expression variable de la pancréatite chez les patients LPLD, les résultats de ce mémoire présentent certains facteurs génétiques pouvant être responsables du risque de l'expression de la pancréatite aiguë récurrente chez les sujets LPLD.

L'analyse par séquençage des régions codantes et promotrices des gènes *CTRC* (pour « *Chymotrypsin C* ») et *SPINK1* (pour « *Serine protease inhibitor Kazal type 1* ») a été effectuée chez 38 patients LPLD et 100 témoins. Ces deux gènes codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des protéases au niveau du pancréas et ont déjà été associés avec la pancréatite dans la littérature. Notre étude a permis d'identifier une combinaison de deux polymorphismes (*CTRC*-rs545634 et *SPINK1*-rs11319) associée significativement avec la récurrence d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour pancréatite aiguë récurrente chez les patients LPLD ($p < 0,001$).

Ces résultats suggèrent que le risque de récurrence de pancréatite chez les patients LPLD peut être influencé par des variants dans des gènes de susceptibilité à la pancréatite. L'identification de biomarqueurs génétiques améliore la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la pancréatite chez les patients LPLD ce qui, par conséquent, permet de mieux évaluer et caractériser les risques de pancréatite afin d'adapter un plan d'intervention préventif pour ces patients.

Mots-clés : Lipoprotéine lipase, hyperchylomicronémie familiale, déficience en lipoprotéine lipase (LPLD), hypertriglycéridémie sévère, pancréatite, *CTRC*, *SPINK1*, biomarqueurs génétiques

Abstract

Familial hyperchylomicronemia is a monogenic trait characterized by an increased fasting plasma triglyceride levels ≥ 10 mmol/L (normal is 1.7 mmol/L). Familial hyperchylomicronemia is most often caused by a deficiency in the *LPL* gene. Lipoprotein lipase deficiency (LPLD) is also associated with an increased risk of pancreatitis. Pancreatitis is recognized as a complex genetic trait and several genes are associated with its susceptibility. Considering the variable expression of pancreatitis in LPLD patients, results of this manuscript demonstrate that genetic factors may be responsible of the increased risk of recurrent acute pancreatitis episodes in LPLD subjects.

The sequencing analysis of the coding and promoters regions of *CTRC* gene (for *Chymotrypsin C*) and *SPINK1* gene (for *Serine protease inhibitor Kazal type 1*) was performed. These two genes encode proteins involved in the metabolism of the pancreas proteases and have been associated with pancreatitis in literature. A combination of two polymorphisms (*CTRC*-rs545634 and *SPINK1*-rs11319) have been identified and associated with recurrent hospitalizations for severe abdominal pain or recurrent acute pancreatitis in LPLD patients ($p < 0.001$).

These results suggest that the risk of recurrent episodes of pancreatitis in LPLD patients may be influenced by variants in susceptibility genes. The identification of genetic biomarkers improves the understanding of the pathophysiological mechanisms of pancreatitis in LPLD patients which therefore helps to assess and characterize the risk of pancreatitis to adapt preventive intervention plan for these patients.

Keywords: Lipoprotein lipase, familial hyperchylomicronemia, lipoprotein lipase deficiency (LPLD), severe hypertriglyceridemia, pancreatitis, *CTRC* gene, *SPINK1* gene, genetic biomarkers

Table des Matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des Matières	iii
Liste des Tableaux.....	vi
Liste des Figures.....	vii
Liste des Abréviations	viii
Remerciements	xi
Chapitre I : Introduction	2
1.1 Les lipoprotéines	2
1.2 Le métabolisme lipides-lipoprotéines.....	3
1.3 Les dyslipoprotéïnémies	3
1.4 L'hypertriglycémie	4
Chapitre II : L'hyperchylomicronémie familiale.....	6
2.1 Épidémiologie	6
2.2 Étiologie.....	7
2.2.1 <i>La lipoprotéine lipase</i>	7
2.2.2 <i>La régulation de la lipoprotéine lipase</i>	10
2.2.3 <i>La déficience en lipoprotéine lipase</i>	12
2.3 Manifestations cliniques et risques pour la santé.....	13
2.4 Les traitements	15
Chapitre III : La pancréatite	17
3.1 Épidémiologie	17
3.2 Physiopathologie	18
3.3 Classification.....	21
3.3.1 <i>Pancréatite aiguë</i>	21
3.3.2 <i>Pancréatite chronique</i>	22
3.3.3 <i>Pancréatite aiguë récurrente</i>	23
3.4 Génétique de la pancréatite.....	23

3.4.1 <i>CTRC</i>	24
3.4.2 <i>SPINK1</i>	24
3.4.3 <i>PRSSI et PRSS2</i>	25
3.4.4 <i>CASR</i>	26
3.4.5 <i>CFTR</i>	26
3.4.6 <i>CLDN2</i>	27
Chapitre IV : Problématique	32
Chapitre V: Hypothèse et objectif de recherche	34
5.1 Hypothèse.....	34
5.2 Objectif.....	34
Chapitre VI : Approche méthodologique	35
6.1 Échantillonnage.....	35
6.2 Séquençage.....	36
6.3 Analyses statistiques.....	37
Chapitre VII : Article	39
7.1 Avant-propos.....	39
7.2 Résumé.....	41
7.3 Abstract.....	42
7.4 Introduction.....	43
7.5 Materials and methods.....	46
7.5.1 <i>Subjects</i>	46
7.5.2 <i>CTRC and SPINK1 Sequencing</i>	46
7.5.3 <i>Statistical Analyses</i>	50
7.6 Results.....	51
7.7 Discussion.....	57
7.8 Author contributions.....	61
7.9 Acknowledgments.....	62
7.10 References.....	63

Chapitre VIII : Discussion générale	68
8.1 Retombées de l'étude.....	69
8.2 Forces et limites de l'étude	73
8.3 Perspectives.....	74
8.3.1 <i>Validation et réplication</i>	74
8.3.2 <i>Études de nouveaux gènes candidats</i>	74
8.3.3 <i>Études génomiques</i>	78
8.3.4 <i>Étude de l'histoire familiale</i>	78
8.3.5 <i>Études fonctionnelles</i>	79
8.4 Applications cliniques potentielles.....	79
Conclusion	80
Références.....	81

Liste des Tableaux

Tableau I. Certains variants associés avec une perturbation dans l'expression et l'activité de la lipoprotéine lipase.	13
Tableau II. Caractéristiques et polymorphismes connus dans la littérature et risques associés pour sept gènes de susceptibilité à la pancréatite.....	28
Table III. <i>CTRC and SPINK1 Sequencing Oligonucleotides and PCR Conditions</i>	48
Table IV. <i>Characteristics of the Participants</i>	53
Table V. <i>Genetic Characteristics of the CTRC and SPINK1 Variants Identified</i>	55
Table VI. <i>CTRC and SPINK1 Mutant Genotypes Distribution Among Subject Studied Groups</i>	56
Table VII. <i>Association of CTRC and SPINK1 SNPs Combination and Family History with Recurrence (≥ 5) of Hospitalizations for Pancreatitis in Severe Hypertriglyceridemia due to LPLD</i>	56
Tableau VIII. Gènes associés avec une susceptibilité ou une protection à la pancréatite aiguë, chronique ou récurrente selon la littérature.	75

Liste des Figures

Figure 1. Transport des triglycérides par la voie exogène (par les chylomicrons) ou par la voie endogène (par les VLDL).	9
Figure 2. Mécanisme en condition normale du trypsinogène et des enzymes de digestion.	20
Figure 3. Représentation schématique du mécanisme de la pancréatite induite par une hyperchylomicronémie.	31
Figure 4. Arbre généalogique d'une famille avec hyperchylomicronémie familiale causée par une déficience en lipoprotéine lipase.....	32
Figure 5: <i>Schematic representation of the LPL, CTRC and SPINK1 genes structure.</i>	49
Figure 6. Implication potentielle de CTRC et de SPINK1 dans la voie des protéases.	72

Liste des Abréviations

AAT	<i>Alpha(1)-antitrypsin</i>
ABCG	ATP-binding cassette sub-family G
AGL	Acide gras libre
AAV1-LPLS447X	Alipogene Tiparvovec
AMP	Adénosine monophosphate
ANGPTL	<i>Angiopoietin-like protein</i>
apo	Apolipoprotéine
apoAV	Apolipoprotéine AV
apoCI	Apolipoprotéine CI
apoCII	Apolipoprotéine CII
apoCIII	Apolipoprotéine CIII
apoE	Apolipoprotéine E
Ca ²⁺	Calcium ionique
CASR	<i>Calcium-sensing receptor</i>
Cellules PP	Cellules à polypeptides pancréatiques
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CFTR	<i>Cystis fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cl ⁻	Ions chlorure
CLDN2	<i>Claudin 2</i>
CM	Chylomicrons
CTRC	<i>Chymotrypsin C</i>
DGAT-1	<i>Diacylglycerol acyltransferase 1</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EI	Entérocytes intestinales;
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
GPIHBP1	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1</i>
HCO ³⁻	Ions biocarbonate
HDL	Lipoprotéine de haute densité

HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i>
hyperTG	Hypertriglycémie
IC	Intervalle de confiance
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IP3	Inositol (1, 4, 5)-triphosphate
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDLR	Récepteur des LDL
LMF1	Facteur de maturation des lipases 1
LP	Lipides
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine lipase
LPLD	Déficience en lipoprotéine lipase
MCT	<i>Medium-chain triglyceride</i>
MCV	Maladie cardiovasculaire
MORC4	<i>MORC family CW-type zinc finger 4</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pancréatite aigüe
PAR	Pancréatite aigüe récurrente
PC	Pancréatite chronique
PI	Pancréatite idiopathique
PRSS1	<i>Protease, serine, 1 (trypsin 1)</i>
PRSS2	<i>Protease, serine, 2 (trypsin 2)</i>
PTH	Hormone parathyroïde
RE	Réticulum endoplasmique
RIA	Réponse inflammatoire aigüe
SLSJ	Saguenay–Lac-Saint-Jean
SPINK1	<i>Serine peptidase inhibitor Kazal type 1</i>
TG	Triglycérides
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

*À la mémoire de mon frère,
qui est parti trop tôt...*

Remerciements

L'écriture d'un mémoire pour un étudiant en recherche ne se fait pas sans l'aide précieuse de plusieurs collaborateurs, collègues et amis. Il serait donc impossible de commencer ce mémoire sans en remercier les principaux acteurs qui m'ont permis d'en arriver à ce travail final.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Daniel Gaudet, ainsi que ma codirectrice, Dre Karine Tremblay. Ils ont travaillé de pair afin de m'aider tout au long de mon cheminement. Ils m'ont donné tous les outils nécessaires à ma réussite et je leur en serai éternellement reconnaissante. Karine, tu m'as fait confiance et tu m'as soutenue dans toutes les épreuves que j'ai eu à faire face durant les deux dernières années. Tu as toujours été très honnête et généreuse de ton temps. Merci mille fois!

Je voudrais également remercier tout le personnel de recherche avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mes études, merci à Simon-Pierre Guay, Andrée-Anne Houde, Nadia Mior, Sébastien Claveau, Denise Morin, Nancy Tremblay, Véronique Desgagné, Jocelyn Lambert, Maxime Dumont, Daniel Rivard, Cécilia Légaré et Sandra Côté. En arrivant dans cette belle et grande équipe, je me suis sentie tout de suite à ma place et j'ai adoré pouvoir collaborer avec vous. Vous resterez des amis sur qui je pourrai toujours compter avec une bonne humeur contagieuse. Merci de m'avoir appris beaucoup plus que ce que je croyais pouvoir réaliser durant ma maîtrise.

Merci aussi à toute l'équipe de CORAMH, Sophie, Annie et Marie-Hélène, qui m'ont donné une chance incroyable afin de travailler dans mon domaine. Elles m'ont encouragé à terminer mes études et ce, depuis plus d'un an.

Je ne pourrais terminer sans dire un merci à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenu tout au long de mes études et un merci tout spécial à mon conjoint, ami, amoureux, Michaël, qui me soutient depuis le tout début de mes études post secondaires. Jamais je ne me serais rendu aussi loin si tu n'avais pas été présent. Encore aujourd'hui tu me montres à quel point tu es fier de moi et j'espère que tu le seras encore pour plusieurs années. C'est extrêmement important pour moi!

Chapitre I : Introduction

L'hyperchylomicronémie familiale est une forme de dyslipoprotéïnémie. Il s'agit d'une maladie orpheline rare et peu documentée. Même si peu de personnes dans le monde en sont affectées, plusieurs efforts de recherche sont concentrés sur cette maladie. De plus, la prise en charge des patients qui en sont atteints est complexe et les symptômes et les risques pour la santé sont très variables d'une personne à l'autre. Il est donc primordial d'en apprendre davantage sur cette maladie afin de prévenir l'apparition et la récurrence de la complication la plus importante associée à cette condition qui est la pancréatite et ses conséquences néfastes sur la santé des individus. Avant d'élaborer plus amplement sur la pancréatite, le présent chapitre propose une revue de littérature sur les lipoprotéines et leur mécanisme afin de mieux comprendre leurs rôles physiopathologiques. Cela servira d'entrée en matière pour la compréhension des dyslipoprotéïnémies en général. L'hyperchylomicronémie familiale sera détaillée plus spécifiquement dans le chapitre 2 et la problématique associée à la pancréatite sera exposée dans le chapitre 3. Finalement, la question de recherche soulevée par la problématique (chapitre 4) s'est traduite en objectifs (chapitre 5) du présent projet de maîtrise dont la méthode (chapitre 6) et les résultats ont été publiés sous forme d'article scientifique dans le chapitre 7. Le chapitre 8 présente une discussion générale des résultats obtenus et le mémoire se termine par une brève conclusion (chapitre 9).

1.1 Les lipoprotéines

Les lipides sont des molécules insolubles dans l'eau et essentielles tant au niveau de la production d'énergie que pour la fabrication de certaines substances ou structures [1]. Les lipides plasmatiques les plus fréquents sont le cholestérol et les triglycérides (ou triacylglycérols), mais les phospholipides et les polyisoprénoïdes sont aussi des lipides ayant des rôles significatifs comme constituants des membranes cellulaires ou encore dans la signalisation cellulaire [1]. En bref, le cholestérol est le prédecesseur des acides biliaires, des stéroïdes, de certaines vitamines liposolubles et participe également à la synthèse et à la préservation de l'intégrité des membranes cellulaires, alors que les triglycérides sont des lipides

servant principalement de réserve d'énergie dans le tissu adipeux, ou en tant que source d'énergie, lorsqu'ils sont utilisés par les muscles [2]. Les triglycérides sont formés de trois molécules d'acides gras et d'une molécule de glycérol et ils seront davantage explorés dans ce mémoire étant donné qu'ils sont impliqués directement dans l'hyperchylomicronémie familiale.

Les lipides sont transportés dans la circulation sanguine au moyen des lipoprotéines. Ces dernières sont des agrégats de lipides et d'apolipoprotéines (apo) positionnés sous forme de sphère [3]. Les apo sont en fait des protéines nécessaires à la structure des lipoprotéines ainsi qu'à leur solubilité. De plus, elles peuvent agir à titre de cofacteurs ou d'inhibiteurs lors de réactions enzymatiques ou comme récepteurs cellulaires.

Il existe six classes de lipoprotéines qui sont définies selon leurs propriétés physiques et chimiques avec leur composition en lipides et en apo propres à chacune d'elles [4]. Il s'agit des chylomicrons, des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), des lipoprotéines de faible densité (LDL), des lipoprotéines de haute densité (HDL) et de la lipoprotéine (a) [Lp(a)]. De façon générale, lorsque la teneur en triglycérides est importante, la densité de la lipoprotéine sera moindre, alors que plus elle contient d'apoprotéines, plus la densité sera grande [3]. Les chylomicrons, qui sont les lipoprotéines les plus grosses et les moins denses, ainsi que les VLDL sont des lipoprotéines riches en triglycérides et faible en cholestérol [5]. Ils sont synthétisés soit par les entérocytes dans le cas des chylomicrons ou par les cellules hépatiques pour les VLDL [5]. Les IDL ont un contenu semblable en triglycérides et en cholestérol, ils sont d'ailleurs produits à partir des VLDL à mesure que les triglycérides des VLDL seront hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). Les LDL proviennent des IDL et sont formés d'environ 70% de cholestérol, alors que les HDL sont d'origine hépatique ou plasmatique et sont composés de 50% de cholestérol et de 50% d'apoprotéines [3]. La Lp(a), quant à elle, transporte en grande partie du cholestérol et est caractérisée par l'apo (a) [6]. Les lipoprotéines sont donc des vésicules de transport extrêmement importantes pour le métabolisme des lipides.

1.2 Le métabolisme lipides-lipoprotéines

Le métabolisme lipides-lipoprotéines fait intervenir trois voies métaboliques importantes au niveau de l'élimination, de la synthèse et de la récupération des lipides à partir de leur ingestion jusqu'à leur utilisation ou leur excrétion. La voie exogène est celle qui implique le transport des lipides provenant de l'alimentation vers la circulation via les chylomicrons jusqu'au foie ou vers les différents tissus [7, 8]. La voie endogène est, quant à elle, un processus impliquant la formation de lipides par le foie et leur acheminement vers les tissus de l'organisme, en général, via les VLDL [8, 9]. La LPL, une enzyme-clé dans ces deux voies métaboliques, sert à l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les chylomicrons ou les VLDL [7]. La régulation de la LPL est un mécanisme complexe qui sera abordé dans le deuxième chapitre. La voie du transport à rebours du cholestérol implique les HDL qui récupèrent le cholestérol libre des surfaces cellulaires pour que celui-ci soit éliminé par le foie [10]. Ce cholestérol peut aussi être transféré vers les VLDL ou les chylomicrons en échange de triglycérides [10]. Une perturbation dans l'une ou l'autre de ces voies peut provoquer des taux irréguliers de lipides et/ou de lipoprotéines en circulation causant, notamment, des dyslipoprotéinémies. Une augmentation du taux de lipoprotéines par rapport à la normal est nommée une hyperlipoprotéinémie et une diminution est une hypolipoprotéinémie.

1.3 Les dyslipoprotéinémies

Les dyslipoprotéinémies sont des perturbations des taux de lipoprotéines en circulation. Elles sont souvent reliées à certains facteurs tels que l'obésité abdominale ou le diabète.

Les causes des dyslipoprotéinémies sont soit génétiques (un ou plusieurs gènes défectueux), environnementales (alimentation, sédentarité, tabagisme, alcool, etc.) ou une association entre ces deux facteurs [11]. En effet, la majorité des cas de dyslipoprotéinémies comporte, avant tout, une prédisposition génétique (forme primaire) à laquelle s'ajoutent un ou des facteurs environnementaux (forme secondaire). Des classifications ont été élaborées pour faciliter le diagnostic de ces dyslipoprotéinémies, comme la classification phénotypique décrite par Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS en 1967 [12]; elle est basée sur le taux de cholestérol, de

triglycérides plasmatiques, l'aspect général du plasma ainsi que sur le profil électrophorétique des lipoprotéines. Certaines hyperlipoprotéïnémies impliquent parfois une augmentation du cholestérol (les hypercholestérolémies), une augmentation des triglycérides [les hypertriglycéridémies (hyperTG)] ou encore une augmentation de ces deux types de lipides, tandis que le taux de lipoprotéines sera différemment modulé en fonction du type de la dyslipoprotéïnémie. L'hypercholestérolémie et l'hyperTG sont connues comme étant des facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire (MCV) [13-15]. L'hyperTG, particulièrement l'hyperTG sévère, est également un facteur de risque associé à d'autres comorbidités détaillées dans la prochaine section.

1.4 L'hypertriglycéridémie

Dans la majorité des cas, une hyperTG est définie lorsqu'un taux de triglycérides plasmatiques à jeun est supérieur à 1,7 mmol/L [16], lors d'une hyperTG moyenne le taux de triglycéride se situe entre 1,7 et 2,3 mmol/L, lors d'une hyperTG modérée, les triglycérides sont entre 2,3 et 11,2 mmol/L, dans une hyperTG sévère les triglycérides sont entre 11,2 et 22,4 mmol/L et lors d'une hyperTG très sévère le taux de triglycéride est supérieur à 22,4 mmol/L [19, 20]. Toutefois, selon certaines classifications, l'hyperTG sévère se définit lorsque le taux de triglycérides est supérieur à 10 mmol/L [11]. L'hyperTG est une dyslipoprotéïnémie en forte augmentation principalement dans le monde occidental dû à l'endémisation du diabète et de l'obésité [16]. Une personne sur 600 exprimerait une hyperTG sévère en Amérique du Nord [17]. De plus, selon une étude effectuée sur 5610 participants aux États-Unis de 1999 à 2004, 33% de ces participants avaient une concentration de triglycérides supérieure à 1,7 mmol/L, alors que plus de la moitié d'entre eux se situait au-dessus de 2,2 mmol/L [18].

Selon l'étude « *Framingham Heart Study* », les individus avec une triglycéridémie supérieure à 1,7 mmol/L et un niveau de HDL-cholestérol sous 1,03 mmol/L ont un risque augmenté de maladie coronarienne athérosclérotique [22]. En plus d'avoir une association avec la MCV, l'hyperTG est également impliquée dans l'augmentation du risque d'épisodes de pancréatites [23]. D'autres causes plus complexes ont été aussi associées avec l'hyperTG secondaire tel que l'hypothyroïdisme, une maladie rénale au stade final, le syndrome néphrotique ou encore une

infection au virus à immunodéficience [24]. La prise de médicaments et/ou de drogues en grande quantité et une alimentation riche en hydrates de carbone sont aussi des causes secondaires pouvant entraîner une hyperTG [25]. Selon le degré d'augmentation des triglycérides en circulation, l'hyperTG sévère est parfois caractérisée par des xanthomes, une rétine lipémique, des douleurs abdominales sévères et/ou une hépatosplénomégalie [25].

Les causes de l'hyperTG primaire peuvent être le résultat d'un problème génétique soit au niveau de la voie exogène et/ou de la voie endogène du métabolisme des triglycérides. L'hyperchylomicronémie familiale (dyslipoprotéinémie de Type I selon la classification de Fredrickson [OMIM: 238600]) et l'hypertriglycémie endogène (dyslipoprotéinémie de Type V selon la classification de Fredrickson [OMIM: 144650]) sont les deux dyslipoprotéinémies caractérisées par une hyperTG sévère. L'hyperchylomicronémie familiale est causée dans la majorité des cas par un défaut dans le gène de la *LPL* ou dans d'autres gènes impliqués dans cette même voie métabolique. Le risque pour la santé le plus important chez ses individus est l'expression de la pancréatite et de sa récurrence [26]. Quant à l'hyperlipoprotéinémie de type V, elle est associée, non seulement avec une susceptibilité génétique, mais additionnée à un ou des facteurs environnementaux, tels qu'une consommation excessive d'alcool, un diabète de type 2, la prise d'estrogène ou de stéroïdes, ou encore la prise de certains médicaments antihypertenseurs comme des diurétiques ou des β -bloquants [27]. Dans cette étude, c'est l'hyperchylomicronémie familiale qui est le centre de nos recherches et elle sera décrite dans le prochain chapitre.

Chapitre II : L'hyperchylomicronémie familiale

L'hyperchylomicronémie familiale est essentiellement de cause génétique. Les gènes connus ayant déjà été associés avec l'hyperchylomicronémie familiale sont les gènes codant pour la LPL, pour l'apolipoprotéine CII (apoCII), pour l'apolipoprotéine AV (apoAV), pour la protéine GPIHBP1 (pour « *glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1* ») ou pour la protéine LMF1 (pour « *lipase maturation factor 1* ») [28]. L'hyperchylomicronémie familiale est une maladie rare se transmettant sur un mode autosomique récessif et caractérisée par une triglycémie à jeun supérieure à 10 mmol/L pouvant entraîner plusieurs complications. Dans les prochaines sections de ce chapitre, l'épidémiologie et l'étiologie de cette maladie seront décrites en détail, mais l'emphase sera sur la déficience en LPL (LPLD pour « *lipoprotein lipase deficiency* »).

2.1 Épidémiologie

L'hyperchylomicronémie familiale est une maladie orpheline qui touche environ une à deux personnes par million d'habitants dans le monde [29]. Cette prévalence peut toutefois s'élever jusqu'à une personne atteinte sur 5000 dans certaines régions du monde, comme dans certaines régions de l'Afrique, de l'Inde [30] ou encore dans la population des régions de Charlevoix et du Saguenay–Lac-St-Jean (SLSJ) [31, 32]. Au SLSJ, cette prédominance s'expliquerait par un phénomène sociodémographique appelé effet fondateur qui touche cette population Canadienne-Française du Nord-Est de la province de Québec [33]. On estime qu'il y aurait jusqu'à une personne sur 35 qui serait porteuse d'un allèle délétère dans le gène de la *LPL* [34]. Dans la population Nord-Américaine, le nombre de patients touchés par l'hyperchylomicronémie familiale avec des triglycides plasmatiques au-dessus de 10 mmol/L est estimé à environ 150 à 400 personnes par 100 000 habitants [35].

2.2 Étiologie

L'hyperchylomicronémie familiale est, dans la plupart des cas, causée par une déficience complète de la LPL [28]. Pour bien comprendre les causes et les facteurs de l'hyperchylomicronémie familiale, il faut, tout d'abord, bien comprendre le mécanisme impliquant la LPL, cette enzyme clé dans le processus de l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL. Les prochaines sous-sections se concentreront donc sur les caractéristiques de la LPL, ainsi que sur sa régulation et toutes les protéines qui sont impliquées dans ce mécanisme.

2.2.1 *La lipoprotéine lipase*

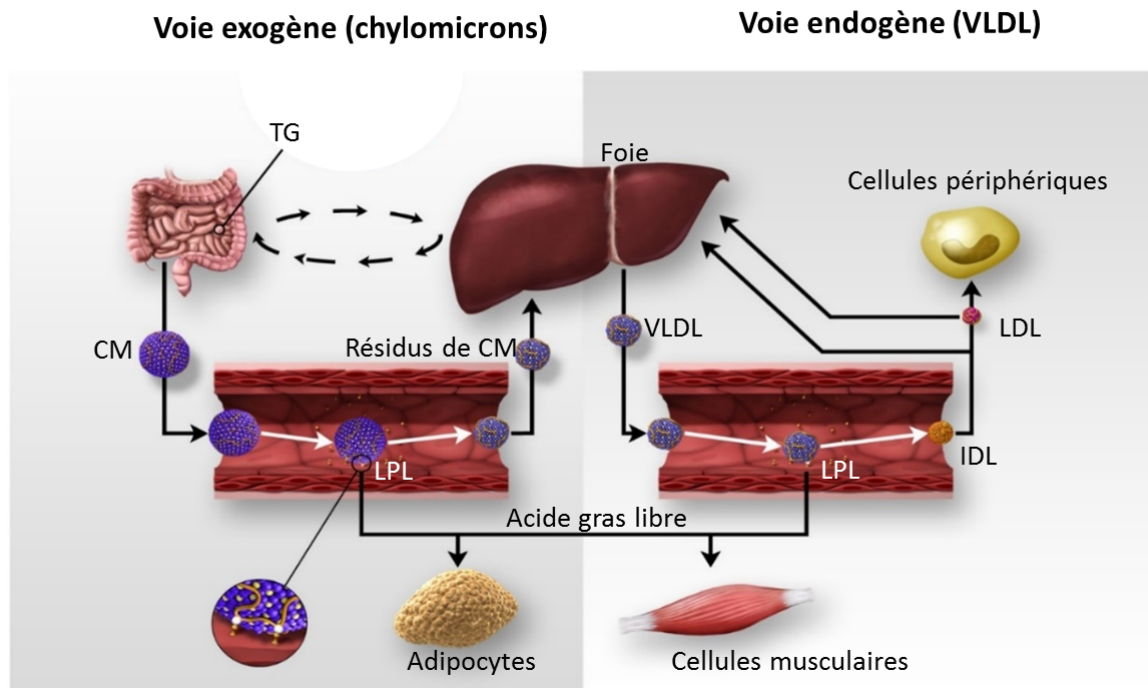
La LPL joue un rôle très important dans le métabolisme lipides-lipoprotéines. Cette protéine, qui contient 448 acides aminés, est produite majoritairement dans les cellules du parenchyme, principalement dans les myocytes et les adipocytes [36, 37]. La LPL est, en fait, composée de deux sous-unités de 55 kDa chacun qui sont reliées entre elles pour former un homodimère [36]. La LPL se retrouve sous forme de dimère lorsqu'elle est activée. En conditions déstabilisantes, tel qu'une diminution du pH, une augmentation de la température ou une diminution de la concentration en sels, les dimères se dissocient pour former des monomères, c'est dans ce cas que la LPL devient inactive [38, 39]. Ce mécanisme sert normalement à la régulation du métabolisme des triglycérides.

La partie N-terminal de la protéine est le site actif de l'enzyme qui sert à hydrolyser les lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL), alors que la portion C-terminal est nécessaire à l'ancrage de l'enzyme à l'endothélium. Suite à la transcription du gène dans le noyau des cellules du parenchyme, la LPL sera traduite, mais sera sous forme inactive dans le réticulum endoplasmique rugueux. Elle sera, par la suite, N-glycosylée (ajout d'une molécule de glucide sur une asparagine) et transportée vers l'appareil de Golgi, c'est à cet endroit qu'elle sera dimérisée [40]. La LPL sera donc emmagasinée dans les vésicules formées par l'appareil de Golgi et elle sera soit dégradée par les lysosomes, soit transloquée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux adjacents aux tissus adipeux et aux tissus musculaires [41, 42].

L'AMP (pour « *adénosine monophosphate* ») cyclique est impliquée dans cette translocation, mais le processus complet n'est pas encore tout à fait bien élucidé [43]. À la surface de ces cellules endothéliales, la LPL est liée par son domaine C-terminal héparine chargée positivement aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs pour « *heparan sulfate proteoglycans* »), une glycoprotéine présente dans la membrane plasmique des cellules endothéliales [44]. Lors d'une injection intraveineuse d'héparine, la liaison entre le domaine héparine de la LPL et les HSPG des cellules endothéliales est déstabilisée et il y a libération de la LPL dans le plasma. Avec cette méthode, il est possible de récupérer la LPL en circulation et de mesurer sa masse et son activité. [44].

Pour bien comprendre le mécanisme d'action de la LPL, il faut d'abord prendre connaissance du métabolisme des triglycérides, des lipoprotéines et des autres acteurs impliqués. Tout d'abord, les triglycérides provenant de l'alimentation sont dégradés dans l'intestin puis rassemblés sous forme de micelles pour pouvoir être absorbés par les cellules entérocytes de l'intestin. À l'intérieur de ces entérocytes, ils sont synthétisés en triglycérides et empaquetés dans les chylomicrons qui les libèrent dans la circulation sanguine [45]. Les triglycérides, de source endogène, sont synthétisés dans le foie et transportés dans la circulation via les VLDL [45]. Que les triglycérides soient transportés par les chylomicrons ou par les VLDL, ils seront ensuite hydrolysés par la LPL, ancrés aux cellules endothéliales, afin de libérer les acides gras libres (AGL) et le glycérol [46]. Ce dernier, qui est libre dans le plasma, sera récupéré par le foie ou le tissu adipeux pour être réestérifié en triglycérides [47]. Les AGL seront transférés, avec l'aide de la protéine de surface CD36 (pour « *Cluster of Differentiation 36* ») des cellules endothéliales, vers les tissus appropriés pour fournir de l'énergie aux cellules musculaires et cardiaques ou d'être réestérifiés en triglycérides pour le stockage dans les adipocytes [48]. Les résidus de chylomicrons, résultant du procédé, seront ensuite acheminés vers les cellules hépatiques où un récepteur de surface reconnaîtra les résidus de chylomicrons grâce à leur apolipoprotéine E (apoE), ce qui permettra leur internalisation et leur métabolisation par le foie [49]. La Figure 1 illustre l'ensemble du processus. Normalement, après un jeûne de 12 heures, les chylomicrons et les résidus de chylomicrons devraient être totalement éliminés de la circulation [45]. Si un défaut dans le fonctionnement de la LPL survient, les chylomicrons ne seront pas hydrolysés adéquatement. Conséquemment, les résidus de chylomicrons ne seront

pas formés et ne pourront être dégradés dans le foie. Les chylomicrons s'accumuleront donc dans la circulation sanguine résultant l'état d'hyperchylomicronémie.



© Gagné et Gaudet, 2007 [34]. Reproduit avec permission.

Figure 1. Transport des triglycérides par la voie exogène (par les chylomicrons) ou par la voie endogène (par les VLDL).

Dans la voie exogène, les triglycérides provenant de l'alimentation seront mis en circulation via les chylomicrons (CM). La lipoprotéine lipase (LPL) hydrolysera les triglycérides (TG) contenus dans les CM afin de libérer les acides gras libres et le glycérol qui seront envoyés vers les adipocytes ou les cellules musculaires. Les résidus de chylomicrons seront quant à eux, réacheminés vers le foie pour leur récupération.

Dans la voie endogène, les triglycérides synthétisés par le foie seront mis en circulation via les lipoprotéines de très faible densité (VLDL). La LPL va hydrolyser les triglycérides des VLDL, alors que ces derniers se transformeront en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) puis en lipoprotéines de faible densité (LDL). Les IDL et les LDL seront envoyés vers le foie ou vers les cellules périphériques pour les LDL.

La LPL a aussi comme rôle de favoriser l'ancrage des lipoprotéines avec l'endothélium pour faciliter leur hydrolyse. L'endocytose des lipoprotéines est possible grâce à la fonction de la LPL comme ligand au récepteur des LDL, au récepteur des VLDL, à la protéine réceptrice liée

aux LDL (pour « *LDL receptor related protein* »), au récepteur 2 de l'apoE et à la mégaline [50]. Elle collabore au transfert d'ester de cholestérol et de vitamines A et E [43, 51]. Finalement, il a été démontré récemment que la LPL pourrait avoir aussi un rôle dans la protection contre la maladie d'Alzheimer en hydrolysant les lipides pour diminuer le stress oxydatif des cellules du cerveau [52]. Une perturbation dans l'activité de l'enzyme serait donc néfaste à ce niveau [53]. Toutefois, de plus amples études devront être effectuées pour confirmer cette association ainsi que les mécanismes impliqués.

2.2.2 La régulation de la lipoprotéine lipase

La régulation de la LPL implique plusieurs mécanismes activés par des apolipoprotéines, des angiopoïétines (ANGPTL pour « *Angiopoietin-like* »), ou des protéines tels que GPIHBP1 et LMF1.

Parmi les apolipoprotéines, on retrouve les apoC, produites principalement par le foie, qui ont été associées avec la modulation de l'activité de la LPL. En fait, l'apoCII est un cofacteur qui serait essentiel pour son activation, alors que l'apolipoprotéine CI (apoCI) et l'apolipoprotéine CIII (apoCIII) inhiberait son action [37]. Le mécanisme d'action de l'apoCI et l'apoCIII fonctionnerait en déplaçant la LPL pour qu'elle ne soit plus en contact avec les lipides [54]. Quant à l'apoAV, une perte de fonction de cette apo a déjà été associée avec une hyperTG et une chylomicronémie [55-57]. Toutefois, le mécanisme complet n'est pas encore tout à fait élucidé. On sait que l'apoAV fonctionnerait en stimulant l'hydrolyse des triglycérides par la LPL en améliorant l'interaction entre la LPL et les récepteurs de l'HSPG dans le plasma [58]. La régulation de la LPL se fait aussi via l'implication des ANGPTL 3 et 4. Pour l'ANGPTL-3, elle est produite principalement par le foie et en circulation, elle inhibe la lipolyse des triglycérides après un repas. L'ANGPTL-4, quant à elle, est produite par le tissu adipeux, le foie, le muscle cardiaque et les muscles squelettiques et inhibe l'hydrolyse des triglycérides plasmatiques en conditions de jeûne ou lors d'un exercice [59]. Une surexpression de l'ANGPTL-4 est associée à une diminution de l'activité de la LPL, car l'ANGPTL-4 catalyse la dissociation irréversible des dimères actifs de la LPL en monomères inactifs [60]. L'ANGPTL-3 inactiverait la LPL de façon réversible avec l'aide des proprotéines convertases

[61] et l'ANGPTL-4 l'inactiverait irréversiblement en accélérant la dissociation des dimères de la LPL [60]. Toutefois, ces inhibiteurs seraient fonctionnels seulement si la LPL est attachée à la surface endothéliale par l'HSPG [60]. L'ANGPTL-8 aussi nommée « lipasin », est aussi un membre de la famille des ANGPTL qui inhibe l'activité de la LPL, principalement dans le foie et le tissu adipeux blanc et brun [62].

Une autre protéine qui a récemment été documentée comme étant importante dans la régulation de la LPL est la protéine GPIHBP1. Cette protéine, qui fait partie de la famille des lymphocytes antigènes 6, est exprimée dans les cellules endothéliales des capillaires [63] et aurait une grande affinité avec la LPL et les lipoprotéines. GPIHBP1 se retrouve donc principalement aux endroits où l'expression de la LPL est plus élevée soit dans les cellules endothéliales [64]. GPIHBP1 servirait aussi de plateforme à la LPL, c'est-à-dire qu'elles seraient liées ensemble à la surface des cellules endothéliales et qu'ainsi les lipoprotéines riches en triglycérides (principalement les chylomicrons) seraient attirées par ce complexe afin que la LPL puisse effectuer sa fonction enzymatique d'hydrolyse [45]. GPIHBP1 servirait également à stabiliser la LPL afin d'empêcher son inhibition par l'ANGPTL-3 et l'ANGPTL-4 [59]. De plus, il a été démontré que sans la protéine GPIHBP1, la LPL ne peut être transportée jusqu'à la lumière des capillaires. Elle est ainsi dans l'incapacité d'hydrolyser les lipoprotéines riches en triglycérides, ce qui peut provoquer une hyperTG sévère [63].

LMF1 est également une protéine nécessaire à la régulation de la LPL. En fait, LMF1 se retrouve liée à la membrane du réticulum endoplasmique et son domaine C-terminal est nécessaire pour son interaction avec les LPL naissants. LMF1 est essentiel à la maturation de la LPL et de la lipase hépatique au niveau du réticulum endoplasmique [28]. Une perte de fonction de la protéine a déjà été associée avec une déficience complète en LPL entraînant une chylomicronémie, des épisodes de pancréatite et des xanthomes [65].

La LPL est aussi régulée en fonction de la demande énergétique du corps et des organes. En effet, lors d'un état postprandial, la LPL sera d'autant plus exprimée dans le tissu adipeux pour accumuler les lipides, alors que dans les muscles, son expression sera diminuée. Par ailleurs, lors d'un état de jeûne, c'est le contraire qui se produit; les réserves d'énergie dans les adipocytes seront utilisées [37].

En résumé, la LPL est une enzyme-clé dans le métabolisme des lipides en circulation et elle est régulée de multiples façons pour maintenir un niveau normal de ce métabolisme. Une perturbation quelconque dans ces mécanismes de régulation de la LPL est susceptible d'être associée avec une dyslipidémie [66].

2.2.3 La déficience en lipoprotéine lipase

La LPLD provoque une perturbation importante de la lipolyse comme décrit précédemment. C'est une des causes primaires responsables de l'hyperchylomicronémie familiale. Une déficience complète de l'activité de l'enzyme est causée par une mutation délétère dans le gène de la *LPL* et peut entraîner un taux de triglycérides de plus de 10 mmol/L (hyperTG sévère). L'augmentation du risque d'épisodes de pancréatites est considérable si les triglycérides sont au-dessus de 20 mmol/L [68, 69]. Toutefois, une déficience partielle de l'enzyme, qui se produit chez les hétérozygotes pour une mutation délétère dans le gène de la *LPL*, engendre une diminution d'environ 50 % de son activité et une augmentation légère à modérée des triglycérides plasmatiques (2 mmol/L < triglycérides < 10 mmol/L). Étant donné le mode de transmission autosomal récessif de la maladie, les individus hétérozygotes ne présentent pas une hyperchylomicronémie familiale, mais sont à risque d'une hyperlipidémie mixte (Type IIB selon la classification de Fredrickson [OMIM : 144250]) [70]. Cela provoque une hausse du risque de MCV [71, 72], puisque la concentration en HDL est diminuée.

Plus de 230 variants ont déjà été décrits dans le gène de la *LPL*, mais deux mutations autosomiques récessives principales expliquent jusqu'à 93% des cas de la maladie dans les régions de Charlevoix et du SLSJ. Ces deux mutations [P207L (explique près de 75% des cas de LPLD dans les régions) et G188E] sont à l'origine d'une déficience complète de l'enzyme (mutations nulles associées au Type I à l'état homozygote) et peuvent entraîner l'hyperchylomicronémie familiale. Tandis que la mutation S447X est connue pour augmenter l'activité de la LPL provoquant une diminution de la triglycéridémie en circulation (Tableau I), d'autres mutations comme D9N et N291S sont responsables d'une déficience partielle en LPL et provoquent d'autres complications comme un risque plus élevé de MCV (Tableau I).

Aussi, certains variants génétiques dans le gène de la *LPL* vont entraîner une diminution de l'activité et de la LPL et par le fait même, provoquer certaines dyslipidémies. Les dyslipidémies sont les causes de certaines perturbations dans plusieurs mécanismes de régulation et peuvent entraîner l'hyperTG, le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, la MCV, la maladie d'Alzheimer, etc. [52, 53, 66].

Tableau I. Certains variants associés avec une perturbation dans l'expression et l'activité de la lipoprotéine lipase.

Variants	Activité enzymatique	Profil lipidique	Risques associés
<ul style="list-style-type: none"> ▪ P207L ▪ G188E 	Aucune activité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Type I (chez les individus homozygotes) ▪ Parfois Type V, (par exemple lors d'une grossesse) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Syndrome de chylomicronémie ▪ Douleurs abdominales aiguës ▪ Pancréatites aiguës et/ou récurrentes
<ul style="list-style-type: none"> ▪ D9N ▪ N291S 	Activité réduite	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Susceptibilité à l'hyperTG ▪ Concentration en HDL diminué 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MCV ▪ Syndrome de chylomicronémie ▪ Hypertension artérielle ▪ Résistance à l'insuline
<ul style="list-style-type: none"> ▪ S447X 	Augmentation de l'activité de la LPL	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Souvent une diminution de la triglycéridémie 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aucune répercussion clinique ▪ Myotoxicité dû à une surexpression musculaire de la LPL

Adapté de : *Gagné et Gaudet, 2007* [34].

2.3 Manifestations cliniques et risques pour la santé

L'hyperchylomicronémie familiale est caractérisée par un taux de chylomicrons en circulations plus élevé que les valeurs de normalité (chylomicronémie). L'observation clinique d'un plasma lactescent est l'un des premiers signes de la présence de chylomicronémie [26]. Combinés à l'observation d'autres manifestations cliniques, on le nommera « syndrome de chylomicronémie ». Ce syndrome, qui peut être chronique ou épisodique, est souvent dû à une déficience complète ou partielle dans les gènes codant pour la LPL, pour l'apoCII, pour

GPIHBP1 ou pour LMF1, ou l'expression de l'isoforme apoE2 (l'isoforme apoE2 est associée avec une augmentation de la triglycéridémie en diminuant l'affinité entre les lipoprotéines riches en triglycérides et le récepteur hépatique [73]), combinée à un ou plusieurs facteurs secondaires amplifiant le phénomène [74]. L'accumulation de chylomicrons provoque une rétine lipémique (vaisseaux rétiniens blanchâtres) ou des xanthomes éruptifs (petites papules jaunes au contour rougeâtre se retrouvant principalement sur le dos, les bras, les fesses et les cuisses) [75]. Il est possible d'observer une hépatomégalie et une splénomégalie puisque le foie et la rate deviennent engorgés de chylomicrons. La pancréatite est la manifestation la plus importante et représente la plus grave complication de la chylomicronémie [74]. Lors d'un épisode de pancréatite chez ces patients, le sang paraîtra « crème de tomate » [26]. Cette manifestation ne peut toutefois pas toujours être prévenue étant donné que certains individus vont exprimer une pancréatite lorsque la concentration en triglycérides est aux alentours de 20 mmol/L, alors que d'autres patients ne présentent aucune pancréatite ou encore aucune douleur abdominale même avec une triglycéridémie supérieure à 50 mmol/L. Le processus par lequel la chylomicronémie causée par la LPLD augmente les risques de pancréatite n'est pas encore compris entièrement. Une des hypothèses actuelles serait que les chylomicrons en trop grande quantité en circulation vont se loger dans les capillaires pancréatiques, où ils seront hydrolysés par la lipase pancréatique, ce qui libérera les AGL. Ceux-ci vont s'accumuler au point de provoquer des dommages importants au niveau des tissus pancréatiques par la stimulation de la réponse inflammatoire aiguë du pancréas entraînant la pancréatite [76-80].

De plus, lors d'une LPLD, la concentration en HDL est diminuée puisqu'il y a moins d'échange de triglycérides entre les résidus de chylomicrons et de VLDL [67]. Cette diminution significative en HDL pourrait aussi avoir un impact sur le risque de pancréatite. En effet, la présence d'AAT (pour « *alpha(1)-antitrypsin* ») transporté par les HDL inhiberait les protéases activées dans le pancréas et en circulation [81]. Chez les patients LPLD, ce mécanisme de protection naturelle serait donc absent.

2.4 Les traitements

Pour l'instant, les médicaments hypotriglycémisants, tels que les fibrates et l'acide nicotinique [75], actuellement disponibles sur le marché ne sont pas totalement efficaces pour diminuer les taux de triglycérides chez les patients atteints d'une hyperchylomicronémie familiale en deçà du seuil de risque pour la pancréatite (triglycérides > 10 mmol). La solution thérapeutique la plus commune pour ces patients est donc l'adhérence à un régime à faible teneur en gras (moins de 10% de la ration calorique totale dans une journée), très stricte, sévère et contraignante dans la vie quotidienne de ces personnes. De plus, ils doivent limiter la prise d'alcool et de sucres simples. Ces patients doivent ainsi suivre cette diète intégrant des acides gras à chaînes moyennes (MCT pour « *Medium-chain triglyceride* ») toute leur vie pour éviter les complications qui peuvent survenir à court, à moyen et à long terme. Les MCT ont l'avantage d'être transportés directement au foie pour leur métabolisme sans passer par l'intermédiaire des chylomicrons [82].

Il y a plusieurs traitements actuellement en développement pour l'hyperchylomicronémie familiale. Les inhibiteurs d'une enzyme nommée « diacylglycérol acyltransférase 1 » (DGAT-1) contribueraient à augmenter l'absorption des triglycérides dans l'intestin et à augmenter la synthèse des triglycérides par le foie et dans les tissus adipeux [83]. En inhibant cette enzyme, la production de triglycérides serait moins grande et il y aurait une diminution du taux de triglycérides et de chylomicrons en circulation [83].

Un second traitement en développement est la thérapie antisense de l'apoCIII. Comme il a été décrit précédemment, l'apoCIII est un inhibiteur important de la LPL, toutefois, dans le cas des patients LPLD, l'activité de la LPL est déjà diminuée grandement [84]. Il existerait donc une voie indépendante de la LPL qui ferait en sorte qu'un inhibiteur de l'apoCIII aiderait à diminuer le taux de triglycérides plasmatique [84, 85].

Finalement, l'Alipogene Tiparvovec (AAV1) est un traitement utilisant la thérapie génique comme hypotriglycémisant [86, 87]. L'AAV1 contient une séquence codante pour le gène de la *LPL* qui comprend la mutation S447X. Cette mutation augmente l'activité de la LPL et intensifie l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides. La région codante est insérée à l'intérieur d'un virus recombinant nommé « virus associé adenosérotique de type 1 ». Le procédé

de cette technique est d'injecter le virus dans le muscle squelettique et de transférer le gène de la *LPL* pour augmenter son activité chez un patient LPLD [87]. L'Alipogène Tiparvovec (Glybera®) est approuvée depuis 2012 en Europe comme moyen pour traiter les patients LPLD.

Avant tout, il faut quand même bien comprendre le processus de la pancréatite pour la prévention des complications chez les patients atteints d'une LPLD, ce qui sera précisé dans le chapitre III.

Chapitre III : La pancréatite

La pancréatite est une maladie inflammatoire complexe du pancréas qui combine souvent des facteurs environnementaux, métaboliques et génétiques. Elle est caractérisée, en général, par des douleurs abdominales et des symptômes physiques tels que des vomissements, de la fièvre, une tachycardie, une hyperleucocytose et une élévation des enzymes pancréatiques dans le sérum [88]. Il existe deux formes principales de pancréatites; 1) la pancréatite aiguë (PA), qui inclut la PA récurrente (PAR) et 2) la pancréatite chronique (PC). Celles-ci peuvent toutefois être de causes variées comme biliaire, métabolique, héréditaire, idiopathique, alcoolique, etc. La PA est caractérisée par des douleurs abdominales spontanées, alors que la PC est souvent associée avec les mêmes symptômes mais à long terme; les douleurs et les complications vont perdurer dans le temps malgré la résilience de l'élément déclencheur de la pancréatite [88]. Les causes de ces deux types de pancréatites seront décrites dans les prochaines sections.

3.1 Épidémiologie

La pancréatite est une maladie considérée comme répandue et représente une charge considérable pour le système de santé du Canada [89]. Aujourd'hui, plus de 15 000 patients sont hospitalisés pour une PA et plus de 2000 pour une PC chaque année au Canada [89]. On observe d'ailleurs la même tendance en Europe et aux États-Unis [90]. De ces 17 000 patients touchés par la pancréatite par année au Canada, 300 personnes ayant eu une PA en décéderont, alors que ce sera 40 d'entre eux qui décéderont d'une PC [89]. Dans la majorité des cas (80%), les patients ne gardent aucune séquelle de l'épisode d'une PA, toutefois, dans 20 % des cas, des complications sévères peuvent se manifester ou encore entraîner le décès de la personne. Cela entraîne un coût important au système de santé actuel. Entre 2004 et 2005, le coût moyen causé par l'hospitalisation des patients touchés par la pancréatite a été de plus de 118 millions de dollars [91]. Ceci est sans compter les coûts indirects liés aux complications de la pancréatite (diabète, MCV, cancer, cirrhose, etc.) ou aux médicaments pris pour contrer la douleur, ce qui est difficilement estimable [89]. C'est pourquoi il est d'autant plus important de bien connaître

la génétique de la pancréatite pour prévenir le plus possible les complications liées à cette condition.

Il est impossible de faire la différence entre une pancréatite d'origine génétique ou d'incidence environnementale selon les caractéristiques cliniques, biologiques ou morphologiques. Un bilan génétique est donc important pour vérifier s'il y a une susceptibilité à la pancréatite et pour prévenir la survenue des épisodes chez un individu ou même dans sa famille. La génétique de la pancréatite est donc une sphère importante à étudier puisque plus de 10% des personnes ayant fait une pancréatite ne connaissent pas la cause de celle-ci [pancréatite idiopathique (PI)] [92]. Les sections suivantes décriront bien le processus de la pancréatite afin d'en faire ressortir les gènes importants pour l'étude.

3.2 Physiopathologie

Pour mieux comprendre le mécanisme de la pancréatite, la description du pancréas est essentielle. Le pancréas est une glande amphicrine, c'est-à-dire une glande qui contient à la fois des cellules exocrines et des cellules endocrines et il est situé dans la cavité abdominale. Il se retrouve sous l'estomac, juste au-dessus des reins et est annexé au système digestif. Plus précisément, il est attaché au duodénum par le canal pancréatique (ou canal de Wirsung) [88]. Sa fonction exocrine, effectuée par les cellules acineuses (acini), sert à la sécrétion des enzymes pour la digestion des protéines et des lipides dans le système digestif et à la sécrétion du bicarbonate de sodium dans le duodénum afin de stabiliser le pH provenant du chyme de l'estomac [88]. Son rôle de glande endocrine permet le contrôle du taux de glucose sanguin en sécrétant les hormones, dont le glucagon sécrétée par les cellules alpha et l'insuline sécrété par les cellules bêta dans la circulation [88]. De plus, les cellules delta vont sécréter la somatostatine, une hormone inhibitrice de plusieurs autres enzymes et hormones alors que les cellules à polypeptides pancréatiques (cellules PP) vont sécréter le polypeptide pancréatique qui inhibe la sécrétion de la somatostatine [103]. Il existe plus de 20 enzymes de digestion situées dans les granules de zymogène produites par les cellules acini et sont normalement inactives jusqu'à ce qu'elles soient sécrétées dans le duodénum pour la digestion [104]. Les cellules acini occupent

la majeure partie du pancréas (80%), alors que celles qui sécrètent les hormones représentent seulement 20% de la totalité de ce dernier. Le pancréas exocrine sera davantage discuté ici, car c'est l'activation prématurée de certaines enzymes de digestion dans le pancréas qui entraîne la pancréatite.

L'enzyme digestive la plus abondante dans le tube digestif est le trypsinogène qui se retrouve sous trois isoformes soit : 1) le trypsinogène cationique qui représente 50 à 70% de tout le trypsinogène sécrété, 2) le trypsinogène anionique (de 30 à 40%) et finalement, 3) le mésotrypsinogène. Le trypsinogène est une enzyme produite par les cellules acini dans le pancréas et, à cet endroit, elle est inactive. Lorsque sécrétée dans l'intestin, l'entérokinase (une entéropeptidase exprimée dans les entérocytes du duodénum) va activer le trypsinogène en trypsine [105]. L'entérokinase est reconnue pour avoir une affinité avec la séquence de quatre asparagines suivie d'une lysine [106]. Lorsque l'entérokinase est sécrétée dans le duodénum, elle clivera le trypsinogène à cet endroit précisément pour former la trypsine active, une enzyme de digestion. La trypsine va activer, par le fait même, d'autres enzymes de digestion et s'autoactivera elle-même dans le duodénum (Figure 2). Plusieurs mécanismes doivent être mis en place pour empêcher l'activation prématurée de la trypsine dans le pancréas afin d'éviter les dommages locaux qui pourraient en résulter. Notamment, l'isolement des granules de zymogènes qui évite leur contact avec les lysosomes épargne l'activation par l'autophagie [107, 108]. Il y a également la régulation du pH et du taux de calcium en circulation, puisque ces deux modulateurs ont une grande influence sur l'activation du trypsinogène en trypsine [109, 110]. Un autre mécanisme de protection est la dégradation du trypsinogène et de la trypsine par un processus d'autolyse au niveau du site de l'arginine en position 122 (site R122) [111, 112]. La trypsine a une fonction d'autoactivation ainsi qu'un rôle de dégradation grâce à ce site. Finalement, il y a aussi la synthèse de certains inhibiteurs de la trypsine et du trypsinogène. Parmi ces inhibiteurs, on retrouve le chymotrypsinogène C (CTRC pour « *chymotrypsin C* ») qui aiderait à la dégradation de la trypsine dans le pancréas lorsque celle-ci serait activée prématurément [105, 113], alors que le « *serine peptidase inhibitor kazal type 1* » (SPINK1), aurait un effet d'inhibiteur sur l'activation du trypsinogène [99, 114, 115].

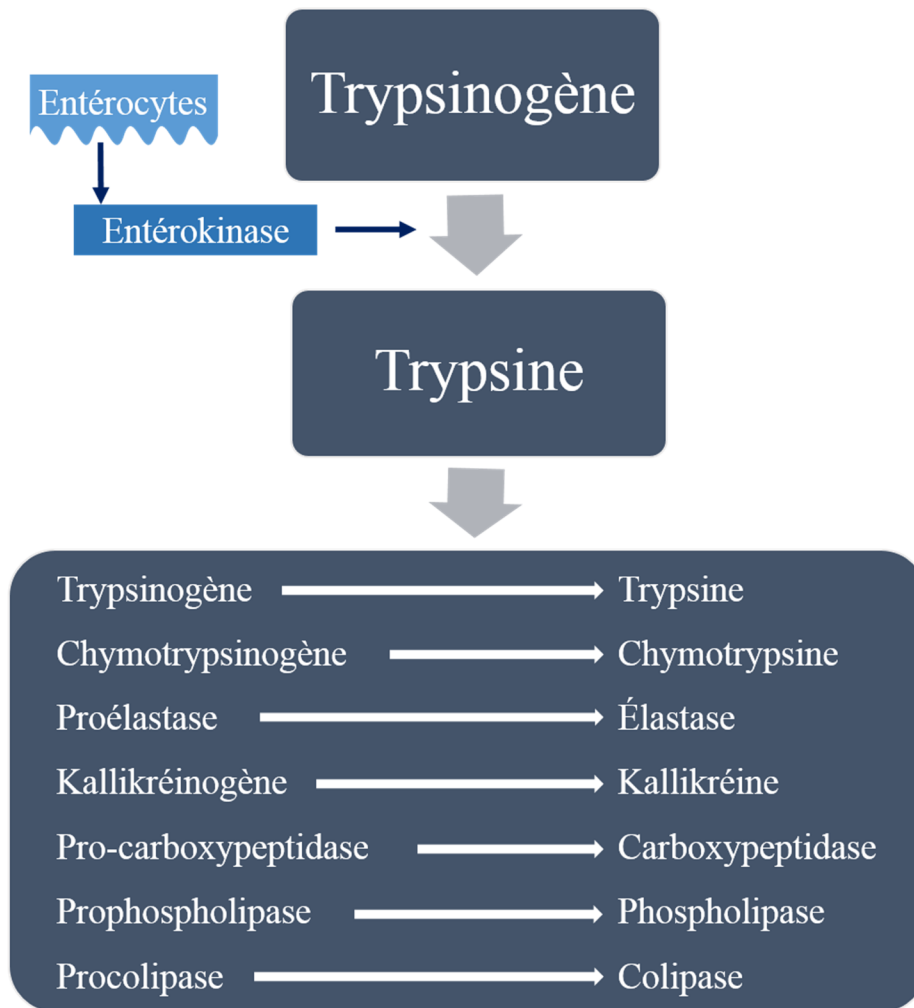


Figure 2. Mécanisme en condition normale du trypsinogène et des enzymes de digestion. En condition normale, le trypsinogène est synthétisé dans le pancréas, mais s'active seulement dans le duodénum en présence de l'entérokinase pour former la trypsine. La trypsine activera par la suite plusieurs autres enzymes de digestion situées dans le duodénum. Adaptée de: Frossard, 2001 [89].

La concentration de l'amylase sérique et de l'activité de la lipase sont des marqueurs bien connus de la pancréatite [89]. Le premier symptôme d'une pancréatite est normalement une douleur abdominale aiguë, mais celle-ci est confirmée cliniquement lorsqu'une prise de sang est effectuée et que le taux d'amylase et de lipase est trois fois supérieur à la normale. Ces marqueurs vont normalement s'élever quelques heures après le début des douleurs abdominales et ils vont retourner à la normale de 3 à 5 jours plus tard pour l'amylase et encore plus longtemps pour la lipase [89]. Toutefois, la concentration en amylase sérique n'est pas toujours augmentée,

comme c'est le cas lors d'une triglycéridémie élevée, ce qui provoque souvent une sous-estimation du nombre de pancréatites chez les individus souffrants d'une hyperTG sévère. De plus, le taux des triglycérides peut varier énormément entre le début des douleurs abdominales et l'hospitalisation, ce qui entraîne souvent un questionnement quant à la cause de cette pancréatite [116].

3.3 Classification

3.3.1 *Pancréatite aigüe*

La PA est un syndrome provoquant des nausées et des douleurs au niveau de l'abdomen. La PA n'est pas caractérisée par la sévérité de ces symptômes, puisque celle-ci peut être très variable entre individu et d'une fois à l'autre. Par contre, la survenue spontanée de cette manifestation est typique. Lors d'une PA bénigne, les symptômes devraient être résolus à l'intérieur d'une semaine, et dans la majorité des cas, le patient se rétablira complètement d'une PA. Toutefois, lors d'une PA sévère plusieurs complications peuvent survenir au niveau des poumons ou des reins. Il peut y avoir également accumulation de liquides dans l'abdomen, des infections et des hémorragies [89]. Le jeûne est une des meilleures solutions pour arrêter la réponse inflammatoire du pancréas et pour diminuer son irritation. Les causes d'une PA sont très différentes d'un individu à l'autre; les problèmes au niveau du canal pancréatique (calculs biliaires, défaut dans le canal, etc.) (38%) et l'abus d'alcool (36%) sont parmi les plus fréquentes, alors que les PI (10%), les pancréatites hyperlipidémiques (2%) ou hypercalcémiques (1%) sont plus rares, mais sont tout de même des causes importantes à mentionner [92].

Certains cas de PA ont parfois été observés durant la grossesse; de ce fait, une femme sur 1000-10 000 en fera l'expérience. Selon une étude récente, le taux de mortalité périnatal pour cette condition est estimé à 3,6% [93], alors que le taux de mortalité maternelle serait de moins de 1%. Étant donné que la PA gestationnelle est une condition relativement rare, le nombre de participants est très limité dans les études, il est donc difficile d'en estimer le nombre exact [93]. La PA est une condition complexe et il existe aussi une grande variabilité dans son expression

chez les femmes enceintes [94]. Pour une pancréatite hyperlipidémique, on observe plus de cas de PA chez les femmes enceintes, car les triglycérides plasmatiques présentent déjà une augmentation de deux à quatre fois supérieure à la normale lors du troisième trimestre de grossesse [95]. Cela est dû à la diminution de l'activité de la LPL et à une augmentation de la production de lipoprotéines riches en triglycérides. Pour une femme qui avait déjà une hyperTG familiale, le fait d'être enceinte amplifie le phénomène, ce qui peut entraîner une hyperTG sévère en plus d'un syndrome de chylomicronémie, augmentant ainsi énormément le risque d'occurrence d'une PA [93]. La triglycéridémie doit donc être très bien régulée chez les femmes désirant devenir enceintes et présentant déjà un taux de triglycérides supérieur aux valeurs normales.

3.3.2 *Pancréatite chronique*

La PC est aussi une réponse inflammatoire persistante du pancréas, comme c'est le cas dans la PA, mais elle est caractérisée par une douleur abdominale avec des dommages évolutifs et irréversibles au niveau du pancréas exocrine et endocrine. Les caractéristiques histologiques de la PC sont la fibrose du pancréas, l'atrophie des cellules acini, l'inflammation chronique du pancréas et dans certains cas, l'obstruction du canal pancréatique ou la nécrose du tissu pancréatique [96]. Ces complications provoquent une insuffisance pancréatique, des douleurs chroniques, une mauvaise digestion, une malabsorption des nutriments et peuvent même aller jusqu'à développer le diabète ou même un cancer du pancréas [97]. Ce qui différencie en grande partie ces deux maladies est que, dans le cas de la PA, il y a un retour à la normale complet au niveau des tissus pancréatiques après la guérison d'un épisode, ce qui n'est pas le cas dans la PC. Une susceptibilité génétique ajoutée à un facteur de risque environnemental, tel que le tabagisme [98], est souvent une combinaison très propice à l'expression d'une PC. Cependant, de 10 à 20% des patients présentant une PC n'ont pas nécessairement de facteurs de risque connus, surtout chez les enfants où la cause de l'abus d'alcool est presque automatiquement éliminée [99]. C'est pourquoi la composante environnementale pourrait jouer seulement un rôle minime dans l'expression de la PC. La pancréatite héréditaire est donc une des formes d'apparition précoce de la PC.

3.3.3 Pancréatite aigüe récurrente

La PAR est l'expression de plusieurs épisodes de PA. Dans la majorité des cas, avant de développer la PC, un patient développera des épisodes de PAR. L'expression de cette PAR est souvent causée par des calculs biliaires ou l'alcoolisme (dans 70% des cas), toutefois, la pancréatite héréditaire est aussi une des causes fréquemment observées chez ceux qui expriment la PAR. En effet, un impact environnemental peut provoquer une PA, mais lorsqu'une susceptibilité génétique est ajoutée, le risque de répéter cette pancréatite est d'autant plus important. De plus, selon certains groupes de recherche, la combinaison de plusieurs facteurs génétiques peut engendrer la PC suite à la PAR [100-102].

3.4 Génétique de la pancréatite

L'étude des déterminants génétiques associés à la pancréatite est un domaine de recherche en expansion. Actuellement, sept gènes, rapportés dans plus d'une étude, sont reconnus comme associés avec la pancréatite et la liste continue de s'allonger à la lumière de nouvelles découvertes. Ces gènes sont des cibles potentielles pour comprendre les mécanismes physiopathologiques de la pancréatite dans la LPLD. Les quatre premiers gènes présentés dans le Tableau II (*CTRC*, *SPINK1*, *PRSS1* pour « *Protease, serine, 1 (trypsin 1)* » et *PRSS2* pour « *Protease, serine, 2 (trypsin 2)* ») ont un lien direct avec la pancréatite. Cependant, les trois gènes impliqués dans la régulation des concentrations ioniques (sous-division dans le Tableau II) soit *CASR* pour « *Calcium-sensing receptor* », *CFTR* pour « *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* » et *CLDN2* pour « *Claudine 2* » ne sont pas associés directement avec la voie des protéases dans le pancréas. *CASR* est d'abord associé avec l'hypercalcémie hypocalciurique familiale [117] qui peut entraîner la pancréatite dû à l'augmentation du calcium en circulation, alors que *CFTR* est associé avec la fibrose kystique [118] et engendre un dérèglement dans le transport des ions au niveau du pancréas; dans ce cas, le risque d'occurrence d'une pancréatite est également plus élevé. *CLDN2* est associé avec la cholécystite [119] et la colite ulcéreuse [120].

3.4.1 *CTRC*

Le gène *CTRC*, localisé sur le chromosome un, est constitué de huit exons codant pour les 268 acides aminés de la protéine. Ce gène code pour *CTRC*, une protéase produite en petite quantité par les cellules acini du pancréas. Elle est retrouvée sous forme inactive (chymotrypsinogène) dans les granules de zymogènes et est normalement sécrétée dans le duodénum avec les autres enzymes pour la digestion des protéines et des lipides. *CTRC* est activée par la trypsine dans l'intestin ou dans le pancréas lorsque la trypsine y est activée prématurément [123]. L'activation de *CTRC* dans le pancréas favorise la dégradation (par clivage) du trypsinogène et de la trypsine provoquant l'inactivation du trypsinogène [105, 122]. *CTRC* aurait donc un rôle protecteur contre la pancréatite. *CTRC* a été associé pour la première fois avec la PC seulement en 2008 [113, 121], mais depuis ce temps, plusieurs autres groupes de recherche ont, à leur tour, démontré le risque de PC associé au gène *CTRC* (Tableau II). Une mutation telle que celles présentées dans le Tableau II peut engendrer une perte d'activité de la protéine, ce qui augmente donc la susceptibilité à la pancréatite [123]. Récemment, un nouveau rôle de la protéine a été démontré par l'identification d'une mutation [remplacement d'une alanine pour une thréonine en position 73 dans la protéine (p.A73T)]. *CTRC* entraînerait un stress au niveau du réticulum endoplasmique des cellules acini du pancréas, ce qui pourrait contribuer aux dommages du pancréas causés par la PC [141].

3.4.2 *SPINK1*

Le gène *SPINK1*, situé sur le chromosome cinq, possède quatre exons, traduits en une protéine de 79 acides aminés. *SPINK1* est un gène codant pour une protéase inhibant la trypsine synthétisée dans les cellules acini. Cette protéine a été identifiée initialement par Kazal et al. en 1948 [142] et certaines mutations dans le gène ont été associées, à partir des années 2000, avec le risque de PC [143]. Cette protéase a la faculté de se lier à la trypsine pour inhiber jusqu'à 20% de son activité, et ce, de façon réversible [99].

La mutation p.N34S (changement d'un nucléotide adénine pour une guanine, localisé dans un exon responsable du changement d'une sérine pour une asparagine au 34^e acide aminé de la

protéine) (Tableau II) chez *SPINK1* est la plus commune et a été associée dans plusieurs études avec la PC [114]. Mais dans certaines recherches indépendantes, elle n'était pas associée avec une diminution de la fonction de la protéine. Cependant, cette mutation se retrouve en parfait déséquilibre de liaison avec quatre autres variants introniques : c.56-37T>C, c.87+268A>G, c.195-604G>A, et c195-66_-65insTTTT [144]. Il serait donc possible que ce soit un de ces quatre variants qui seraient responsable de la perte de fonction de la protéine. Les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP pour « *Single Nucleotide Polymorphism* ») p.L14P (c.41T>C) et p.L14R (c.41T>G) sont des SNP directement associés avec une perte complète de la sécrétion de *SPINK1* et qui se transmettent sur un mode autosomique dominant [124]. De plus, *SPINK1* ne serait pas important seulement pour l'inhibition de la trypsine dans le pancréas, mais serait aussi un régulateur de l'autophagie cellulaire ainsi qu'un facteur de croissance via EGFR (pour « *epidermal growth factor receptor* ») [99, 107].

3.4.3 *PRSSI* et *PRSS2*

PRSSI et *PRSS2* sont des gènes retrouvés sur le chromosome sept et comprennent cinq et six exons respectivement. *PRSSI* code pour 247 acides aminés alors que *PRSS2* code pour 261 acides aminés. *PRSSI* forme le trypsinogène cationique et *PRSS2*, le trypsinogène anionique. Ce sont des protéases retrouvées sous forme inactive dans le pancréas et sécrétées via le canal pancréatique jusque dans le duodénum où elles seront activées en trypsine pour la digestion. *PRSSI* est le premier gène qui a été identifié comme responsable de la pancréatite héréditaire [145, 146]. Un défaut dans l'un de ces gènes peut provoquer l'autoactivation du trypsinogène en trypsine dans le pancréas et causer la pancréatite. Les mutations p.R122H et p.N29I (Tableau II) sont les deux mutations les plus fréquemment observées chez les individus avec pancréatite (dans 50 à 60% des cas) [147]. La mutation p.R122H bloquerait le mécanisme de protection contre laquelle la trypsine s'autolyse, entraînant au contraire un gain de fonction de la trypsine [148]. La mutation p.N29I, quant à elle, aurait un effet indirect en bloquant le site R122 [112].

3.4.4 *CASR*

Le gène *CASR* est localisé sur le chromosome trois et code pour 1088 acides aminés retrouvés dans 10 exons. Le gène code pour la protéine CaSR qui est un récepteur couplé à une protéine G et qui joue un rôle dans l'homéostasie du calcium en modifiant la sécrétion d'ions calcium de la glande parathyroïde et des tubules rénaux [149]. Il est exprimé principalement dans les cellules épithéliales de la glande parathyroïde et des tubules rénaux. De plus, il a été localisé au niveau des acini et du canal pancréatique, sans toutefois définir son rôle précis dans le pancréas [150]. CaSR agit comme un senseur du taux de calcium ionique (Ca^{2+}). Un niveau élevé de Ca^{2+} entraîne la cascade de signalisation intracellulaire qui implique la phospholipase C, l'inositol triphosphate ainsi que le réticulum endoplasmique (Figure 3). Cette voie biologique activée résultera en l'augmentation du calcium intracellulaire, ce qui va inhiber la production d'hormone parathyroïde. Cela amènera la diminution de l'absorption de calcium dans l'intestin, la diminution de la résorption dans les os et la diminution de la réabsorption dans les tubules rénaux [151]. La concentration de calcium diminuera ainsi dans la circulation.

Des variants dans le gène *CASR* peuvent conduire à des modifications dans la concentration du Ca^{2+} plasmatique entraînant différentes maladies. En effet, elle a d'abord été associée avec l'hypercalcémie hypocalciurique familiale, mais aussi avec l'hyperparathyroïdie néonatale primaire grave et l'hypocalcémie autosomique dominant [152]. De plus, certaines mutations inactivent CaSR, provoquent l'augmentation du calcium en circulation et conséquemment, augmentent les risques de pancréatite [153]. On sait que le calcium augmente la stabilité de la trypsine, c'est pourquoi une élévation du calcium provoque une hausse de son activité enzymatique [115]. Les mutations présentées dans le Tableau II ont été associées avec la PC et la PAR, mais seulement si un autre facteur tel que la mutation N34S dans le gène *SPINK1* ou une consommation d'alcool était présent [101, 136].

3.4.5 *CFTR*

Le gène *CFTR* est localisé sur le chromosome sept, codant pour 1480 acides aminés trouvés dans 31 exons. Le gène code pour une protéine de type « ATP-binding cassette (ABC)

transporter » et son rôle est de réguler l'entrée et la sortie des anions (ions bicarbonates et ions chlorures) selon le gradient électrochimique. Comme décrit précédemment, des variants au niveau du gène *CFTR* ont d'abord été associés avec la fibrose kystique, alors que d'autres variants ont été détaillés comme étant plus particulièrement associé avec la pancréatite. En effet, certains variants vont affecter la régulation de la protéine au niveau des ions chlorures comme c'est le cas avec la fibrose kystique, mais lorsque c'est la régulation des ions bicarbonates qui est dérégulé, le risque de pancréatite est augmenté. De plus, un défaut au niveau de la régulation du bicarbonate peut aussi entraîner des problèmes au niveau des sinus ainsi qu'une infertilité masculine [138]. Les neuf variants identifiés dans le Tableau II ont été associés avec la pancréatite, mais les mutations p.R74Q et p.R75Q sont associés significativement avec la pancréatite seulement si la mutation p.N34S est présente dans le gène *SPINK1* [138, 139].

3.4.6 *CLDN2*

Le gène *CLDN2* se situe sur le chromosome X et contient quatre exons avec 230 acides aminés. Le gène code pour une protéine transmembranaire retrouvée dans les jonctions serrées des cellules épithéliales et son rôle est le transport paracellulaire sélectif des ions, des solutés et de l'eau. Elle est présente au niveau des cellules du canal pancréatite, des entérocytes et des hépatocytes [154]. *CLDN2* est un gène qui a récemment été associé à la pancréatite [101]. Son mécanisme d'action au niveau de la voie biologique de la pancréatite est encore inconnu. Toutefois, le variant rs12688220, un SNP localisé dans le gène *MORC4* (pour « *MORC family CW-type zinc finger 4* »), mais qui aurait un impact sur la fonction biologique de *CLDN2* [140], a été récemment associé avec la pancréatite chronique [101]. Cette mutation semblerait avoir comme fonction de modifier les épisodes de PAR vers la PC [101].

Tableau II. Caractéristiques et polymorphismes connus dans la littérature et risques associés pour sept gènes de susceptibilité à la pancréatite

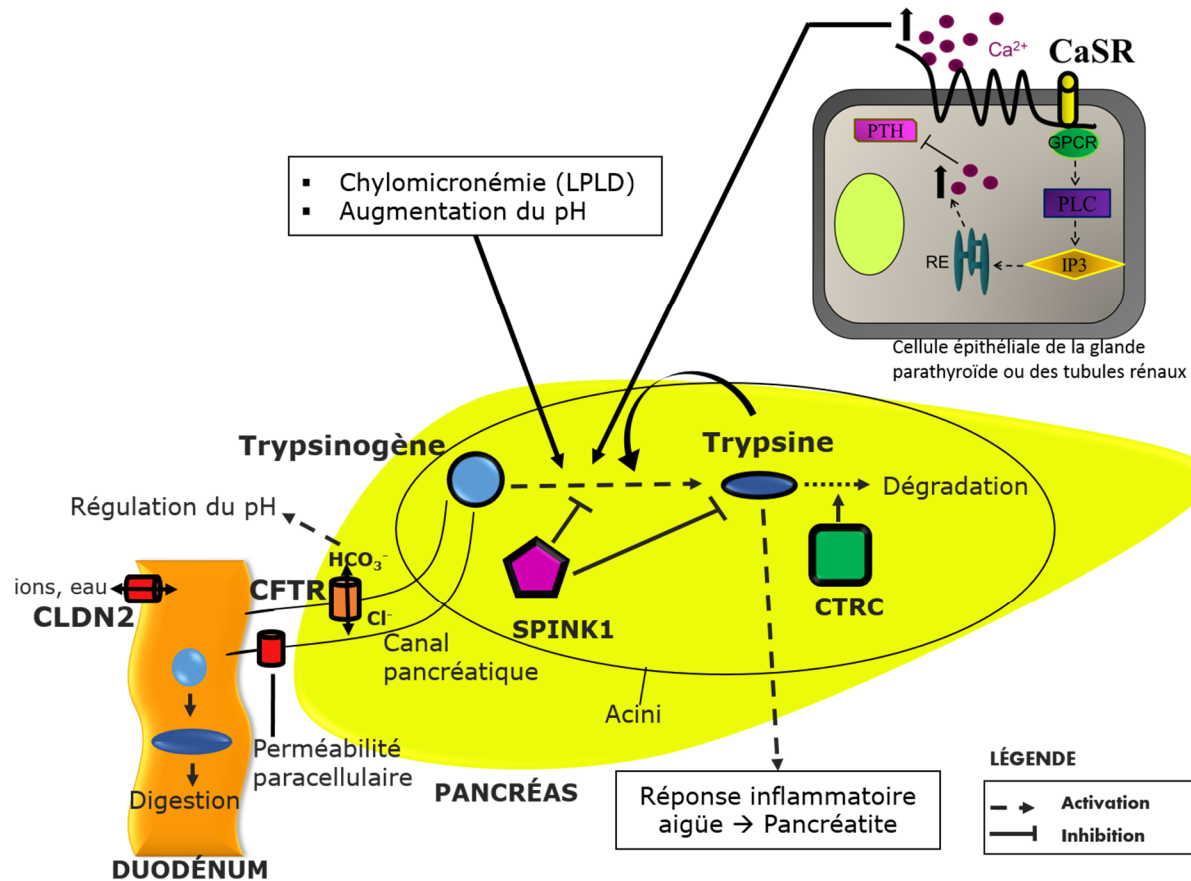
Gènes	Nom officiel	MIM	Locus	Rôle	Mutations connues	Risques associés	Références
Voie des protéases							
<i>CTRC</i>	Chymotrypsine C	11330	1p36.2 1	Protéase digestive sécrétée par les acini dans le pancréas. Dégrade la trypsine lorsque le trypsinogène est activé prématurément dans le pancréas.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.R254W (rs121909293) ▪ p.K172E (rs34949635) ▪ p.M200V (rs146235499) ▪ p.G217S (rs202058123) ▪ p.V235I (rs140993290) ▪ p.W55X (rs121909294) 	Tous associés avec l'augmentation du risque de PC.	[113, 121-123]
<i>SPINK1</i>	Serine protease inhibitor, Kazal type 1	6690	5q32	Protéase qui prévient l'activation prématurée du trypsinogène dans les granules de zymogènes et inhibe la trypsine lorsque celle-ci est activée dans le pancréas et dans le canal pancréatique.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.N34S (rs17107315) ▪ p.L14P et p.L14R (rs104893939) 	Tous associés avec l'augmentation du risque de PC, alors que N34S a été associée avec l'augmentation du risque de PA et PI.	[124-128]
Trypsinogène							
<i>PRSSI</i>	Trypsinogène cationique	276000	7q35	Protéase servant à la digestion des protéines dans l'intestin grêle (isoforme 1).	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.R122H (rs111033565) ▪ p.N29I (rs111033566) ▪ p.A16V (rs202003805) ▪ p.E79K (rs111033564) ▪ p.V123M (rs144403091) 	Tous associés avec l'augmentation du risque de PC, alors que N29I a aussi été associé avec l'augmentation du risque de PA.	[114, 129-131]
<i>PRSS2</i>	Trypsinogène anionique	601564	7q35	Protéase servant à la digestion des protéines dans l'intestin grêle (isoforme 2).	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.G191R (rs111033569) 	G191R a été associé avec une protection contre la PC.	[114, 132, 133]
Régulation des concentrations ioniques							

<i>CASR</i>	Calcium-sensing receptor	601199	3q13.3-q21	Joue un rôle dans l'homéostasie du calcium en modifiant la sécrétion d'ions de la glande parathyroïde et des tubules rénaux.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.A986S (rs1801725) ▪ p.Q1011E (rs1801726) ▪ p.R990G (rs1042636) 	A986S et Q1011E ont été associés avec une augmentation du calcium en circulation, alors que R990G a été associé avec l'augmentation du risque de PC et de PAR.	[134-137]
<i>CFTR</i>	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	602421	7q31.2	Présent dans la membrane des cellules du canal pancréatique, il transporte les ions chlorure et bicarbonate entre l'intérieur de la cellule et la lumière du canal pancréatique pour élever le pH.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ p.R74Q ▪ p.R75Q ▪ p.R117H ▪ p.R170H ▪ p.L967S ▪ p.L997F ▪ p.D1152H ▪ p.S1235R ▪ p.D1270N 	Les neuf variants ont été associés avec l'augmentation du risque de PC.	[138, 139]
<i>CLDN2</i>	Claudin 2	300520	Xq22.3	Protéine formant les canaux ioniques et hydriques des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Elle est normalement exprimée faiblement dans les cellules du canal et des îlots pancréatiques, mais elle peut s'activer lors d'un stress au niveau du pancréas.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ rs12688220 	Ce variant a été associé avec l'augmentation du risque de PC.	[101, 140]

Abréviations : MIM ; pour « *Mendelian Inheritance in Man* », PA; Pancréatite aigüe, PC; Pancréatite chronique, PI ; Pancréatite idiopathique, PAR; Pancréatite aigüe récurrente

Adaptée de: *Chen and Ferec, 2009* [114] et *Whitcomb, 2010* [115].

La Figure 3 démontre l'ensemble du processus de pancréatite. Tout d'abord, l'activation du trypsinogène dans le pancréas peut être causée par certains facteurs tels que 1) l'augmentation du calcium en circulation qui peut être provoqué par un défaut dans le gène *CaSR*, 2) une augmentation des chylomicrons en circulation et 3) l'augmentation du pH qui peut être causé par un défaut dans le gène *CFTR*. Si la trypsine n'est pas dégradée ou inhibée par *CTRC* ou *SPINK1*, une réponse inflammatoire aigüe est déclenchée dans le pancréas provoquant la pancréatite en soi. Normalement, le trypsinogène est sécrété dans le duodénum et c'est dans ce cas qu'il sera activé en trypsine pour la digestion.



©Camélia Dubois-Bouchard, 2014

Figure 3. Représentation schématique du mécanisme de la pancréatite induite par une hyperchylomicronémie.

Le trypsinogène (les gènes *PRSSI* et *PRSS2*) est une enzyme inactive dans le pancréas et formée par les cellules acini, elle est normalement sécrétée dans le duodénum et s'active sous forme de trypsine pour la digestion. Toutefois, s'il y a activation prématurée dans le pancréas, cela entraîne une réponse inflammatoire aigüe qui provoque la pancréatite. Le processus d'activation prématurée du trypsinogène en trypsine peut être dû à plusieurs facteurs comme une déficience en lipoprotéine lipase (LPLD) causant un syndrome de chylomicronémie, l'augmentation du calcium en circulation ou une augmentation du pH.

Abréviations : Ca²⁺ ; calcium ionique, CaSR ; Calcium-Sensing Receptor, Cl⁻ : ions chlorure, CLDN2 : Claudine 2, CFTR : Cystis fibrosis transmembrane receptor, CTRC ; chymotrypsinogène C, GPCR : Récepteur couplé à une protéine G, HCO₃⁻ : ions bicarbonate, IP3 : Inositol (1,4,5)-triphosphate, PTH: Hormone parathyroïde, RE : Réticulum endoplasmique, SPINK1 : Serine peptidase inhibitor Kazal type 1.

Chapitre IV : Problématique

Étant donné la complexité de la pancréatite et la quantité limitée d'informations rapportées dans la littérature, il reste encore beaucoup à comprendre de cette condition. La pancréatite est une maladie grave qui peut entraîner à court et à long terme d'importantes complications, tant au niveau du pancréas ou d'autres organes, mais aussi dans la qualité de vie des individus qui en souffrent jusqu'à provoquer, dans certains cas, le décès.

La LPLD, considérée comme un trait monogénique, est caractérisée par une grande variabilité clinique chez les patients atteints. En effet, l'expression des divers signes cliniques tels que la rétine lipémique, les xanthomes éruptifs ou l'hépatosplénomégalie est variable d'un patient à l'autre. L'expression de la pancréatite ne se manifeste pas non plus de la même façon, de la même intensité et au même moment chez tous les patients. Le comportement du patient vis-à-vis le respect (observance) d'une diète stricte et faible en gras pour maintenir les triglycérides sous le seuil de risque est variable d'un individu à l'autre. Bref, la complexité de l'expression phénotypique de la LPLD peut être illustrée dans un arbre familial représentant une situation réelle (Figure 4).

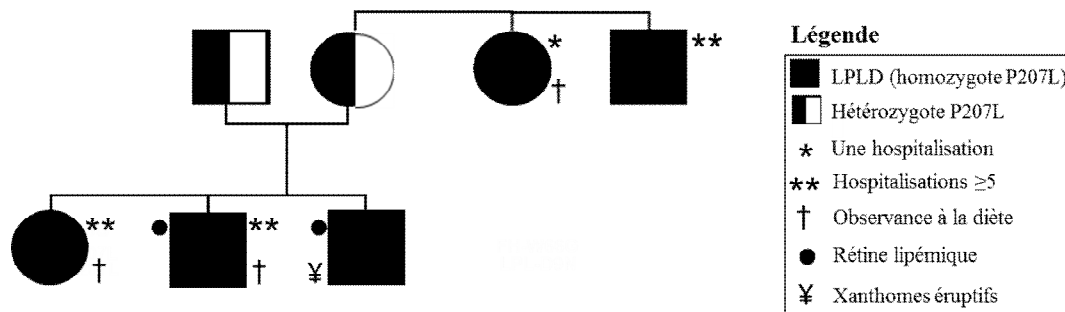


Figure 4. Arbre généalogique d'une famille avec hyperchylomicronémie familiale causée par une déficience en lipoprotéine lipase.

Le nombre d'hospitalisations indique le nombre de fois où l'individu a été hospitalisé pour une douleur abdominale aiguë ou pour une pancréatite. Les individus homozygotes avaient tous une triglycéridémie supérieure à 10 mmol/L. Une case remplie en noir représente un individu homozygote pour la mutation P207L dans le gène de la *LPL* alors qu'une case à moitié remplie est un individu hétérozygote pour cette même mutation.

Le peu de documentation sur l'expression de la pancréatite chez les patients atteints d'une hyperchylomicronémie familiale apporte des complications importantes concernant la prise en charge de ces patients. En fait, malgré un risque très élevé de pancréatite, un clinicien ne peut prédire quel patient aura ou non une pancréatite dans sa vie. Tel que montré dans la Figure 4, parmi les patients LPLD qui respectent leur diète stricte, le nombre de pancréatites varie beaucoup. Un patient qui ne respecte pas sa diète peut ne jamais faire de pancréatite. Bref, il est essentiel d'identifier des biomarqueurs génétiques¹ de risque qui permettront d'identifier les patients les plus à risque pour prévenir la pancréatite en soi, mais également les complications associées.

Pour cette étude, la recherche de biomarqueurs génétiques dans les gènes de susceptibilité à la pancréatite aiderait à différencier les individus atteints d'une LPLD les plus ou les moins à risque de faire une ou plusieurs pancréatites. Considérant que les individus avec une LPLD présentent un risque plus élevé de pancréatite par rapport à la normale (360 fois plus [26]), l'augmentation du risque de la pancréatite serait encore plus élevée si certains variants dans des gènes seraient présents. En connaissant les patients les plus à risque, la prise en charge pourrait se faire plus tôt et ainsi prévenir l'occurrence de la pancréatite, ce qui pourrait se traduire par l'amélioration de leur qualité de vie.

On se demande donc si des gènes, déjà connus pour être associés à la pancréatite, pourraient moduler l'expression de la pancréatite chez les patients LPLD.

¹ Un biomarqueur est en fait un indicateur biologique servant à dépister les gens les plus à risque pour une certaine condition. Dans le cas d'un biomarqueur génétique, c'est la recherche de certains variants qui pourraient caractériser soit la maladie en tant que telle ou encore les comorbidités associées.

Chapitre V: Hypothèse et objectif de recherche

5.1 Hypothèse

La compréhension de la pancréatite chez les patients LPLD est encore à un stade précoce. Ce manque d'informations limite la prise en charge du risque de pancréatite chez les patients LPLD. Par contre, les avancées sur la génétique de la pancréatite nous ont permis de soulever la question de recherche sur un possible effet modulateur des gènes de pancréatite sur l'expression de la pancréatite dans la LPLD. Ce qui nous a menés à poser l'hypothèse que des gènes de susceptibilité modulent l'expression de la pancréatite dans la LPLD.

5.2 Objectif

L'objectif principal du présent projet de maîtrise consiste à identifier des biomarqueurs génétiques de risque de pancréatite chez les patients LPLD au moyen d'une étude d'association génétique basée sur une approche classique par gènes candidats. Plus spécifiquement, il s'agit de sélectionner des gènes candidats à l'étude, de réaliser le séquençage et d'effectuer les analyses d'association.

Chapitre VI : Approche méthodologique

Cette étude est une étude d'association génétique visant à déterminer si des variants au niveau de certains gènes candidats pourraient être associés à l'expression de la pancréatite chez les patients avec une hyperchylomicronémie familiale. L'originalité de l'approche réside dans la sélection des gènes candidats et l'échantillon à l'étude. En effet, en se concentrant sur un phénotype extrême comme la pancréatite dans la LPLD, cela va permettre d'approfondir notre compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ce type de pancréatite. Cette approche permettra éventuellement de mieux comprendre les autres formes plus fréquentes de pancréatite. Ce chapitre décrit les étapes qui ont permis la réalisation de l'étude d'association dont les résultats sont présentés dans l'article du chapitre VII.

6.1 Échantillonnage

Un total de 100 sujets témoins normolipidémiques et 38 sujets confirmés LPLD ont été sélectionnés pour l'étude. Les sujets LPLD ont été choisis selon qu'ils étaient homozygotes pour la mutation P207L dans le gène de la *LPL* ou hétérozygotes composés (hétérozygote pour la mutation P207L et hétérozygote pour la mutation G188E). Ces génotypes entraînent une activité enzymatique de la LPL inférieure à 5%. Le groupe des sujets LPLD a ensuite été divisé selon leur nombre d'hospitalisations pour des douleurs abdominales sévères ou des PA. Ainsi, 18 sujets LPLD ont un historique de plus de cinq hospitalisations et 20 sujets LPLD ont eu moins de cinq hospitalisations. Dans le groupe des 20 sujets avec moins de cinq hospitalisations, huit d'entre eux n'ont jamais été hospitalisés pour ces conditions. Une telle répartition des groupes nous permet d'étudier la PAR puisque nous voulions faire la différence entre les personnes qui avaient quelques épisodes de pancréatites [<5 hospitalisations] et ceux qui en font en régulièrement [jusqu'à 96 épisodes (Tableau IV)]. De plus, nous avons utilisé comme critère le nombre d'hospitalisations pour douleur abdominale ou pour PA définie, probable et suspectée au lieu du nombre de pancréatites

confirmées, car chez les patients avec une hyperchylomicronémie familiale, le nombre de pancréatites est souvent sous-estimé principalement ceux qui ont des épisodes à répétition. Ces patients connaissent particulièrement les premiers symptômes d'une pancréatite, ils sont donc en mesure, dès le commencement des douleurs abdominales, de prévenir la suite des complications en débutant un jeûne. De cette façon, s'ils sont hospitalisés pour des douleurs abdominales, la pancréatite ne sera pas nécessairement confirmée. Ils ont également la capacité de bien réguler leur diète après plusieurs épisodes de pancréatite puisqu'ils savent éviter les aliments les plus susceptibles d'entraîner celle-ci.

La classification pour pancréatite d'Atlanta (pour « *Atlanta classification for pancreatitis* ») [155] est constituée de trois critères pour confirmer la pancréatite chez un patient. Ces trois critères sont : 1) des douleurs abdominales sévères suggérant une pancréatite aiguë [89], 2) une augmentation de trois fois supérieure à la normale de l'amylase sérique et/ou de l'activité de la lipase et, 3) une évaluation par imagerie médicale du pancréas (ultrasonographie abdominale, tomodensitométrie axiale ou imagerie par résonance magnétique). Dans notre étude, nous avons considéré que lorsqu'un patient avait deux des trois critères de cette classification lorsqu'il était hospitalisé, cela correspondait à une PA. Ces caractéristiques ont été établies avec la révision complète des dossiers médicaux pour tous les participants à l'étude.

6.2 Séquençage

Les gènes *CTRC* et *SPINK1* ont été séquencés pour l'étude. La sélection de ces deux gènes candidats a été basée sur deux critères principaux: 1) une association génétique entre des variants identifiés dans les gènes et le risque à la pancréatite était connue et documentée, et 2) les produits des gènes ont un rôle biologique direct dans la voie des protéases. Cette voie est importante dans les mécanismes physiopathologiques de la pancréatite. Pour les autres gènes candidats à la pancréatite, ils n'ont pas été sélectionnés pour cette première étape du projet.

Le séquençage de *CTRC* et *SPINK1* a été priorisé par rapport au génotypage, car nous voulions vérifier les séquences pour identifier des variants non connus à ce jour, au lieu de génotyper seulement ceux déjà connus. Nous avons concentré nos efforts de séquençage aux régions codantes et promotrices des gènes, excluant les régions introniques, puisque les variants se situant dans ces régions ont moins de probabilité d'avoir un effet fonctionnel sur le produit du gène. Pour tous les détails concernant l'échantillon de sujets séquencés ainsi que les méthodes utilisées, se référer à la section 7,5 *Materials and methods*.

6.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques effectuées sur les différentes variables ont été faites selon leur catégorie. Les comparaisons ont été faites entre le groupe témoin, le groupe de patients avec moins de cinq hospitalisations et le groupe de patients présentant cinq hospitalisations et plus. Des tests non paramétriques ont été utilisés puisque les groupes de sujets et de témoins étaient trop faibles pour faire des analyses paramétriques et pour les appairer selon l'âge et le sexe. Ce sont donc des tests de Kruskal-Wallis combinés aux tests de Mann-Whitney qui ont permis de démontrer les différences inter-groupes pour les variables continues et non-appariées (variables démographiques et profil lipidique à jeun). Lorsque la valeur p était inférieure à 0,05, les différences étaient considérées comme statistiquement significatives et les analyses suivantes ont été corrigées pour ces variables selon la méthode de Bonferroni afin de diminuer l'impact des faux positifs [156]. Des tests de Chi-carré ont été réalisés sur les variables dichotomiques (comparaison de la fréquence de l'allèle mineur chez les SNP découverts). Ainsi, il est possible de vérifier si une association positive est présente entre les différents variants découverts. Des analyses de variants combinées ont également été faites selon la méthode Chi-carré pour vérifier si une combinaison de plusieurs variants serait significative. Ces analyses ont pu être réalisées en utilisant le nombre de sujets possédant au moins un allèle muté dans les deux variants identifiés. Pour terminer, des analyses de régression multiple, contrôlées pour l'âge, le genre, et le statut de fumeur, ont été effectuées pour vérifier l'impact des variants découverts sur le risque.

L'histoire familiale de pancréatite a aussi été analysée de cette même façon. Le groupe de sujets témoins a été utilisé comme référence de comparaison pour ces analyses.

Chapitre VII : Article

7.1 Avant-propos

Cet article vise à répondre à l'objectif principal du présent mémoire, soit d'identifier des marqueurs génétiques de risque de pancréatite chez les patients LPLD avec hyperTG sévère. Les gènes candidats, *CTRC* et *SPINK1*, ont été sélectionnés tels que décrits dans le chapitre précédent.

Ma contribution à cette étude a débuté avec la revue de littérature de l'hypertriglycéridémie, de la LPLD et de la pancréatite. J'ai ensuite participé à la sélection des gènes candidats (*CTRC* et *SPINK1*). J'ai aussi réalisé toutes les activités de laboratoire, dont l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons sanguins, l'amplification de cet ADN, le séquençage et l'analyse des résultats avec les outils bio-informatiques. J'ai également participé aux analyses statistiques ainsi qu'à la rédaction du manuscrit et à sa soumission. Dre Karine Tremblay a, quant à elle, conçu l'étude, supervisé les activités du laboratoire, participé aux analyses statistiques ainsi qu'à la rédaction du manuscrit. Dre Diane Brisson a supervisé le génotypage de la *LPL*, participé aux analyses statistiques et a révisé le manuscrit. Finalement, Dr Daniel Gaudet a également conçu l'étude et a supervisé l'ensemble des activités cliniques et de laboratoire. De plus, il a révisé le manuscrit et accepté sa version finale pour la soumission et la publication.

Tous les coauteurs ont donné leur accord afin que cet article puisse être inséré dans le mémoire.

Finalement, cet article a été publié dans le journal *Frontiers in Genetics*, en avril 2014, (volume 5, article 90) et certains changements dans le format ont été appliqués pour garder l'uniformité avec le mémoire.

Association of *CTRC* and *SPINK1* Gene Variants with Recurrent Hospitalizations for Pancreatitis or Acute Abdominal Pain in Lipoprotein Lipase Deficiency

Camélia Dubois-Bouchard, BSc^{1†}, Karine Tremblay, PhD^{1†}, Diane Brisson, PhD, CCRP¹, Daniel Gaudet, MD, PhD^{1*}

¹ Department of Medicine, Université de Montréal and ECOGENE-21 Clinical Research Center, Saguenay, QC, Canada.

[†] Authors contributed equally.

***Corresponding Author**

Daniel Gaudet, MD, Ph.D.

Université de Montréal, Department of Medicine,

ECOGENE-21 Research Center

Pavillon des Augustines (5th floor)

305 St-Vallier street

Chicoutimi, QC, Canada, G7H 5H6

Word count

3294

Running Title

Association of *CTRC* and *SPINK1* with Pancreatitis in LPLD

Keywords

Severe hypertriglyceridemia, lipoprotein lipase deficiency (LPLD), pancreatitis, *CTRC* gene, *SPINK1* gene, *LPL* gene

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7.2 Résumé

Variants Génétiques Modulateurs de la Récidive de Pancréatite dans la Déficience en Lipoprotéine Lipase

Introduction : Il existe d'importantes variations inter-individuelles dans l'incidence et la gravité de la pancréatite aiguë chez les patients présentant une hyperTG sévère. Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides ou dans la voie des protéases sont connus pour influencer le risque de pancréatite.

Objectif : Évaluer l'association entre les gènes de régulation, *CTRC* et *SPINK1*, dans la voie des protéases, et la récurrence des hospitalisations pour PA ou pour douleurs abdominales sévères chez les patients LPLD. La LPLD est une maladie monogénique rare et un modèle extrême de l'hyperTG sévère et de la pancréatite.

Méthode : Le séquençage des régions promotrices et codantes des gènes *CTRC* et *SPINK1* a été réalisé dans un échantillon de 38 adultes LPLD (22 hommes et 16 femmes) et 100 témoins (53 hommes et 47 femmes). Les associations entre les variants ou les combinaisons de variants découverts dans les gènes *CTRC* et *SPINK1* ont été effectuées en utilisant des analyses de régression multiples non-paramétriques corrigées pour l'âge, le sexe et le statut de fumeur. L'histoire familiale de pancréatite a également été analysée entre les groupes pour vérifier l'impact de ce critère sur les associations.

Résultats : Les analyses effectuées ont suggéré une association positive entre la combinaison des variants rs545634 (*CTRC*) - rs11319 (*SPINK1*) (OR = 41,4 [IC: 2,0 à 848,0]; $p = 0,016$) et la récurrence d'hospitalisations pour pancréatite ou douleur abdominale sévère chez les patients LPLD. De plus, une histoire familiale positive de pancréatite est un prédicteur important des hospitalisations récurrentes indépendamment de la contribution de *SPINK1* ou *CTRC* ($p < 0,001$).

Conclusion : Ces résultats suggèrent qu'une histoire familiale positive de pancréatite et des biomarqueurs génétiques dans la voie des protéases pourraient être associés à un risque d'hospitalisation pour PAR dans l'hyperTG sévère causé par une LPLD.

7.3 Abstract

Background: There are important inter-individual variations in the incidence and severity of acute pancreatitis in patients with severe hypertriglyceridemia. Several genes involved in triglyceride-rich lipoprotein metabolism or serine proteases pathways are known to influence the risk of pancreatitis.

Aim: To evaluate the association between genes regulating serine proteases, chymotrypsin C (*CTRC*) and serine peptidase inhibitor kazal type1 (*SPINK1*), and recurrence of hospitalizations for acute pancreatitis or severe abdominal pain in patients with Lipoprotein Lipase Deficiency (LPLD), a rare and extreme monogenic model of severe hypertriglyceridemia and pancreatitis.

Method: The *CTRC* and *SPINK1* genes promoter and coding regions sequencing has been performed in a sample of 38 LPLD adults (22 men and 16 women) and 100 controls (53 men and 47 women). Estimation of the association of *CTRC* and *SPINK1* gene variants or combinations of variants with history of hospitalizations for pancreatitis or acute abdominal pain in LPLD was investigated using non parametric analyses with correction for multiple testing and logistic regression models controlling for age, gender and smoking status.

Results: Gene sequencing followed by genotype-stratified analyses of the *CTRC* and *SPINK1* genes in LPLD and controls revealed a positive association between recurrence of hospitalizations and the rs545634 (*CTRC*) - rs11319 (*SPINK1*) combination (OR = 41.4 [CI: 2.0-848.0]; p=0.016). In all models, a positive family history of pancreatitis was a significant predictor of recurrent hospitalizations independently of the contribution of *SPINK1* or *CTRC* (p<0.001).

Conclusion: These results suggest that a positive family history of pancreatitis and genetic markers in the serine protease pathways could be associated with a risk of recurrent hospitalization for acute pancreatitis in severe hypertriglyceridemia due to LPLD.

7.4 Introduction

Very severe hypertriglyceridemia (defined as fasting plasma TG concentration >10 mmol/L or 900 mg/dl) increases the risk of acute pancreatitis and has a prevalence of approximately 1/600 in North America (Johansen, Kathiresan et al. 2011). Both severe hypertriglyceridemia and acute pancreatitis are associated with important clinical and socio-economic burden (Gaudet, Signorovitch et al. 2013). However, there are important inter-individual variations in the incidence and severity of acute pancreatitis in patients with severe hypertriglyceridemia. Although rare, some extreme forms of severe hypertriglyceridemia and pancreatitis risk exist. This is the case of Lipoprotein Lipase Deficiency (LPLD) [MIM: 238600 - Familial hyperchylomicronemia]. LPLD is a rare monogenic disease transmitted on an autosomal recessive mode (Monsalve, Henderson et al. 1990, Ma, Henderson et al. 1991, Mattei, Etienne et al. 1993, Brunzell and Deeb 2001). It is associated with recurrent, severe abdominal pain, increased risk of acute pancreatitis and other morbidities such as pulmonary embolism-like syndrome, coronary heart disease with or without atherosclerosis, and metabolic consequences of pancreatic insufficiency, including insulinopenic diabetes (Brunzell and Deeb 2001, Tremblay, Methot et al. 2011). Although rare, LPLD is the most common form of the Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS). The estimated worldwide prevalence of LPLD is 1-2:1,000,000 (Fredrickson, Goldstein et al. 1978). Numerous loss-of-function lipoprotein lipase gene (*LPL*) [MIM:609708] mutations were identified, but only a small number are null alleles, one recognized to be responsible to the markedly reduced or absent lipoprotein lipase activity observed in LPLD (Brunzell and Deeb 2001). LPLD results in chylomicrons accumulation and severe hypertriglyceridemia (>10 mmol/L) in the fasting state, and is associated with characteristic clinical signs such as eruptive xanthomas, lipaemia retinalis, and hepatosplenomegaly (Brunzell and Deeb 2001). Other causes of FCS are documented, such as apolipoprotein C-II (*APOC2*), glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (*GPIHBP1*), lipase maturation factor 1 (*LMF1*) or apolipoprotein A-V (*APOA5*) gene deficiencies, which all result in functional LPLD (Surendran, Visser et al. 2012). Currently, no available lipid-lowering drug therapy is effective to control the risk associated with LPLD, and affected patients typically do not respond to fibrates or niacin (Brisson,

Tremblay et al. 2010, Zhou and Sahin-Toth 2011, Beer, Zhou et al. 2012). LPLD, like all other causes of FCS, is predominantly treated by severe dietary fat restriction and the use of medium-chain triglycerides (MCT) (Brunzell and Deeb 2001), which does not fully eliminate the risk of pancreatitis or disease progression, while interfering with patient's quality of life on a daily basis. Recently, *LPL* gene replacement therapy (Gaudet, de Wal et al. 2010, Gaudet, Methot et al. 2012) has been approved in Europe for severely affected LPLD patients. New emerging classes of treatments are in clinical development for FCS, including (among others) DGAT-1 inhibitors (Meyers, Gaudet et al. 2012), apoC3 antisense therapy, MTP inhibitors (Sacks, Stanesa et al. 2013) and peptide linker technologies.

As in many Mendelian diseases, important variations are noted in the clinical expression of LPLD. In particular, the incidence and the severity of abdominal pain and acute pancreatitis vary importantly across an individual's lifespan and between affected individuals, even in the same family. Although the pancreatitis risk is extremely high in LPLD (Tremblay, Methot et al. 2011), some patients do not experience a crisis before advanced age while others were frequently hospitalized since young age or eventually die from complications. Such heterogeneity in LPLD phenotypic expression complicates the individualization of risk evaluation and stratification.

The genetic basis of pancreatitis is now well documented and numerous candidate genes have been reported (Chen and Ferec 2009, Whitcomb 2010, Whitcomb 2013). All these genes could theoretically influence the trajectory of pancreatitis risk in LPLD. The variability of pancreatitis expression in LPLD is obviously complex and can also be affected by several environmental factors and by epigenetic regulatory mechanisms such as methylation, and/or microRNA (Jiang, Bressler et al. 2004, Chahwan, Wontakal et al. 2011). In this study, we used a candidate gene approach to evaluate the association between the recurrence of hospitalization for acute pancreatitis or severe abdominal pain in patients with LPLD and genes known to contribute to pancreatitis susceptibility. Specifically, we have selected the chymotrypsinogen C (*CTRC*) and serine protease inhibitor Kazal-type 1 (*SPINK1*) genes based on their important physiological role in serine proteases regulation and because they might have a functional relation with LPLD through the high density lipoprotein (HDL) particle which is significantly affected in this

disease. In particular, the HDL cholesterol concentration, and the number of HDL particles are significantly decreased in LPLD. HDL is an efficient carrier of alpha(1)-antitrypsin and has been reported to play a significant role in proteases inhibition.

7.5 Materials and methods

7.5.1 Subjects

A total of 138 Caucasian adults participated in this study: 100 normolipemic controls and 38 genetically confirmed patients with LPLD. All LPLD patients were identical-by-descent (IBD) homozygotes or compound heterozygous for null alleles in the LPL gene and presented fasting plasma TG values >10 mmol/L and clinical characteristics of FCS (Gaudet, Vohl et al. 1998, Gagné and Gaudet 2007, Tremblay, Methot et al. 2011). Null *LPL* alleles are associated with <5% normal LPL activity. Fasting plasma TG, cholesterol, non-esterified fatty acids and apolipoprotein B (apo B) were measured as previously described (St-Pierre, Vohl et al. 2001). Among the 38 LPLD participants, 18 had a history of recurrent (≥ 5) hospitalizations for severe abdominal pain or acute pancreatitis whereas 8 had not yet been hospitalized for such condition. Overall, approximately 80% of LPLD patients had already suffered from at least one episode of pancreatitis or abdominal pain requiring hospitalization and the number of hospitalizations per individual ranged between 0 to 96. Calculation of the number of hospitalizations for pancreatitis or severe abdominal pain was performed by questionnaire and by reviewing patient's medical charts. Applying the criteria of the Atlanta classification for pancreatitis (Banks, Bollen et al. 2013), the hospitalizations having been considered in this study group all definite, probable and suspected pancreatitis episodes. Hospitalizations for conditions clearly not suspected to be related to FCS (eg: appendectomy, parietal pain) were not considered in the analyses. We have also evaluated the positive family history of pancreatitis. This condition was considered "positive" when at least one known relative (available in our database) has already been hospitalized for acute pancreatitis. Not all patients were related. All LPLD patients have been followed in a Lipid Clinic, received nutritional counseling and were prescribed a strict type-1 adapted low fat diet. This study has been approved by the Local Ethics Review Board in accordance with the Declaration of Helsinki and all subjects gave informed consent.

7.5.2 *CTRC* and *SPINK1* Sequencing

DNA has been extracted from blood leukocytes of all participants using Qiagen kit and following manufacturer's instruction (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). *CTRC* [1p36.21 - GeneID: 11330] and *SPINK1* [5q32 - GeneID: 6690] sequences information were obtained

from UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, University of California, Santa Cruz, CA, USA). For *CTRC*, the PCR was divided into seven regions that spanned 3.1 kb, covering all eight coding and promoter sequences (Figure 5). For *SPINK1*, the PCR was divided into four regions that spanned 2.2 kb, covering all four coding and promoter regions (Figure 5). Analysis of sequences were performed with CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>, CodonCode Corporation Dedham, MA, USA). Oligonucleotide sequences as well as PCR amplification specific annealing temperatures are listed in the Table III. The PCR reactions were performed in 25 μ L volume containing 0-1 mM of Magnesium Chloride, 1X of Qiagen HotStart Taq PCR Buffer or 1X of NEB Taq PCR Buffer, 0.25 mM of dNTPs, 1 U/reaction of HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen, Valencia, Ca, USA or New England Biolabs Inc., Ipswich, Ma, USA), 0.2 μ M of each primer and 20 ng/ μ l human genomic DNA. The PCR amplification was performed at 95°C for 10 minutes, 35 cycles of: first, 94°C during 30 seconds, secondly, annealing temperature for 30 seconds and thirdly, 72°C for 30 seconds. Finally, one cycle was performed at 72°C for 7 minutes. Amplification products were purified with multiscreen PCR plates (MSNU 030 PCR, Millipore Corporation, Bedford, Ma, USA). Sequencing reactions were done in 10 μ L volume containing 2 μ L of purified and diluted PCR product, 0.3 μ L of BigDye terminator v1.1 (Applied Biosystem Inc., Foster City, Ca, USA), 1.75 μ L of BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystem Inc., Foster City, Ca, USA) and 0.5 μ L of the forward or reverse PCR primer (Table III). The sequencing reaction cycles were done following manufacturer's instructions (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit). Reaction sequences were precipitated in 3 M of sodium acetate (Ambion®, Foster City, Ca, USA) and 95% ethanol, resuspended in 10 μ L of Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystem Inc., Foster City, Ca, USA) and analyzed on ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc.).

Table III. *CTRC* and *SPINK1* Sequencing Oligonucleotides and PCR Conditions

Genes [GeneID]	Regions	Chromosome Location ^a	Primer Sequences ^b	PCR Product Size (bp)	PCR T _m (°C)	Sequenced Strand
CTRC 1p36.21 [11330]	Promoter + Exon 1	15764135-15765024	F: 5'-ACCGCGTCTATTTTCATGTTGTT-3' R: 5'-ACTCCCCATCCCGTCCTT-3'	987	56	F and R
	Exon 2 + Exon 3	15766644-15767095	F: 5'-AACAAGGCCTAGAGACCTGG-3' R: 5'-TGCACAACCTGAGTTACTGGG-3'	596	66	R
	Exon 4	15768818-15769071	F: 5'-GGAAAGGACAATGGGAACAC-3' R: 5'-GTCATTTGCTGGCTTTCCA-3'	384	56 ^c	R
	Exon 5	15769796-15770169	F: 5'-GTTTGTGAAGGACCCCTGAG-3' R: 5'-TGTCTGTCACATGGTATGTGCT-3'	420	51	F
	Exon 6	15770972-15771318	F: 5'-GTGGTCCGCACACTGTCTC-3' R: 5'-GCTTACCCTGAGCCTGCTG-3'	416	61.7	R
	Exon 7	15772057-15772375	F: 5'-GAGGCCAAATCTGTCCACTAA-3' R: 5'-ATGCATGAATGAGTGAATAAATGA-3'	405	61.7	F
	Exon 8	15772888-15773371	F: 5'-TGAGAGTAGGGGAACAGAGGG-3' R: 5'-CCTGTTCGCAGCTTGTGAGA-3'	626	66	F
	SPINK1 5q32 [6690]	Exon 1	147212340-147211390	F: 5'-CAGGCTTGAGAAGGGAATGA-3' R: 5'-AACAAAGGGTCAGCCACATC-3'	641	56
Exon 2		147211350- 147211062	F: 5'-AAGGGTGGGGAATGAAAGAG-3' R: 5'-ATATACGCCTGTGGGTTGGA-3'	334	56	R
Exon 3		147209295-147209053	F: 5'-GCAGAGGCATGACTTAAAACAA-3' R: 5'-CATGCTAAGGTTTCAGTTGCTG-3'	644	56	R
Exon 4		147207836-147207337	F: 5'-AAGATTATAAATCTCAAACCTCTCCAA-3' R: 5'-ATGAGGGAAACCCTGTCTGA-3'	387	51	F
Promoter		147204383-147204162	F: 5'-TGGCAGAAGGCACAGACTC-3' R: 5'-TGAAACATGCAAGGCAAAGA-3'	968	56	R

Abbreviations used: F = Forward primer, R = Reverse primer, T_m = Annealing temperature.

^a Position in UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, February 2009).

^b As obtained by Primer 3 (Untergasser, Cutcutache et al. 2012).

^c Taq DNA polymerase Qiagen (Qiagen Inc., Toronto, Canada). Taq DNA polymerase New England Biolabs (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) for all other PCR conditions.

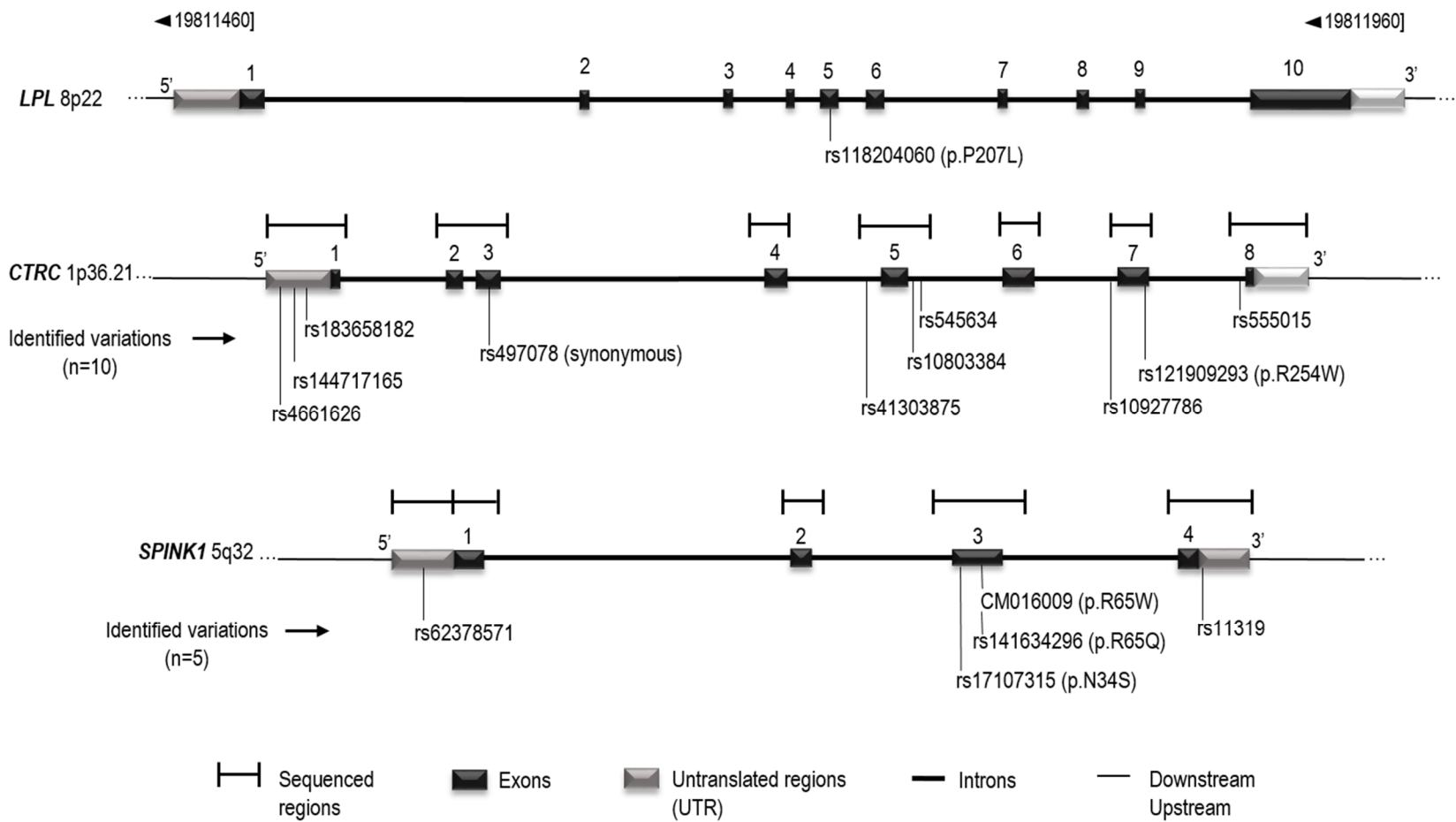


Figure 5: Schematic representation of the *LPL*, *CTRC* and *SPINK1* genes structure.

The gene representation is based on UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, February 2009, Santa Cruz, Ca, USA) and Ensembl (<http://uswest.ensembl.org/index.html>, september 2013, Cambridge, United Kingdom), and is not scaled. *CTRC* and *SPINK1* sequenced regions and identified variants are indicated. Complementary informations on sequenced regions are available in Table III.

7.5.3 Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using SPSS software (IBM Corporation, SPSS Statistics for Windows, Versions 11.5.0 and 21.0, Armonk, NY, USA). Continuous variable comparisons between the different phenotypes were done using Kruskal-Wallis non-parametric tests combined to Mann-Whitney tests to perform inter-group comparisons. P-values are reported after Bonferroni correction for multiple testing. Chi-Square tests were used to compare dichotomic variables as well as minor allele frequencies and genotypes distribution between studied groups, and z-test was performed to inter-group comparisons. P-values were also adjusted using the Bonferroni method. For interaction analyses, significance level was fixed at $p \leq 0.005$ since we have tested 10 SNPs combinations. Estimation of the association of *CTRC* and *SPINK1* variants or combinations with recurrent (≥ 5) hospitalizations for pancreatitis or acute abdominal pain in LPLD was also investigated using multinomial logistic regression models controlling for age, gender, and smoking status. Subjects with known alcohol abuse or known to be non-compliant to the diet were excluded from the study even if no subjects were in this situation in our groups. In regression models, comparisons were made using normolipidemic controls as the reference. Results are reported for the groups of LPLD patients with ≥ 5 or < 5 hospitalizations as odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) at a significance level fixed at $p < 0.05$.

7.6 Results

The characteristics of the two LPLD groups (defined on the basis of the number of hospitalizations for pancreatitis or abdominal pain) and controls are presented in Table 4. LPLD patients had significantly higher total triglyceride and cholesterol levels, and lower LDL-C and HDL-C than controls. Both LPLD groups were comparable for all lipid-lipoprotein variables, including total cholesterol, HDL-C, non-esterified fatty acids and total apolipoprotein B. LPLD subjects with recurrent hospitalizations were older, in addition to present a higher proportion of smokers than controls. They also presented a greater proportion of positive family history of pancreatitis than controls and LPLD subjects with <5 hospitalizations. All groups were comparable for body mass index.

Table IV also presents the compared frequency of the *CTRC* and *SPINK1* variants showing an association with recurrent hospitalizations for pancreatitis or acute abdominal pain while Table V presents the characteristics of all *CTRC* and *SPINK1* variants (n=15) identified through gene sequencing in the different groups. All identified variants are single nucleotide polymorphisms (SNP) located in coding, non-coding or untranslated regions (Table V and Figure 5). The Table VI presents the associations in more details. Minor allele frequency comparisons between the studied groups revealed a trend of association with recurrent pancreatitis for only three SNPs (p-values < 0.2) (Table VII). Of note, among the eight LPLD individuals who had never been hospitalized for pancreatitis, the rs545634 was not observed while three heterozygous were observed for rs10927786 and one heterozygous for rs11319. We then performed two-by-two interaction analyses among the associated SNPs (Table IV). At a significance level of 0.005, only one SNP combination, *CTRC* (rs545634) and *SPINK1* (rs11319), showed a positive association after correction for multiple testing (p < 0.001). Genotype-stratified analyses confirmed that all subjects carrying this combination were heterozygotes (p<0.001). We have then evaluated the association of this *CTRC* (rs545634) and *SPINK1* (rs11319) combination with recurrent pancreatitis in logistic regression analysis, including age, gender and smoking status as covariates (Table VI). Results of multivariate analyses confirmed the association of the rs545634-rs11319 SNPs combination with an increased odd of recurrent hospitalizations for acute pancreatitis or severe abdominal pain (OR = 41.4, p = 0.016). A positive family history of pancreatitis was also a significant covariate of

recurrent hospitalizations in all groups ($p < 0.001$). When the family history was included in the regression models, the contribution of *SPINK1-CTRC* combination to the risk of hospitalization for pancreatitis or abdominal pain remained significant ($p = 0.032$).

Table IV. Characteristics of the Participants

	Controls n = 100	Severe Hypertriglyceridemia (LPLD)		p-value ^f
		<5 hospitalizations	≥ 5 hospitalizations	
		n = 20	n = 18	
Demographics				
Age (years; geometric mean (SD))	41.8 (16.3)	43.2 (17.1)	53.2 (13.6) ²	0.023
Gender (M/F (ratio))	53/47 (1.1)	12/8 (1.5)	10/8 (1.3)	0.843
Body Mass Index (kg/m ² ; geometric mean (SD))	24.0 (4.0)	22.7 (5.3)	22.6 (3.0)	0.303
Smoking Status (n (%)) ^a	56 (56.0)	11 (68.8)	14 (93.3) ²	0.020
Family History of Pancreatitis (n (%)) ^b	6 (6.4)	7 (46.7) ¹	13 (92.9) ^{2,3}	< 0.001
Hospitalizations (median (range)) ^c	0	1 (0-4)	16 (5-96) ³	< 0.001
Fasting Lipid Profile				
Total Triglycerides (mmol/L; median (range))	0.9 (0.3-1.8)	27.7 (14.9-60.8) ₁	33.3 (14.4-75.3) ₂	< 0.001
Total Cholesterol (mmol/L; median (range))	4.2 (3.0-6.8)	6.9 (3.0-18.9) ¹	6.5 (3.6-15.1) ²	< 0.001
LDL-Cholesterol (mmol/L; median (range))	2.1 (1.2-3.5)	0.6 (0.2-2.3) ¹	0.5 (0.2-1.5) ²	< 0.001
HDL-Cholesterol (mmol/L; median (range))	1.3 (0.7-2.2)	0.4 (0.2-0.6) ¹	0.3 (0.2-0.5) ²	< 0.001
Plasma NEFA (mmol/L; median (range))	0.5 (0.1-1.1)	0.5 (0.0-2.4)	0.5 (0.2-1.1)	0.629
Total apolipoprotein B (mmol/L; median (range))	0.7 (0.4-1.4)	0.7 (0.3-1.8)	0.6 (0.3-2.1)	0.934
SNP Distribution^d				
rs545634	13 (0.071)	1 (0.025)	5 (0.139)	0.158 ^g
<i>CTRC</i> rs10927786	27 (0.175)	10 (0.275)	9 (0.333)	0.055 ^g
<i>SPINK1</i> rs11319	6 (0.003)	1 (0.025)	4 (0.111)	0.063 ^g
SNP Combination Distribution^e				
<i>CTRC</i> rs545634 - rs11319	1 (1.0)	0	4 (22.2) ^{2,3}	<0.001 ^g
+ <i>SPINK1</i> rs10927786 - rs11319	1 (1.0)	0	0	0.847 ^g

Abbreviations used: *CTRC* = Chymotrypsin C, F = Female, HDL = High-density lipoprotein, LDL = Low-density lipoprotein, LPLD = Lipoprotein lipase deficiency, M = Male, MAF = Minor allele frequency, NEFA = Non-esterified fatty acids, SD = Standard deviation, SNP = Single Nucleotide Polymorphism, *SPINK1* = Serine peptidase inhibitor, kazal type 1.

^a Subjects who ever smoked (current or ex-smokers).

^b At least one member of the family who had at least one pancreatitis episode. Complete family history was not available for all controls and LPLD subjects.

^c Calculated on 13 subjects in ≥ 5 hospitalizations group.

^d Presented as number of heterozygous and homozygous mutant subjects (MAF).

^e Presented as number of subjects possessing at least one mutant allele in both identified variants (%) (meaning all subjects are heterozygous or heterozygous/mutant homozygous).

^f Kruskal-Wallis (for continuous variables) and Pearson Chi-Square (for dichotomic variables). Group comparisons were done using Mann-Whitney or test-z adjusted with Bonferroni method. ¹ indicates significant difference ($p \leq 0.05$) between <5 hospitalizations vs controls; ² between ≥ 5 hospitalizations vs controls; and ³ between <5 hospitalizations vs ≥ 5 hospitalizations.

^g Chi-square or Fischer exact tests p-value. Group comparisons were done using test-z adjusted with Bonferroni method. ¹ indicates significant difference ($p \leq 0.05$) between <5 hospitalizations vs controls; ² between ≥ 5 hospitalizations vs controls; and ³ between <5 hospitalizations vs ≥ 5 hospitalizations.

Table V. Genetic Characteristics of the *CTRC* and *SPINK1* Variants Identified

Gene [GeneID]	Identified Variant ^a	Base Change	Gene Location ^b		Amino Acid Predicted Substitution		MAF	Observed Genotypes			HWE p-value ^f
								HMZ _{common}	HTZ	HMZ _{rare}	
<i>CTRC</i> 1p36.21 [11330]	rs4661626	A>G	Promoter	15764150	-	-	0.412	51	58	27	0.163
	rs144717165	T>C	Promoter	15764869	-	-	0.004	137	1	0	0.966
	rs183658182	T>C	Promoter	15764902	-	-	0.004	137	1	0	0.966
	rs497078	T>C	Exon 3	15767036	S	G60G	0.083	116	21	1	0.963
	rs41303875	A>G	Intron 4	15769845	-	-	0.007	136	2	0	0.932
	rs10803384	A>C	Intron 5	15770101	-	-	0.226	84	44	9	0.333
	rs545634	A>G	Intron 5	15770102	-	-	0.073	118	18	1	0.733
	rs10927786	T>G	Intron 6	15772057	-	-	0.210	92	34	12	0.002
	rs121909293 ^c	T>C	Exon 7	15772212	NS	R254W	0.004	137	1	0	0.966
	rs555015	A>G	Intron 7	15772933	-	-	0.500	34	70	34	0.865
<i>SPINK1</i> 5q32 [6690]	rs62378571	T>C	Promoter	147211947	-	-	0.147	98	36	2	0.520
	rs17107315 ^d	G>A	Exon 3	147207678	NS	N34S	0.011	135	3	0	0.897
	rs141634296 ^e	A>G	Exon 3	147207585	NS	R65Q	0.004	137	1	0	0.966
	CM016009	T>C	Exon 3	147207585	NS	R65W	0.004	137	1	0	0.966
	rs11319	T>C	3'UTR	147204192	-	-	0.040	127	11	0	0.626

Abbreviations used: MAF= Minor allele frequency, HMZ_{common}= Homozygous for the common allele, HTZ= Heterozygous, HMZ_{rare}= Homozygous for the rare mutant allele, HWE= Hardy-Weinberg equilibrium, NS= non-synonymous; S= Synonymous, SNP= Single nucleotide polymorphism, UTR= Untranslated region.

^a UCSC SNP reference number (<http://genome.ucsc.edu/>, February 2009).

^b Position in UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, February 2009).

^c Variant reported to be associated with chronic pancreatitis (Masson, Chen et al. 2008, Zhou and Sahin-Toth 2011, Beer, Zhou et al. 2012).

^d Variant reported to be associated with chronic pancreatitis (Witt, Luck et al. 2000, Chen and Ferec 2009) and acute pancreatitis (Sanchez-Ramirez, Flores-Martinez et al. 2012).

^e Variant reported to be associated with chronic pancreatitis (Boulling, Le Marechal et al. 2007, Kiraly, Boulling et al. 2007).

^f Chi-square test p-value. Variant highlighted in grey is not in HWE ($p \leq 0.001$).

Table VI. *CTRC* and *SPINK1* Mutant Genotypes Distribution Among Subject Studied Groups

Gene	SNP ^a	Controls n = 100	LPLD		p-value ^b
			<5 hospitalizations n = 20	≥ 5 hospitalizations n = 18	
HMZ					
CTRC	rs545634	1 (1.0)	0	0	NS
	rs10927786	8 (8.0)	1 (5.0)	3 (16.6)	NS
HTZ					
CTRC	rs545634	12 (12.0)	1 (5.0)	5 (27.8)	0.101
	rs10927786	19 (19.0)	9 (45.0)	6 (33.3)	0.028
SPINK1	rs11319	6 (6.0)	1 (5.0)	4 (22.2)	0.056

Abbreviations used: *CTRC* = Chymotrypsin C, HMZ = Homozygous, HTZ = Heterozygous, LPLD = Lipoprotein lipase deficiency, n = Number, NS= Non significant, SNP = Single Nucleotide Polymorphism, *SPINK1* = Serine peptidase inhibitor, kazal type 1.

^a Presented as number of HTZ or HMZ subjects for each identified variants (%).

^b Chi-square p-values compared to subjects who are homozygous for the common allele, test-z was made to compare columns proportion and adjusted with Bonferroni method. NS = Non significant at a 0.2 threshold

Table VII. Association of *CTRC* and *SPINK1* SNPs Combination and Family History with Recurrence (≥5) of Hospitalizations for Pancreatitis in Severe Hypertriglyceridemia due to LPLD

Models ^a	LPLD Subjects					
	< 5 hospitalizations			≥ 5 hospitalizations		
	OR	[95% CI]	p-value	OR	[95% CI]	p-value
<i>CTRC-SPINK1</i> SNPs combination	NA	-	-	41.4	2.0 - 848.0	0.016
Family history of pancreatitis	19.6	4.3 – 90.1	<0.001	410.6	29.4 – 5733.8	< 0.001
<i>CTRC-SPINK1</i> SNPs combination + family history of pancreatitis	NA	-	-	148.6	1.5 – 14537.5	0.032

Abbreviations used: CI = 95% confidence interval, *CTRC* = Chymotrypsin C, LPLD = Lipoprotein lipase deficiency, NA = not applicable (the test is not valid due to the absence of cases), OR = odd ratio, *SPINK1* = Serine peptidase inhibitor, kazal type 1.

^a Multinomial regression models tested, including age, gender and smoking status as covariates. The reference category are the normolipemic control subjects (Table III).

7.7 Discussion

Both pancreatitis and hypertriglyceridemia are complex traits and inter-individual variations are regularly observed in the expression of pancreatitis in patients with severe hypertriglyceridemia. Such differences are noticed even in a homogeneous group of individuals affected by LPLD, a disease characterized by extreme plasma triglyceride values and high risk of pancreatitis (Brunzell and Deeb 2001, Tremblay, Methot et al. 2011). LPLD is a very rare disease and we thus report data on one of the largest sample of LPLD patients having been ever published. In this sample, we observed important variations in term of pancreatitis morbidity (assessed by the recurrence of hospitalizations), despite the fact that all patients were carrying the same *LPL* gene defect. Indeed, approximately 80% of LPLD adults in this study had been hospitalized at least once for acute pancreatitis (range: 1 to 96) but 20% had never suffered from pancreatitis, even at age >50. The results presented herein suggest that genetic markers in the serine protease pathways could influence the risk of recurrent hospitalizations for acute pancreatitis or acute abdominal pain in patients with LPLD.

Clinically, the diagnosis of acute pancreatitis requires two of the following criteria: 1) abdominal pain suggestive of acute pancreatitis, 2) serum amylase and/or lipase activity at least three times greater than the upper limit of normal, and 3) characteristic findings of acute pancreatitis on abdominal ultrasonography or on contrast-enhanced computed tomography scanning or magnetic resonance imaging (Frossard, Steer et al. 2008, Banks, Bollen et al. 2013). However, due to severe chylomicronemia, FCS is by nature associated with spurious estimation of several laboratory values and patients can present with pancreatitis and normal amylase or lipase values. Furthermore, imaging results were not available in all patients' medical files. This might lead to underestimating the number of definite pancreatitis episodes in these patients. To overcome this issue, we considered all cases of hospitalizations for acute abdominal pain which were suggestive of pancreatitis. This includes all definite, probable and suspected cases of pancreatitis.

Family history is an important predictor of risk of several lipid-related diseases, including

pancreatitis. In this study, LPLD patients with ≥ 5 hospitalizations for pancreatitis or severe abdominal pain presented at least twice the proportion of positive family history of pancreatitis than that observed in patients with less hospitalizations and controls. The family history is obviously not reflecting the genetic background only and takes into account shared life habits and the environmental background.

Although hereditary forms of pancreatitis exist (LaRusch, Barmada et al. 2012), the majority of genes having been associated with pancreatitis explain the predisposition, rather than the cause, of acute pancreatitis. All FCS causing genes, including *LPL* are well-documented pancreatitis susceptibility genes. Pancreatitis is a complex disease and the mechanisms explaining the pancreatitis risk in LPLD are not clearly understood. One hypothesis is that large chylomicrons lodged in pancreatic capillaries expose them to pancreatic lipase, with the subsequent release of free fatty acids through the hydrolysis of chylomicron-associated triglycerides. Local high concentrations of free fatty acids are thought to damage pancreatic cells leading to pancreatitis (Ross, Twisk et al. 2004, Rip, Nierman et al. 2005, Rip, Nierman et al. 2006, Ross, Twisk et al. 2006, Gaudet, de Wal et al. 2010). Another hypothesis is that phospholipids and oxidized phospholipids at the surface of buoyant-chylomicrons once hydrolyzed by phospholipase serve as triggers for proteases. In all cases, if enough proteases become activated intracellularly, they can overcome the first line of defense (pancreatic secretory trypsin inhibitor) and resist backup defenses (proteolytic degradation). Activated cationic trypsin can then trigger the entire zymogen activation cascade (Frossard, Steer et al. 2008). It is possible that mutations in *CTRC* and *SPINK1* genes contribute to this process and further increase the pancreatitis risk conferred by LPLD by either increasing the level of activated proteases, blocking active site of trypsin or decreasing proteases degradation. Indeed, mutant variants in *CTRC* and *SPINK1* genes are known to contribute to pancreatitis susceptibility (Chen and Ferec 2009, Whitcomb 2010). *CTRC* encodes the protease chymotrypsin C, a protease produced in small quantities by the acinar cells and found in an inactive form in the zymogen granules (Szmola and Sahin-Toth 2007), which degrades trypsin when trypsinogen is prematurely activated in the pancreas (Szmola and Sahin-Toth 2010). Genetic variations in *CTRC* can predispose to chronic pancreatitis by diminishing its protective trypsin-

degrading activity (Szmola and Sahin-Toth 2007, Rosendahl, Witt et al. 2008, Whitcomb 2010). *SPINK1* encodes pancreatic secretory trypsin inhibitor, which prevents trypsin-catalyzed premature activation of zymogens within the pancreas and the pancreatic duct (Chen and Ferec 2009, Ohmuraya and Yamamura 2011, Kume, Masamune et al. 2012). Mutations in this gene have been associated with hereditary pancreatitis (Ohmuraya and Yamamura 2011, Ohmuraya, Sugano et al. 2012), and it is thought to function in the prevention of trypsin-catalyzed premature activation of zymogens within the pancreas. *CTRC* and *SPINK1* have pleiotropic functions but their role in serine proteases (trypsin and chymotrypsin) physiology is shared in common. This might explain why the effect of the combination of variants in these two genes on risk of pancreatitis in LPLD was more pronounced than single variants effect in the present study, *CTRC*-rs545634, located in the 5th intron, could be responsible of an alternate splicing site which would affect this enzyme's integrity and its inhibitory effect, combined to *SPINK1*-rs11319, located in the 3'UTR, that could affect mRNA stability and be responsible of a lesser production of this trypsin inhibitor, may be compatible with an increased pancreatitis risk. Further functional studies on these variants are needed to elucidate the role of their mutant allele in this hypothetical loss of inhibitory function responsible of their associated pancreatitis risk in LPLD.

Trypsin and chymotrypsin are two structurally similar serine proteases synthesized in the pancreas as inactive zymogen precursors (trypsinogen and chymotrypsinogen) secreted in the duodenum via the pancreatic duct and converted to the mature, active enzyme by proteolysis (Frossard, Steer et al. 2008, Whitcomb 2010). They recognize different protein substrates. Trypsinogen and chymotrypsinogen also enter the bloodstream, where they can be detected in serum (Artigas, Garcia et al. 1981). In blood, serine proteases of the trypsin-like family have long been recognized to be critical effectors of biological processes as diverse as blood coagulation, fibrinolysis, and immunity (Antalis, Bugge et al. 2011). Serum trypsin levels have been shown to be significantly higher in acute pancreatitis patients than in controls (Artigas, Garcia et al. 1981). Mass spectrometry and western blotting have shown that HDL are efficient carriers of alpha(1)-antitrypsin (Ortiz-Munoz, Houard et al. 2009). HDL-associated alpha(1)-antitrypsin appears to be able to inhibit trypsin activity, extracellular matrix degradation, cell detachment, and apoptosis induced by proteases in human vascular smooth muscle cells. The number of HDL particles and their cholesterol content is in general very low in the presence of severe hypertriglyceridemia, a feature systematically

observed in LPLD. It is possible that low HDL-associated alpha(1)-antitrypsin is a factor contributing to LPLD morbidity, including hepatomegaly and deleterious liver effects, in the presence of mutant alleles in protease-regulating genes, such as *CTRC* and *SPINK1*. Clinically, serum serine proteases have been directly associated with triglycerides metabolism, including GPIHPB1-related factors and glycosylphosphatidylinositol linkage (Deeg and Bowen 2002). Severe hypertriglyceridemia induced by PEG-L-Asparaginase in patients treated for acute lymphocytic leukemia can induced acute pancreatitis in patients undergoing chemotherapy (Konig and Malek 2012). This has been associated with increased levels of serum trypsin and elastase 10 and 20 days after beginning L-asparaginase therapy (Shimizu, Yamashiro et al. 1998). Alcohol abuse is associated with both hypertriglyceridemia, and proteases activation (Joly, Sesboue et al. 1992). It is one of the most common cause of acute pancreatitis (Thrower, Husain et al. 2008). In this study, we excluded all known cases of alcohol abuse, although it is almost not viable long term in FCS due to the nature of the disease and the huge risk of heavy alcohol consumption for these patients. The links between the proteases networks and lipid metabolism are complex and the connection with pancreatitis risk and other morbidities in LPLD remain to be documented.

This study has limitations. LPLD is an ultra-rare, and extreme cause of hypertriglyceridemia and is thus not representative of all causes of severe hypertriglyceridemia. The rarity of LPLD, implies that we have to deal with small sample size which also limits the power of the association studies. Despite this, the results suggest that genetic markers in the proteases cascade could be associated with the expression of pancreatitis in LPLD. However, functional analyses were not performed in this study and we cannot infer at this point that there is a physiological association between protease regulators and the recurrence of pancreatitis in the presence of severe hypertriglyceridemia. Our findings need to be validated and replicated in larger LPLD and severe hypertriglyceridemia cohorts and the functional effect of identified variants needs to be characterized before this SNP-combination could be considered as a clinical biomarker of recurrence of pancreatitis in LPLD. Since other genes are known to confer pancreatitis susceptibility, additional analyses are needed to understand the complex genetic architecture of pancreatitis in LPLD. Such studies, including whole genome sequencing, resequencing of extremes, functional gene expression analyses, physiological and metabolic studies, are actually underway.

7.8 Author contributions

KT co-designed the study, co-supervised the *CTRC* and *SPINK1* genes sequencing, performed the statistical analyses and drafted the manuscript. CDB participated in the review of the literature, the selection of candidate genes and in *CTRC* and *SPINK1* genes sequencing activities under KT supervision. She also participated in the statistical analyses and to the writing of the manuscript. DB supervised *LPL* genotyping, participated in statistical analyses and revised the manuscript. DG co-designed and supervised the study, coordinated the clinical tasks, revised the manuscript and approved the version to be published. During the study, CDB was a Université de Montréal MSc student and KT a Université de Montréal postdoctoral fellow, both under DG supervision.

7.9 Acknowledgments

Authors are thankful to all participants and to the staff of the ECOGENE-21 Clinical Research Center. KT is a Université de Montréal postdoctoral and CCRP fellow, and was the recipient of bursary of excellence from the Canadian Heart and Stroke Foundation and from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec”. CDB is a master student who received a graduate bursary from the Dept of Medicine of the Université de Montréal. DG had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. This study was supported by a Canadian Institutes of Health Research team grant (# CTP-82941).

7.10 References

- Antalis, T. M., T. H. Bugge and Q. Wu (2011). "Membrane-anchored serine proteases in health and disease." Prog Mol Biol Transl Sci **99**: 1-50.
- Artigas, J. M., M. E. Garcia, M. R. Faure and A. M. Gimeno (1981). "Serum trypsin levels in acute pancreatic and non-pancreatic abdominal conditions." Postgrad Med J **57**(666): 219-222.
- Banks, P. A., T. L. Bollen, C. Dervenis, H. G. Gooszen, C. D. Johnson, M. G. Sarr, G. G. Tsiotos and S. S. Vege (2013). "Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus." Gut **62**(1): 102-111.
- Beer, S., J. Zhou, A. Szabo, S. Keiles, G. R. Chandak, H. Witt and M. Sahin-Toth (2012). "Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk." Gut **62**(11): 1616-1624.
- Boulling, A., C. Le Marechal, P. Trouve, O. Raguene, J. M. Chen and C. Ferec (2007). "Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene." Eur J Hum Genet **15**(9): 936-942.
- Brisson, D., M. Tremblay, J. Methot, K. Tremblay and D. Gaudet (2010). "Comparison of the Efficacy of Fibrates on Hypertriglyceridemic Phenotypes With Different Genetic and Clinical Characteristics. ." Pharmacogenetics and genomics (**in press**).
- Brunzell, J. and S. Deeb (2001). "Familial lipoprotein lipase deficiency, apo CII deficiency and hepatic lipase deficiency. ." In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8 ed. McGraw-Hill, NY, 2001 pp 2789-2816.
- Chahwan, R., S. N. Wontakal and S. Roa (2011). "The multidimensional nature of epigenetic information and its role in disease." Discov Med **11**(58): 233-243.
- Chen, J. M. and C. Ferec (2009). "Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 63-87.
- Deeg, M. A. and R. F. Bowen (2002). "Phosphorylation decreases trypsin activation and apolipoprotein al binding to glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D." Biochem Cell Biol **80**(2): 253-260.
- Fredrickson, D. S., J. L. Goldstein and M. S. Brown (1978). "The familial hyperlipoproteinemias, in: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed. New York, McGraw-Hill, p 604."
- Frossard, J. L., M. L. Steer and C. M. Pastor (2008). "Acute pancreatitis." Lancet **371**(9607): 143-152.
- Gagné, C. and D. Gaudet (2007). Les dyslipoprotéinémies : l'approche clinique, Lipimed Communications.

- Gaudet, D., J. de Wal, K. Tremblay, S. Dery, S. van Deventer, A. Freidig, D. Brisson and J. Methot (2010). "Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency." Atheroscler Suppl **11**(1): 55-60.
- Gaudet, D., J. Methot and J. Kastelein (2012). "Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency." Curr Opin Lipidol **23**(4): 310-320.
- Gaudet, D., J. Signorovitch, E. Swallow, L. Fan, K. Tremblay, D. Brisson, C. Meyers and J. B. Gruenberger (2013). "Medical resource use and costs associated with chylomicronemia." J Med Econ **16**(5): 657-666.
- Gaudet, D., M. C. Vohl, P. Julien, G. Tremblay, P. Perron, C. Gagne, J. Bergeron, S. Moorjani and J. P. Despres (1998). "Relative contribution of low-density lipoprotein receptor and lipoprotein lipase gene mutations to angiographically assessed coronary artery disease among French Canadians." Am J Cardiol **82**(3): 299-305.
- Jiang, Y. H., J. Bressler and A. L. Beaudet (2004). "Epigenetics and human disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **5**: 479-510.
- Johansen, C. T., S. Kathiresan and R. A. Hegele (2011). "Genetic determinants of plasma triglycerides." J Lipid Res **52**(2): 189-206.
- Joly, J. P., R. Sesboue, B. Hillemand and J. P. Martin (1992). "Serum trypsin-like activity in chronic alcoholized men: possible relationship with lipids, apoA-1 and apoB lipoproteins." Alcohol Alcohol **27**(5): 563-569.
- Kiraly, O., A. Boulling, H. Witt, C. Le Marechal, J. M. Chen, J. Rosendahl, C. Battaggia, T. Wartmann, M. Sahin-Toth and C. Ferec (2007). "Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis." Hum Mutat **28**(5): 469-476.
- Konig, M. and R. Malek (2012). "PEG-L-Asparaginase Induced Hypertriglyceridemia " Endocr Rev **33** (03_MeetingAbstracts).
- Kume, K., A. Masamune, H. Ariga, S. Hayashi, T. Takikawa, S. Miura, N. Suzuki, K. Kikuta, S. Hamada, M. Hirota, A. Kanno and T. Shimosegawa (2012). "Do genetic variants in the SPINK1 gene affect the level of serum PSTI?" J Gastroenterol **47**(11): 1267-1274.
- LaRusch, J., M. M. Barmada, S. Solomon and D. C. Whitcomb (2012). "Whole exome sequencing identifies multiple, complex etiologies in an idiopathic hereditary pancreatitis kindred." JOP **13**(3): 258-262.
- Ma, Y., H. E. Henderson, V. Murthy, G. Roederer, M. V. Monsalve, L. A. Clarke, T. Normand, P. Julien, C. Gagne, M. Lambert and et al. (1991). "A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians." N Engl J Med **324**(25): 1761-1766.
- Masson, E., J. M. Chen, V. Scotet, C. Le Marechal and C. Ferec (2008). "Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis." Hum Genet **123**(1): 83-91.

- Mattei, M. G., J. Etienne, J. C. Chuat, V. C. Nguyen, D. Brault, A. Bernheim and F. Galibert (1993). "Assignment of the human lipoprotein lipase (LPL) gene to chromosome band 8p22." Cytogenet Cell Genet **63**(1): 45-46.
- Meyers, C., D. Gaudet, K. Tremblay, A. Amer, J. Chen and F. Aimin (2012). "The DGAT1 Inhibitor LCQ908 Decreases Triglyceride Levels in Patients with the Familial Chylomicronemia Syndrome." J Clin Lipidol **6**(3): 266-267.
- Monsalve, M. V., H. Henderson, G. Roederer, P. Julien, S. Deeb, J. J. Kastelein, L. Peritz, R. Devlin, T. Bruin, M. R. Murthy and et al. (1990). "A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries." J Clin Invest **86**(3): 728-734.
- Ohmuraya, M., A. Sugano, M. Hirota, Y. Takaoka and K. Yamamura (2012). "Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis." Front Physiol **3**: 126.
- Ohmuraya, M. and K. Yamamura (2011). "Roles of serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases." Exp Anim **60**(5): 433-444.
- Ortiz-Munoz, G., X. Houard, J. L. Martin-Ventura, B. Y. Ishida, S. Loyau, P. Rossignol, J. A. Moreno, J. P. Kane, R. J. Chalkley, A. L. Burlingame, J. B. Michel and O. Meilhac (2009). "HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property." FASEB J **23**(9): 3129-3139.
- Rip, J., M. C. Nierman, C. J. Ross, J. W. Jukema, M. R. Hayden, J. J. Kastelein, E. S. Stroes and J. A. Kuivenhoven (2006). "Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1236-1245.
- Rip, J., M. C. Nierman, J. A. Sierts, W. Petersen, K. Van den Oever, D. Van Raalte, C. J. Ross, M. R. Hayden, A. C. Bakker, P. Dijkhuizen, W. T. Hermens, J. Twisk, E. Stroes, J. J. Kastelein, J. A. Kuivenhoven and J. M. Meulenberg (2005). "Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application." Hum Gene Ther **16**(11): 1276-1286.
- Rosendahl, J., H. Witt, R. Szmola, E. Bhatia, B. Ozsvari, O. Landt, H. U. Schulz, T. M. Gress, R. Pfitzer, M. Lohr, P. Kovacs, M. Bluher, M. Stumvoll, G. Choudhuri, P. Hegyi, R. H. te Morsche, J. P. Drenth, K. Truninger, M. Macek, Jr., G. Puhl, U. Witt, H. Schmidt, C. Buning, J. Ockenga, A. Kage, D. A. Groneberg, R. Nickel, T. Berg, B. Wiedenmann, H. Bodeker, V. Keim, J. Mossner, N. Teich and M. Sahin-Toth (2008). "Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis." Nat Genet **40**(1): 78-82.
- Ross, C. J., J. Twisk, A. C. Bakker, F. Miao, D. Verbart, J. Rip, T. Godbey, P. Dijkhuizen, W. T. Hermens, J. J. Kastelein, J. A. Kuivenhoven, J. M. Meulenberg and M. R. Hayden (2006). "Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation." Hum Gene Ther **17**(5): 487-499.

- Ross, C. J., J. Twisk, J. M. Meulenberg, G. Liu, K. van den Oever, E. Moraal, W. T. Hermens, J. Rip, J. J. Kastelein, J. A. Kuivenhoven and M. R. Hayden (2004). "Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation." Hum Gene Ther **15**(9): 906-919.
- Sacks, F. M., M. Stanesa and R. A. Hegele (2013). "Severe Hypertriglyceridemia With Pancreatitis: Thirteen Years' Treatment With Lomitapide." JAMA Intern Med. **174**(3): 443-7.
- Sanchez-Ramirez, C. A., S. E. Flores-Martinez, A. G. Garcia-Zapien, S. A. Montero-Cruz, A. Larrosa-Haro and J. Sanchez-Corona (2012). "Screening of R122H and N29I mutations in the PRSS1 gene and N34S mutation in the SPINK1 gene in Mexican pediatric patients with acute and recurrent pancreatitis." Pancreas **41**(5): 707-711.
- Shimizu, T., Y. Yamashiro, J. Igarashi, H. Fujita and K. Ishimoto (1998). "Increased serum trypsin and elastase-1 levels in patients undergoing L-asparaginase therapy." Eur J Pediatr **157**(7): 561-563.
- St-Pierre, J., M. C. Vohl, D. Brisson, P. Perron, J. P. Despres, T. J. Hudson and D. Gaudet (2001). "A sequence variation in the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene is associated with increased plasma glycerol and free fatty acid concentrations among French Canadians." Mol Genet Metab **72**(3): 209-217.
- Surendran, R. P., M. E. Visser, S. Heemelaar, J. Wang, J. Peter, J. C. Defesche, J. A. Kuivenhoven, M. Hosseini, M. Peterfy, J. J. Kastelein, C. T. Johansen, R. A. Hegele, E. S. Stroes and G. M. Dallinga-Thie (2012). "Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia." J Intern Med. **272**(2): 185-96.
- Szmola, R. and M. Sahin-Toth (2007). "Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11227-11232.
- Szmola, R. and M. Sahin-Toth (2010). "Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells." Gut **59**(3): 365-372.
- Thrower, E., S. Husain and F. Gorelick (2008). "Molecular basis for pancreatitis." Curr Opin Gastroenterol **24**(5): 580-585.
- Tremblay, K., J. Methot, D. Brisson and D. Gaudet (2011). "Etiology and risk of lactescent plasma and severe hypertriglyceridemia." J Clin Lipidol **5**(1): 37-44.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." Nucleic Acids Res **40**(15): e115.
- Whitcomb, D. C. (2010). "Genetic aspects of pancreatitis." Annu Rev Med **61**: 413-424.
- Whitcomb, D. C. (2013). "Genetic risk factors for pancreatic disorders." Gastroenterology **144**(6): 1292-1302.

Witt, H., W. Luck, H. C. Hennies, M. Classen, A. Kage, U. Lass, O. Landt and M. Becker (2000). "Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis." Nat Genet **25**(2): 213-216.

Zhou, J. and M. Sahin-Toth (2011). "Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis." J Gastroenterol Hepatol **26**(8): 1238-1246.

Chapitre VIII : Discussion générale

L'hyperchylomicronémie familiale est un trait monogénique causé dans la majorité des cas par une LPLD, dont les manifestations cliniques les plus probantes sont une hyperTG sévère (triglycérides supérieurs à 10 mmol/L) et un syndrome de chylomicronémie. Malgré le caractère autosomal récessif de la maladie, les comorbidités associées sont extrêmement variables d'un individu à l'autre. En effet, la pancréatite est la complication la plus importante et survient très fréquemment chez les individus atteints d'hyperchylomicronémie familiale. Ce n'est toutefois pas le cas chez tous les patients et cette variance s'observe également chez des individus d'une même famille (apparentés). Cette étude a donc voulu démontrer qu'il existait une grande variabilité dans l'occurrence des pancréatites chez les patients avec une hyperchylomicronémie familiale et que cette variabilité a des bases génétiques, ce qui n'avait pas encore été fait à ce jour. Ainsi, à partir de l'hypothèse que des biomarqueurs génétiques sont responsables du risque plus élevé de récurrence de pancréatite chez les patients LPLD, nous avons séquencé deux gènes candidats impliqués dans la voie métabolique des protéases dans le pancréas (*CTRC* et *SPINK1*). L'échantillon était composé de sujets normolipidémiques et de patients présentant une LPLD. Nous avons identifié des variants génétiques qui diminueraient l'activité de ces deux enzymes et par le fait même, entraîneraient une diminution de leur rôle protecteur contre la pancréatite.

En résumé, des 15 variants identifiés par notre séquençage, seulement trois avaient tendance à être associés avec la récurrence d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour pancréatite aiguë ($p < 0,2$); rs545634-*CTRC*, rs10927786-*CTRC* et rs11319-*SPINK1*. C'est en combinant les variants entre eux que nous avons identifié une combinaison entre rs545634-*CTRC* et rs11319-*SPINK1* associée significativement avec la récurrence d'hospitalisations ($p < 0,001$). D'ailleurs, cette association a été confirmée avec des analyses de régression multiple, ajustées pour l'âge, le sexe et le statut de fumeur [Odds ratio (OR)=41,4 (Intervalle de confiance (IC) à 95%: 2,0-848,0); $p = 0,016$]. Nous avons démontré aussi qu'une histoire familiale de pancréatite était un indicateur significatif du risque d'hospitalisations récurrentes pour douleur abdominale sévère ou pour pancréatite aiguë ($p < 0,001$).

Cette étude présente donc la première association entre des marqueurs génétiques et l'occurrence d'épisodes récurrents d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour pancréatites aiguës chez des sujets LPLD. Les retombées d'une telle étude se mesurent par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques via l'implication potentielle de deux gènes candidats et nous motivent à poursuivre l'étude de ce phénotype (voir section 8.3 perspectives).

8.1 Retombées de l'étude

L'interaction entre deux gènes pourrait avoir un rôle significatif quant à l'expression de la pancréatite. En effet, certaines études ont déjà démontré l'implication de la combinaison de plusieurs gènes afin de moduler l'expression d'une condition donnée [55, 101, 128, 157]. Whitcomb (2013) avait déjà posé l'hypothèse que des variants dans les gènes *CTRC* et *CASR* devaient être présents avec d'autres variants hétérozygotes dans *PRSSI*, *CFTR* ou *SPINK1* afin que l'augmentation du risque de PAR et de PC soit significative [101].

Aussi, une récente étude démontre qu'il y a épistasie entre une mutation (rs497078) dans le gène *CTRC* et des mutations connues dans les gènes *CFTR* (p.F508del et p.R75Q) et *SPINK1* (p.N34S) [158]. Il serait donc intéressant d'évaluer dans un plus grand nombre de sujets si cette mutation est associée avec la PAR, étant donné qu'elle a été retrouvée dans nos patients, mais sans être associée significativement avec l'augmentation du risque de PAR (Figure 5). De plus, cette même étude suggère qu'une perte de fonction du gène *CTRC* accélérerait la progression entre la PAR et la PC [158].

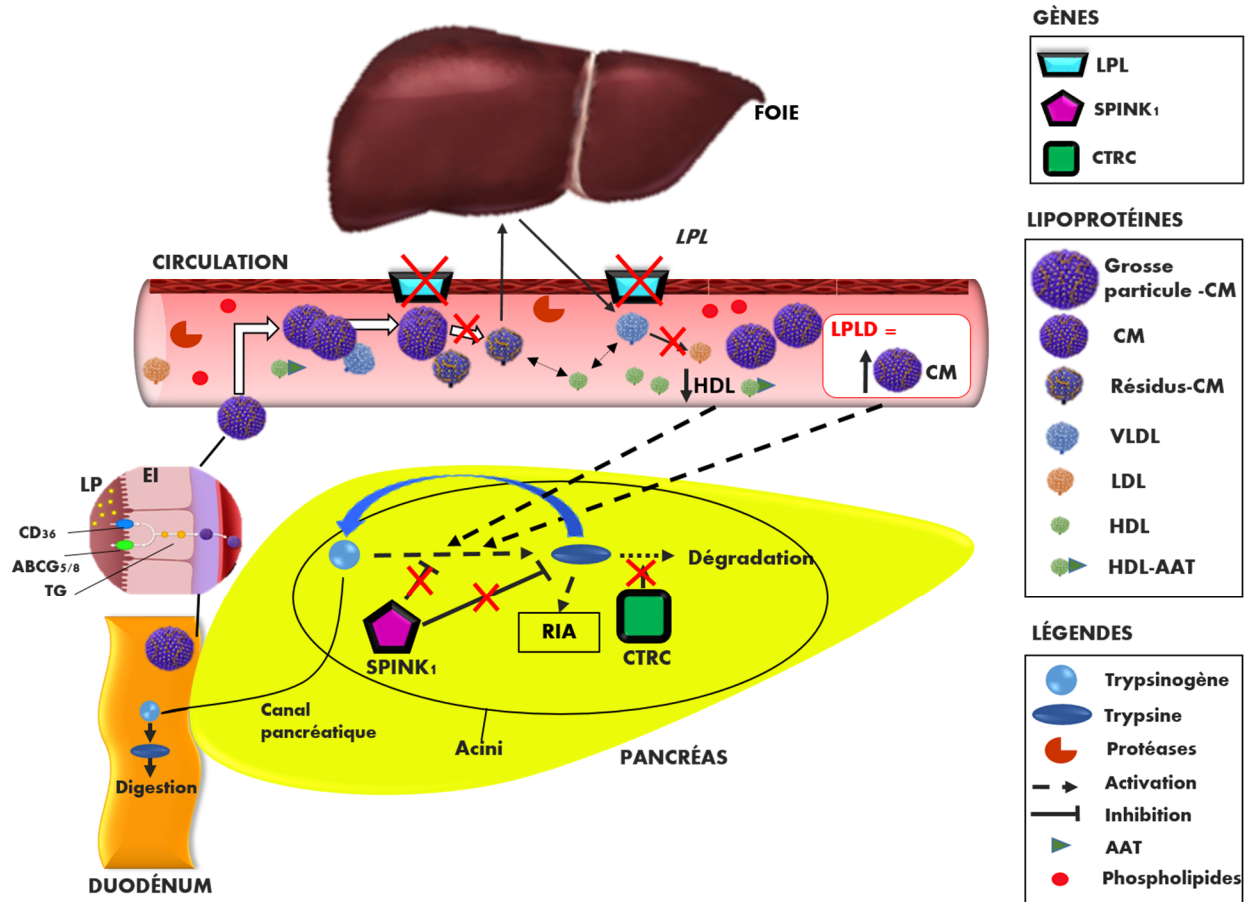
Deux autres mutations non-synonymes qui avaient déjà été associées avec l'augmentation du risque à la PA, PC et/ou la PI (Tableau II), ont également été retrouvées dans certains sujets de notre étude [rs121909293 (p.R254W) située dans le gène *CTRC* et rs17107315 (p.N34S) située dans le gène *SPINK1*]. Toutefois, aucune association n'a été faite entre ces variants et l'augmentation du risque d'hospitalisations pour PAR ou pour douleurs abdominales sévères dans notre étude.

Dans cette section, on décrit l'implication potentielle de *CTRC* et *SPINK1* dans les mécanismes physiopathologiques de la pancréatite. Les deux variants de la combinaison identifiés comme significativement associés avec la récurrence d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour PA, sont retrouvés dans l'intron 5 du gène *CTRC* dans le cas de rs545634 et le variant rs11319 est situé dans la région non transcrite (UTR pour « *untranslated region* ») 3' dans le gène *SPINK1*. Leur position exacte dans les gènes est décrite dans le Tableau V de l'article du chapitre VII de ce mémoire. Aucun phénotype de pancréatite n'avait encore été associé avec ces deux mutations. Même si ce ne sont pas des variants codants, il est maintenant connu que les mutations localisées dans les introns ou dans les régions 3'UTR et 5'UTR des gènes peuvent tout de même avoir un effet sur la protéine via différents mécanismes comme l'épissage alternatif, la translation de l'ARN messager, sa localisation ou sa stabilisation [159-161]. Tous ces processus permettent la régulation de l'expression des gènes et de leurs produits [8, 162].

CTRC et *SPINK1* ont des rôles précis dans le métabolisme des protéases dans le pancréas [99, 105]. En résumé, lors d'une LPLD, les chylomicrons transportant les triglycérides en circulation ne peuvent être hydrolysés par la LPL. Dans ce cas, une augmentation du taux de chylomicrons se manifesterait et c'est cette accumulation qui peut causer l'activation prématurée du trypsinogène en trypsine dans le pancréas et engendrer une réponse inflammatoire aiguë (voir la section 2.3 du chapitre II) [76, 78, 79]. Tout d'abord, *CTRC* aiderait à la dégradation de la trypsine et du trypsinogène lorsque le trypsinogène serait activé prématurément dans le pancréas, alors que *SPINK1* inhiberait son activation. Ils ont donc tous les deux une fonction de protection contre la pancréatite. Avec l'association de variants hétérozygotes dans ces gènes et la récurrence des hospitalisations pour douleurs abdominales sévères ou pour pancréatites aiguës, il a été possible de poser certaines hypothèses quant au rôle potentiel de ces variants.

Un variant dans le gène *CTRC* ou dans *SPINK1* pourrait diminuer ou entraîner un déficit de l'activité dans l'une ou l'autre de ces enzymes et ainsi modifier leur fonction principale de protection contre la pancréatite. Cependant, si l'activité d'une seule enzyme est affectée, d'autres mécanismes seront en place pour contrer cet effet. Le risque d'expression dans ce cas pourrait être légèrement augmenté sans toutefois être significatif. Les trois variants identifiés

comme ayant une tendance à être associés avec la récurrence d'hospitalisations pourraient en être un exemple (rs545334-*CTRC*; $p=0,158$, rs10927786-*CTRC*; $p=0,055$ et rs11319-*SPINK1*; $p=0,063$). Avec une combinaison de variants dans deux gènes entraînant une perte de fonction, l'activité des deux enzymes serait affectée. De plus, la diminution du HDL cholestérol transportant l'AAT causée par la LPLD provoquerait également une augmentation du trypsinogène actif et de la trypsine dans le pancréas [81]. Il y aurait donc trois mécanismes de protection qui seraient affectés et la probabilité d'exprimer une pancréatite dans ce cas serait augmentée comme le démontre la Figure 6. Toutefois, des analyses fonctionnelles devront être effectuées pour confirmer si l'activité des enzymes est réellement altérée.



©Camélia Dubois-Bouchard, 2014

Figure 6. Implication potentielle de CTRC et de SPINK1 dans la voie des protéases.

Lorsqu'on regarde la pancréatite dans le contexte d'une déficience en lipoprotéine lipase (LPLD), il y a une augmentation de chylomicrons en circulation, ce qui entraîne une activation prématurée du trypsinogène en trypsine dans le pancréas. La diminution du niveau de lipoprotéine de haute densité (HDL) et d'alpha(1)-antitrypsine (AAT) en circulation peut entraîner également cette activation du trypsinogène en trypsine. Si la chymotrypsine C (CTRC) et la « *serine peptidase inhibitor kazal type 1* » (SPINK1) ne peuvent effectuer leur rôle de dégradation et d'inhibition dû à une diminution de leur activité causée par des variants, la réponse inflammatoire aigüe (RIA) ainsi que le risque d'expression de la pancréatite est beaucoup plus élevé par rapport à un patient avec LPLD qui n'aurait pas cette combinaison de variants ou qui posséderait seulement un des deux variants.

Abréviations: ABCG_{5/8}: *ATP-binding cassette sub-family G member 5 or 8*; CD36: *Cluster de Différence 36*; CM: Chylomicrons; EI: Entérocytes intestinale; LP: Lipides; LPL : Lipoprotéine lipase; TG: Triglycérides; VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

8.2 Forces et limites de l'étude

Les résultats significatifs de cette étude suggèrent qu'une association existe entre la combinaison de variants dans les gènes de susceptibilité à la récurrence d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour PA. Même si notre échantillon est de petite taille, il rassemble un très grand nombre de sujets compte tenu de la rareté de la maladie. L'échantillon est composé de sujets originaires du SLSJ. Cette population présente un effet fondateur qui est responsable de la prévalence élevée de la LPLD dans cette région et qui nous a permis d'avoir l'un des échantillons les plus imposants internationalement pour l'étude de la maladie. De plus, cet effet fondateur fait en sorte que la population possède une relative homogénéité des mutations dans le gène de la *LPL*. Toutefois, cet effet fondateur est aussi une limitation étant donné la validation externe limitée et le besoin nécessaire de réplication dans d'autres populations.

Une seconde limitation est qu'aucune étude fonctionnelle n'a encore été effectuée, on ne peut donc pas confirmer l'association physiologique.

De plus, l'étude d'association réalisée est basée sur une approche par gènes candidats, ce qui pourrait être considéré comme une limite lorsqu'on compare cette méthode aux approches génomiques utilisant le séquençage de nouvelle génération (aussi appelé « *next generation sequencing* »). En effet, l'approche par gènes candidats permet seulement d'identifier une association génétique entre des variants et une condition particulière et cette méthode demeure coûteuse et moins rapide [163]. L'approche par gènes candidats a tout de même été priorisée sur l'approche génomique puisque ce que nous voulions vérifier dans cette étude était la possibilité que des gènes de susceptibilité à la pancréatite puissent moduler l'expression, la sévérité et la variabilité de la pancréatite chez les patients LPLD. Dans ce cas, l'approche par gènes candidats est encore utile, particulièrement lorsqu'un échantillon de sujets est bien caractérisé comme c'est le cas de notre échantillon [164]. En effet, tous les patients LPLD dans cette étude sont porteurs homozygotes ou hétérozygotes composés des mêmes mutations délétères dans le gène de la *LPL*.

8.3 Perspectives

8.3.1 *Validation et réplication*

Nous avons documenté la première association génétique entre certains variants et l'élévation du risque d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour pancréatite aiguë chez les patients LPLD. La validation nous permettra, entre autres, de vérifier si des erreurs techniques ont été causées lors des manipulations ou des analyses ou encore si la présence de faux positifs aurait pu modifier certains résultats. La réplication servira à confirmer l'association dans d'autres échantillons indépendants, ce qui est actuellement en réalisation avec différents groupes de chercheurs-collaborateurs.

8.3.2 *Études de nouveaux gènes candidats*

En identifiant des variants dans les gènes *CTRC* et *SPINK1*, il est aussi probable que d'autres gènes puissent être associés, eux aussi, avec l'augmentation du risque de pancréatite ou encore l'augmentation de la protection contre la pancréatite chez les patients LPLD ce qui pourrait expliquer la variabilité de l'expression de celle-ci. Une revue de littérature a permis d'identifier plusieurs gènes qui ont déjà été associés avec l'augmentation du risque ou de la protection de PA, de PAR ou de PC ainsi que des gènes impliqués dans la voie biologique de la réponse inflammatoire du pancréas. Cette liste de gènes de susceptibilité potentiels se retrouve dans le Tableau VIII ci-dessous et elle inclut également leur fonction et leur identification.

Tableau VIII. Gènes associés avec une susceptibilité ou une protection à la pancréatite aiguë, chronique ou récurrente selon la littérature.

Gènes	Nom officiel	MIM	Locus	Gene ID	Fonction	Références
<i>GGT1</i>	Gamma-Glutamyltransférase 1	612346	22q11.23	2678	Maintient le niveau de glutathion intracellulaire, qui est essentiel pour les réactions de phase II et la détoxification des métabolites réactifs et xénobiotiques. C'est aussi un marqueur du stress oxydatif. Le stress oxydatif dans les cellules pancréatiques peut activer la réponse inflammatoire. Les variants rs8135987 et rs4820599 dans ce gène ont été associés avec la PC.	[165]
<i>NF-κB</i>	Nuclear Factor Kappa-B	164011	4q24	18033	NF-κB active, au niveau du noyau, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes voies biologiques. Des perturbations dans NF-κB ont souvent été associées avec des maladies inflammatoires. L'activation de NF-κB dans le pancréas servirait de protection contre la pancréatite.	[166]
<i>PDZK1</i>	PDZ Domain Containing 1	603831	1q21.1	5174	Régulateur de l'activité de CFTR (pour la fonction de CFTR, voir le Tableau II dans le chapitre 3 de ce mémoire).	[167]
<i>LPAR2</i>	Lysophosphatidic acid receptor 2	605110	19p12	9170	Cette protéine agirait à titre de récepteur de l'acide lysophosphatidique et agirait comme régulateur du Ca ²⁺ .	
<i>CPAI</i>	Carboxypeptidase A1 (Pancreatic)	114850	7q32.2	1357	Ce gène code pour une exopeptidase pancréatique et serait impliqué dans l'inhibition des granules de zymogène.	[168]
<i>CTSB</i>	Cathepsine B	116810	8p23.1	1508	Le gène code pour une enzyme lysosomiale activée lorsque le pH se situe entre 2,5 et 4 dans les cellules acineuses. Elle activerait le trypsinogène.	[169, 170]
<i>MAPK14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	600289	6p21.3-p21.2	1432	Ces gènes codant pour des protéines kinases ont des rôles d'amplification et d'intégration des signaux dans des processus comme la prolifération cellulaire, la différenciation, la réponse inflammatoire et l'apoptose.	[171, 172]
<i>MAPK8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	601158	10q11.22	5599		
<i>MAPK3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3	601795	16p11.2	5595		
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	176948	22q11.21	5594		
<i>PRKCA</i>	Protéine kinase, alpha	176960	17q22-q23.2	5578	Ils modulent la réponse de la PA dans les processus d'activation des zymogènes, la libération des cytokines inflammatoires, le mécanisme d'inflammation et	[173]
<i>PRKCD</i>	Protéine kinase, delta	176977	3p21.31	5580		[173, 174]

PRKCE	Protéine kinase, epsilon	176975	2p21	5581	l'activation des protéines kinases activées par mitogène (MAPKs pour <i>Mitogen-activated protein kinase</i>).	[174]
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	164730	14q32.32	207	Limite la réponse proinflammatoire et chimiotactique.	[175, 176]
ROSI	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	165020	6q22	6098	Joue un rôle au niveau de l'inflammation pancréatique et le développement des complications extrapancréatiques.	[177]
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	190090	20q12-q13	6714	Ces trois kinases font partie de la famille des tyrosines kinases Src et sont associées avec la réponse inflammatoire aigüe. L'inhibition de SRC a déjà été associée avec une diminution des dommages sur les cellules acini.	[178, 179]
LYN	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	165120	8q13	4067		
YES1	YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase 1	164880	18p11.31-p11.21	7525		
PRKACA	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	601639	19p13.1	5566	Réduit la production de cytokines proinflammatoires.	[180]
JAK1	Janus kinase 1	147795	1p32.3-p31.3	3716	Les JAKs jouent un rôle au niveau des facteurs de croissance, des hormones, dans le métabolisme des ROS et, également, dans la réponse immunitaire des différentes cytokines.	[181, 182]
JAK2	Janus kinase 2	147796	9p24	3717		
PKDI	Polycystic kidney disease 1	605435	14q11	5587	Joue un rôle dans l'activation des zymogènes, dans la sécrétion de l'amylase et dans l'activation de la PA via NF-κB.	[183, 184]
EGFR	Epidermal growth factor receptor	131550	7p12	1956	EGFR a comme fonction de protéger les dommages pancréatiques causés par la céruleïne et protège contre la nécrose des cellules acini.	[185]
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	164860	7q31	4233	Jouent un rôle dans la voie de signalisation des récepteurs avec le facteur de croissance épidermique, mais n'ont toujours pas de rôle précis dans la PA.	[171]

<i>MTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	601231	1p36.2	2475		
<i>RIPK1</i>	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	603453	6p25.2	8737	Participe au processus de nécrose cellulaire en modulant NF-κB.	[186, 187]

8.3.3 *Études génomiques*

Cette approche par gènes candidats est la première étape qui précède d'autres analyses génétiques (séquençage du génome complet, analyses épigénétiques, etc.) pour supporter notre hypothèse de départ. Les résultats obtenus ici nous fournissent une preuve de concept et nous poussent à investiguer davantage sur les gènes candidats étudiés dans cette étude (*CTRC* et *SPINK1*), mais aussi sur d'autres gènes de susceptibilité à la pancréatite pour évaluer encore plus en profondeur le risque de l'expression de la pancréatite chez les patients LPLD.

De plus, comme il a été décrit dans la section 6.2 du chapitre dans l'approche méthodologique, seulement les régions codantes auraient dû être séquencées, mais quelques paires de base faisant partie des régions introniques ont tout de même été séquencées. C'est ce qui nous a permis d'identifier la combinaison de variants significative. Il serait donc intéressant de séquencer également les régions introniques des gènes candidats pour les études futures.

8.3.4 *Étude de l'histoire familiale*

De plus, comme il a été présenté dans l'article précédent, l'histoire familiale de pancréatite est un marqueur considérable du risque de récurrence de pancréatites [OR=410,6; (IC à 95%=29,4–5733,8); p value<0,001]. Toutefois, l'histoire familiale n'est pas connue pour tous les patients dans cet échantillon, c'est pourquoi il est impossible de se fier seulement sur cette donnée. Malgré tout, si on additionne cette donnée avec la combinaison de variants, l'analyse demeure toujours significative [OR=148,6; (IC à 95%=1,5–14537,5); p value=0,032]. Il serait donc intéressant d'investiguer davantage sur l'histoire familiale dans les nouvelles cohortes de patients pour évaluer si ce marqueur a réellement un impact sur le risque de récurrence de pancréatite chez les patients LPLD.

8.3.5 Études fonctionnelles

Ultimement, des études fonctionnelles seront nécessaires pour confirmer les résultats obtenus dans cette étude, mais également les résultats qui découleront des futures recherches. Le but des études fonctionnelles (*in vitro* et *in vivo*) est de vérifier si la présence de variants génétiques entraîne réellement la perte de fonction de la protéine ou la diminution de la production de cette protéine. Des études sur le lipidome, des analyses de phénotypage fin ou de spectrométrie de masse, etc. peuvent également nous renseigner davantage sur la maladie et ses complications.

8.4 Applications cliniques potentielles

Les prochaines étapes serviront à confirmer les résultats, mais la combinaison identifiée dans cette étude pourrait avoir certaines utilités. La prise en charge des patients LPLD pourra se faire plus rapidement, car en identifiant la combinaison génétique chez un nouveau patient, on peut déterminer si son risque de récurrence de pancréatite est augmenté par rapport à un patient qui ne posséderait pas cette combinaison. Ainsi, ces marqueurs génétiques vont permettre de cibler les patients les plus à risque et de renforcer les approches préventives, comme la diète stricte à faible teneur en lipides, afin d'éviter, dans la mesure du possible, la survenue de la pancréatite et de ses complications. À plus long terme, l'identification de ces nouveaux biomarqueurs pourrait servir de nouvelles cibles thérapeutiques (comme la thérapie génique [188]) afin d'augmenter la protection des gènes impliqués dans l'activation prématurée du trypsinogène dans le pancréas.

Conclusion

En conclusion, ces résultats constituent une preuve de concept en soi, c'est-à-dire que cette approche par gènes candidats nous a permis de constater qu'il existe un lien entre des biomarqueurs génétiques et la variabilité du nombre d'hospitalisations pour douleur abdominale sévère ou pour PA chez les patients ayant une LPLD. En investiguant davantage dans cette voie, cela va nous permettre de répondre aux différentes interrogations quant à la variation des complications chez les individus atteints d'hyperchylomicronémie familiale. Le but ultime est d'améliorer la prise en charge des patients LPLD pour diminuer le plus possible le risque de pancréatite et de ses conséquences néfastes pour leur santé.

À plus grande échelle, l'étude des biomarqueurs génétiques impliqués dans la PAR chez les patients LPLD pourrait nous permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la pancréatite et ainsi, d'adapter un plan d'intervention préventif chez les patients atteints d'une hyperchylomicronémie familiale.

Références

1. Mead, J.F., *Lipid Metabolism*. Annu Rev Biochem, 1963. **32**: p. 241-68.
2. Patil, V.S. and N.G. Magar, *Effect of dietary fat and cholesterol on the polyunsaturated fatty acids of cholesterol esters, phospholipids and triglycerides in the liver of the rat*. Biochem J, 1960. **74**: p. 441-4.
3. Genest, J., *Lipoprotein disorders and cardiovascular risk*. J Inherit Metab Dis, 2003. **26**(2-3): p. 267-87.
4. Hegele, R.A., *Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(2): p. 109-21.
5. Olofsson, S., A. Lennart, and J. Borén, *The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins*. Curr Opin Lipidol, 1999. **10**(4): p. 341-6.
6. Ariyo, A.A., C. Thach, and R. Tracy, *Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly*. N Engl J Med, 2003. **349**(22): p. 2108-15.
7. Goldberg, I.J., R.H. Eckel, and N.A. Abumrad, *Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways*. J Lipid Res, 2009. **50** Suppl: p. S86-90.
8. Bina, M., R.J. Feldmann, and R.G. Deeley, *Could poly(A) align the splicing sites of messenger RNA precursors*. Proc. Natl. Acad. Set., 1980. **77**(3): p. 12278-1282.
9. Hussain, M.M., *A proposed model for the assembly of chylomicrons*. Atherosclerosis, 2000. **148**(1): p. 1-15.
10. Sviridov, D. and P. Nestel, *Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2002. **161**(2): p. 245-54.
11. Stephen, R. and Daniels, *Lipid metabolism and secondary forms of dyslipoproteinemia in children*. Progress in Ped Cardiology, 2003. **17**(2): p. 135-140.
12. Fredrickson, D.S., R.I. Levy, and R.S. Lees, *Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders*. N Engl J Med, 1967. **276**(4): p. 215-25 contd.
13. Albrink MJ and M. EB, *Serum Triglycerides in Coronary Artery Disease*. Arch Intern Med, 1959. **103**: p. 4-8.
14. Hokanson JE, Austin MA. *Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies*. J Cardiovasc Risk 1996; **3**: 213-9.
15. Nordestgaard, B.G. and A. Varbo, *Triglycerides and cardiovascular disease*. The Lancet, 2014. **384**(9943): p. 626-635.
16. Ferns, G., V. Keti, and B. Griffin, *Investigation and management of hypertriglyceridaemia*. J Clin Pathol, 2008. **61**(11): p. 1174-83.

17. Johansen, C.T. and R.A. Hegele, *Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes*. *Curr Opin Lipidol*, 2011. **22**(4): p. 247-53.
18. Ford, E.S., et al., *Hypertriglyceridemia and its pharmacologic treatment among us adults*. *Arch of Intern Med*, 2009. **169**(6): p. 572-578.
19. Expert Panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults., *Executive Summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III)*. . *JAMA*, 2001. **285**: p. 2486–2497.
20. Berglund, L., et al., *Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(9): p. 2969-89.
21. Yuan, G., K.Z. Al-Shali, and R.A. Hegele, *Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment*. *CMAJ*, 2007. **176**(8): p. 1113-20.
22. Castelli, W.P., *Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham*. *Am J Cardiol*, 1992. **70**(19): p. 3H-9H.
23. Gan, S.I., et al., *Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: a case-based review*. *World J of Gastroentero*, 2006. **12**(44): p. 7197-7202.
24. Brunzell, J.D., *Hypertriglyceridemia*. *The New Eng J of Med*, 2007. **357**(10): p. 1009-1017.
25. Berglund, L., et al., *Treatment options for hypertriglyceridemia: From risk reduction to pancreatitis*. *Best practice and research clinical endocrinology and metabolism*, 2014. **28**: p. 423-437.
26. Tremblay, K., et al., *Etiology and risk of lactescent plasma and severe hypertriglyceridemia*. *J Clin Lipidol*, 2011. **5**(1): p. 37-44.
27. Gotoda, T., et al., *Diagnosis and Management of Type I and Type V Hyperlipoproteinemia*. *J of Arterioscler and Thromb*, 2012. **19**(1): p. 1-12.
28. Surendran, R.P., et al., *Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia*. *J Intern Med*, 2012. **272**(2): p. 185-96.
29. Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. *The familial hyperlipoproteinemias*. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 4th Edn, NewYork: McGraw-Hill, 1978: p.604-655.
30. Henderson, H.E., et al., *The lipoprotein lipase Gly188-*Glu mutation in South Africans of Indian descent: evidence suggesting common origins and an increased frequency*. *J Med Genet*, 1992. **29**: p. 119-122.
31. Gagne, C., et al., *Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population*. *CMAJ*, 1989. **140**: p. 405-411.
32. Gagne, C. and D. Gaudet, *Dyslipoproteinemias in Quebec: primary deficit in lipoprotein lipase and familial hypercholesterolemia*. *Union Med Can*, 1995. **124**(2): p. 61-7.

33. De Braekeleer, M., et al., *Founder effect in familial hyperchylomicronemia among French Canadians of Quebec*. Human heredity, 1991. **41**(3): p. 168-173.
34. Gagné, C. and D. Gaudet, *Les Dyslipoprotéïnémies: L'approche Clinique*. 3e Édition, Lipimed Communications, 2007.
35. Dionne, C., et al., *Genealogy and Regional Distribution of Lipoprotein Lipase Deficiency in French-Canadians of Quebec*. Human Biology, 1993. **65**(1): p. 29-39.
36. Kobayashi, Y., T. Nakajima, and I. Inoue, *Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain*. European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(18): p. 4701-4710.
37. Kersten, S., *Physiological regulation of lipoprotein lipase*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(7): p. 919-933.
38. Olivecrona, T. and G. Bengtsson-Olivecrona, *Lipoprotein lipase--the molecule and its interactions*. Agents Actions Suppl, 1984. **16**: p. 55-67.
39. Lookene, A., et al., *Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49964-72.
40. Braun, J.E.A. and D.L. Severson, *Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase*. Biochem. J, 1992. **287**: p. 337-347.
41. Braun, J. and D.L. Severson, *Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase*. Biochem. J., 1992. **287**: p. 337-347.
42. Kroupa, O., et al., *Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue*. BMC Physiol, 2012. **12**(1): p. 13.
43. Preiss-Landl, K., et al., *Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(5): p. 471-81.
44. Weinstein, M.M., et al., *Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 34511-8.
45. Hassing, H.C., et al., *Pathophysiology of hypertriglyceridemia*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(5): p. 826-32.
46. Attie, A.D., *High-maintenance proteins and hypertriglyceridemia*. Nat Genet, 2007. **39**: p. 1424-1425.
47. Coyle, E.F., *Fat metabolism during exercise*. Sport Science exchange, 1995. **8**(6).
48. Attie, A.D., *High-maintenance proteins and hypertriglyceridemia*. Nat Genet, 2007. **19**(12): p. 1424-1425.
49. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 1-8.
50. Press-Landl, K., et al. *Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002 **13**: p. 471-481.
51. Bennekum, A.M., et al., *Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester*. J of Lipid Researc, 1999. **40**: p. 565-574.

52. Blain, J.F., et al., *A polymorphism in lipoprotein lipase affects the severity of Alzheimer's disease pathophysiology*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(5): p. 1245-51.
53. Su, B., et al., *Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(6): p. 525-32.
54. Larsson, M., et al., *Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 33997-4008.
55. Ariza, M.J., et al., *Additive effects of LPL, APOA5 and APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the ICARIA genetic sub-study*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 66.
56. Grosskopf, I., 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**(12): p. 2573-9.
57. Merkel, M., et al., *Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21553-60.
58. Gonzales, J.C., et al., *Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans*. The J of Clin Investig, 2013. **123**(6): p. 2742-2751.
59. Sonnenburg, W.K., et al., *GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2421-9.
60. Shan, L., et al., *The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1419-24.
61. Liu, J., et al., *Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27561-70.
62. Zhang, R., *Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels*. Biochem and Biophys Res Comm, 2012. **424**(4): p. 786-792.
63. Davies, B.S., et al., *GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries*. Cell Metab, 2010. **12**(1): p. 42-52.
64. Beigneux, A.P., *GPIHBP1 and the processing of triglyceride-rich lipoproteins*. Clin Lipidol, 2010. **5**(4): p. 575-582.
65. Peterfy, M., et al., *Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1483-7.
66. Xie, C., et al., *The common biological basis for common complex diseases: evidence from lipoprotein lipase gene*. Eur J Hum Genet, 2010. **18**(1): p. 3-7.

67. Manzato, E., et al., *Modifications of plasma lipoproteins after lipase activation in patients with chylomicronemia*. J Lipid Res, 1986. **27**(12): p. 1248-58.
68. Guay, S.P., D. Gaudet, and D. Brisson, *The g.-469G>A polymorphism in the GPIIIBP1 gene promoter is associated with hypertriglyceridemia and has an additive effect on the risk conferred by LPL defective alleles*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011.
69. Gaudet, D., et al., *Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial*. Gene Ther, 2012. **20**(4): p. 361-9
70. Julien, P., et al., *Dyslipidemias Associated With Heterozygous Lipoprotein Lipase Mutations in the French-Canadian Population*. HUMAN MUTATION, 1998. **1**: p. 8148-8153.
71. Garenc, C., et al., *Effect of the APOC3 Sst I SNP on fasting triglyceride levels in men heterozygous for the LPL P207L deficiency*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(10): p. 1159-65.
72. Julien, P., et al., *Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-Canadian population*. Human mutations suppl, 1998. **1**: p. 148-153.
73. Huang, Z.H., N. Maeda, and T. Mazzone, *Expression of the human apoE2 isoform in adipocytes: altered cellular processing and impaired adipocyte lipogenesis*. J Lipid Res, 2011. **52**(9): p. 1733-41.
74. Santamarina-Fojo, S., *The familial chylomicronemia syndrome*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. **27**(3): p. 551-67, viii.
75. Leaf, D.A., *Chylomicronemia and the chylomicronemia syndrome: a practical approach to management*. Am J Med, 2008. **121**(1): p. 10-2.
76. Gaudet, D., et al., *Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency*. Atheroscler Suppl, 2010. **11**(1): p. 55-60.
77. Rip, J., et al., *Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1236-45.
78. Rip, J., et al., *Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(11): p. 1276-86.
79. Ross, C.J., et al., *Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(5): p. 487-99.
80. Ross, C.J., et al., *Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(9): p. 906-19.
81. Ortiz-Munoz, G., et al., *HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 3129-39.

82. Rouis, M., et al., *Therapeutic response to medium-chain triglycerides and omega-3 fatty acids in a patient with the familial chylomicronemia syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(7): p. 1400-6.
83. Cao, J., et al., *Targeting Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) with small molecule inhibitors for the treatment of metabolic diseases*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(48): p. 41838-51.
84. Gaudet, D., et al., *Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(23): p. 2200-6.
85. Crosby, J., et al., *Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(1): p. 22-31.
86. Gaudet, D., et al., *Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial*. *Gene Ther*, 2013. **20**(4): p. 361-9.
87. Carpentier, A.C., et al., *Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(5): p. 1635-44.
88. Clearinghouse, N.D.D.I., *Pancreatitis*. NIH Publication 2008. **8**(1596).
89. Teshima, C.W., R.J. Bridges, and R.N. Fedorak, *Canadian Digestive Health Foundation Public Impact Series 5: Pancreatitis in Canada. Incidence, prevalence, and direct and indirect economic impact*. *Can J Gastroenterol* 2012. **26**(8): p. 544-545.
90. Frossard, J.-L., M.L. Steer, and C.M. Pastor, *Acute pancreatitis*. *The Lancet*, 2008. **371**(9607): p. 143-152.
91. Canadian Institute for Health Information, *The Cost of Acute Care Hospital Stays by Medical Condition in Canada, 2004–2005*. ISBN 978-1-55465-216-7, 1-155.
92. Tonsi, A.-F., *Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: The state of the art*. *World Journal of Gastroenterology*, 2009. **15**(24): p. 2945.
93. Eddy, J.J., et al., *Pancreatitis in Pregnancy*. *Obstet Gynecol*, 2008. **112**: p. 1075-81.
94. Ducarme, G., et al., *Acute pancreatitis during pregnancy: a review*. *J Perinatol*, 2014. **34**(2): p. 87-94.
95. Yadav, D. and C.S. Pitchumoni, *Issues in Hyperlipidemic Pancreatitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2003. **36**(1): p. 54-62.
96. Witt, H., et al., *Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(4): p. 1557-73.
97. Braganza, J.M., et al., *Chronic pancreatitis*. *Lancet*, 2011. **377**: p. 1184-1197.
98. Alexandre, M., et al., *Tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone initiates and enhances pancreatitis responses*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **303**(6): p. G696-704.

99. Ohmuraya, M. and K. Yamamura, *The Roles of Serine Protease Inhibitor Kazal Type I (SPINK1) in Pancreatic Diseases*. Exp. Anim., 2011. **60**(5): p. 433-444.
100. Whitcomb, D.C., et al., *Common genetic variants in the CLDN2 and PRSSI-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis*. Nat Genet, 2012. **44**(12): p. 1349-54.
101. Whitcomb, D.C., *Genetic risk factors for pancreatic disorders*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1292-302.
102. Lerch, M.M. and F.S. Gorelick, *Models of acute and chronic pancreatitis*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1180-93.
103. Kim, W., et al., *Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion*. FEBS Lett, 2014. **588**(17): p. 3233-9.
104. Stanger, B.Z. and M. Hebrok, *Control of cell identity in pancreas development and regeneration*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1170-9.
105. Szmola, R. and M. Sahin-Toth, *Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(27): p. 11227-32.
106. Hoffmeister, A., et al., *BACE1 is a newly discovered protein secreted by the pancreas which cleaves enteropeptidase in vitro*. JOP, 2009. **10**(5): p. 501-6.
107. Ohmuraya, M., et al., *Role of Intrapancreatic SPINK1/Spink3 Expression in the Development of Pancreatitis*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 126.
108. Czaja, M.J., *Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease*. Gastroenterology, 2011. **140**(7): p. 1895-908.
109. Ward, J.B., et al., *Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis?* Lancet, 1995. **346**: p. 1016-19.
110. Reed, A.M., et al., *Low pH enhances connexin32 degradation in the pancreatic acinar cell*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **307**(1): p. G24-32.
111. Chen, J.M., T. Montier, and C. Ferec, *Molecular pathology and evolutionary and physiological implications of pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutations*. Hum Genet, 2001. **109**(3): p. 245-52.
112. Le Marechal, C., et al., *Discrimination of three mutational events that result in a disruption of the R122 primary autolysis site of the human cationic trypsinogen (PRSSI) by denaturing high performance liquid chromatography*. BMC Genet, 2001. **2**: p. 19.
113. Rosendahl, J., et al., *Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 78-82.
114. Chen, J.M. and C. Ferec, *Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 63-87.
115. Whitcomb, D.C., *Genetic aspects of pancreatitis*. Annu Rev Med, 2010. **61**: p. 413-24.

116. Toskes, P.P., *Hyperlipidemic pancreatitis*. Gastroenterol Clin North Am, 1990. **19**(4): p. 783-91.
117. Lietman, S.A., et al., *A novel loss-of-function mutation, Gln459Arg, of the calcium-sensing receptor gene associated with apparent autosomal recessive inheritance of familial hypocalciuric hypercalcemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4372-9.
118. Collins, F.S., J.R. Riordan, and L.C. Tsui, *The cystic fibrosis gene: isolation and significance*. Hosp Pract (Off Ed), 1990. **25**(10): p. 47-57.
119. Laurila, J.J., et al., *Tight junction proteins in gallbladder epithelium: different expression in acute acalculous and calculous cholecystitis*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(6): p. 567-73.
120. Oshima, T., H. Miwa, and T. Joh, *Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23 Suppl 2**: p. S146-50.
121. Masson, E., et al., *Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis*. Hum Genet, 2008. **123**(1): p. 83-91.
122. Zhou, J. and M. Sahin-Toth, *Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(8): p. 1238-46.
123. Beer, S., et al., *Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk*. Gut, 2012. **0**: p. 1-9.
124. Kiraly, O., et al., *Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis*. Hum Mutat, 2007. **28**(5): p. 469-76.
125. Kalinin, V., et al., *Association of rare SPINK1 gene mutation with another base substitution in chronic pancreatitis patients*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(33): p. 5352-5356.
126. Le Marechal, C., et al., *Two novel severe mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) cause familial and/or hereditary pancreatitis*. Hum Mutat, 2004. **23**(2): p. 205.
127. Heiko Witt, et al., *Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type I are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2000. **25**: p. 213-216.
128. Pelaez-Luna, M., et al., *PRSS1 and SPINK1 mutations in idiopathic chronic and recurrent acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(33): p. 11788-92.
129. Teich, N., et al., *Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis*. Hum Mutat, 2006. **27**(8): p. 721-30.
130. Chen JM, et al., *Mutational screening of the cationic trypsinogen gene in a large cohort of subjects with idiopathic chronic pancreatitis*. Clin Genet, 2001. **59**: p. 189-193.
131. Gorry, M.C., et al., *Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1063-8.

132. Witt, H., et al., *A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 668-73.
133. Kume, K., et al., *A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders*. Gut, 2009. **58**(6): p. 820-4.
134. Cole, D.E., et al., *Association between total serum calcium and the A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene*. Mol Genet Metab, 2001. **72**(2): p. 168-74.
135. Scillitani, A., et al., *Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5634-8.
136. Muddana, V., *Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: Role of serine protease inhibitor Kazal I type and alcohol*. World Journal of Gastroenterology, 2008. **14**(28): p. 4486.
137. Bai, M., et al., *In Vivo and In Vitro Characterization of Neonatal Hyperparathyroidism Resulting from a De Novo, heterozygous Mutation in the Ca²⁺-sensing Receptor Gene: Normal Maternal Calcium Homeostasis as a Cause of Secondary Hyperparathyroidism in Familial Benign Hypocalciuric Hypercalcemia*. J. Clin. Invest., 1997. **99**(1): p. 88-96.
138. LaRusch, J., et al., *Mechanisms of CFTR Functional Variants That Impair Regulated Bicarbonate Permeation and Increase Risk for Pancreatitis but Not for Cystic Fibrosis*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004376.
139. Schneider, A., et al., *Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 162-71.
140. Derikx, M.H., et al., *Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis in a European replication study*. Gut, 2014.
141. Szmola, R. and M. Sahin-Toth, *Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells*. Gut, 2010. **59**(3): p. 365-72.
142. Kazal, L.A., D.S. Spicer, and R.A. Brahinsky, *Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas*. J. Am. Chem. Soc. , 1948. **70**: p. 304-340.
143. Chen, J.M., *Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis*. Journal of Medical Genetics, 2000. **37**(1): p. 67-69.
144. Witt, H., et al., *Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type I are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 2000. **25**: p. 213-216.
145. Whitcomb, D.C., et al., *Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene*. Nat Genet, 1996. **14**: p. 141-145.

146. Le Bodic, L., et al., *The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7*. Human mol genetoc, 1996. **5**(4): p. 549-554.
147. Ulrich, C.D., 2nd, et al., *Hereditary pancreatitis: epidemiology, molecules, mutations, and models*. J Lab Clin Med, 2000. **136**(4): p. 260-74.
148. Sahin-Toth, M., *The pathobiochemistry of hereditary pancreatitis: studies on recombinant human cationic trypsinogen*. Pancreatology, 2001. **1**(5): p. 461-5.
149. Chakravarti, B., N. Chattopadhyay, and E.M. Brown, *Signaling through the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR)*. Adv Exp Med Biol, 2012. **740**: p. 103-42.
150. Bruce, J.I.E., et al., *Molecular and Functional Identification of a Ca²⁺ (Polyvalent Cation)-sensing Receptor in Rat Pancreas*. J Bio Chem, 1999. **274**(29): p. 20561-20568.
151. Bouschet, T., S. Martin, and J.M. Henley, *Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4709-20.
152. Pidasheva, S., et al., *CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia*. Hum Mutat, 2004. **24**(2): p. 107-11.
153. Ward, B.K., et al., *The role of the calcium-sensing receptor in human disease*. Clin Biochem, 2012. **45**(12): p. 943-53.
154. Rahner, C., L.L. Mitic, and J.M. Anderson, *Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut*. Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 411-422.
155. Banks, P.A., et al., *Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus*. Gut, 2013. **62**(1): p. 102-11.
156. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Multiple significance tests: the Bonferroni method*. BMJ 1995. **310**(6973): p. 170.
157. Felderbauer, P., et al., *Pancreatitis risk in primary hyperparathyroidism: relation to mutations in the SPINK1 trypsin inhibitor (N34S) and the cystic fibrosis gene*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(2): p. 368-74.
158. LaRusch, J., et al., *The Common Chymotrypsinogen C (CTRC) Variant G60G (C.180T) Increases Risk of Chronic Pancreatitis But Not Recurrent Acute Pancreatitis in a North American Population*. Clin Transl Gastroenterol, 2015. **6**: p. e68.
159. Kornblihtt, A.R., et al., *Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 153-65.
160. Lewandowska, M.A., *The missing puzzle piece: splicing mutations*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(12): 2675-82
161. Chatterjee, S. and J.K. Pal, *Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases*. Biol Cell, 2009. **101**(5): p. 251-62.

162. Bina, M., R.J. Feldmann, and R.G. Deeley, *Could poly(A) align the splicing sites of messenger RNA precursors?* Proc Natl Acad Sci USA, 1980. **77**(3): p. 1278-82.
163. Bick, D. and D. Dimmock, *Whole exome and whole genome sequencing.* Curr Opin Pediatr, 2011. **23**(6): p. 594-600.
164. Patnala, R., J. Clements, and J. Batra, *Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools.* BMC genetics, 2013. **14**(39).
165. Brand, H., et al., *Variation in the F-Glutamyltransferase 1 Gene and Risk of Chronic Pancreatitis.* Pancreas, 2013. **42**: p. 836-840.
166. Neuhofer, P., et al., *Deletion of IkappaBalpha activates RelA to reduce acute pancreatitis in mice through up-regulation of Spi2A.* Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 192-201.
167. Kyle E. Roberts, et al., *Computational Design of a PDZ Domain Peptide Inhibitor that Rescues CFTR Activity.* Plos ONE, 2012. **8**(4).
168. Witt, H., et al., *Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis.* Nat Genet, 2013.
169. Lerch, M.M. and W. Halangk, *Human pancreatitis and the role of cathepsin B.* Gut, 2006. **55**(9): p. 1228-30.
170. Halangk, W., et al., *Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.* The J of Clin Investig, 2000. **106**: p. 773-781.
171. Li, Z., et al., *Construction of Network for Protein Kinases That Play a Role in Acute Pancreatitis.* Pancreas, 2012. **00**: p. 00-00.
172. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
173. Koh, Y.H., et al., *Role of protein kinase C in caerulein induced expression of substance P and neurokinin-1-receptors in murine pancreatic acinar cells.* J Cell Mol Med, 2011. **15**(10): p. 2139-49.
174. Thrower, E.C., et al., *The novel protein kinase C isoforms -delta and -epsilon modulate caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(6): p. G1344-53.
175. Fukao, T. and S. Koyasu, *PI3K and negative regulation of TLR signaling.* Trends Immunol, 2003. **24**(7): p. 358-63.
176. Williams, D.L., T. Ozment-Skelton, and C. Li, *Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.* Shock, 2006. **25**(5): p. 432-9.
177. Guice, K.S., et al., *Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis.* Ann Surg, 1989. **210**(6): p. 740-7.
178. Armstrong, S.C., *Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 427-36.

179. Singh, V.P. and M.A. McNiven, *Src-mediated cortactin phosphorylation regulates actin localization and injurious blebbing in acinar cells*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 2339-47.
180. Sandoval, J., et al., *Pentoxifylline prevents loss of PP2A phosphatase activity and recruitment of histone acetyltransferases to proinflammatory genes in acute pancreatitis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **331**(2): p. 609-17.
181. Liu, K.D., S.L. Gaffen, and M.A. Goldsmith, *JAK/STAT signaling by cytokine receptors*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(3): p. 271-8.
182. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
183. Berna, M.J., et al., *CCK causes PKD1 activation in pancreatic acini by signaling through PKC-delta and PKC-independent pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(4): p. 483-501.
184. Thrower, E.C., et al., *A novel protein kinase D inhibitor attenuates early events of experimental pancreatitis in isolated rat acini*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011. **300**(1): p. G120-9.
185. Warzecha, Z., et al., *Epidermal growth factor protects against pancreatic damage in cerulein-induced pancreatitis*. *Digestion*, 1999. **60**(4): p. 314-23.
186. Kelliher, M.A., et al., *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 297-303.
187. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 489-95.
188. Gamazon, E.R. and B.E. Stranger, *Genomics of alternative splicing: evolution, development and pathophysiology*. *Hum Genet*, 2014. **133**(6): p. 679-87.