

Université de Montréal

Hypoalphalipoprotéïnémie familiale
*Aspects cliniques, génétiques,
cellulaires et moléculaires*

par

Michel Marcil

Département de pathologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biopathologie cellulaire

août, 1999

© Michel Marcil, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Hypoalphalipoprotéinémie familiale
*Aspects cliniques, génétiques,
cellulaires et moléculaires*

présentée par:

Michel Marcil

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

_____	:	président-rapporteur
Dr Jean-Gilles Latour		
_____	:	directeur de recherche
Dr Béla Charles Solymoss		
_____	:	co-directeur
Dr Jacques Genest Jr		
_____	:	membre du jury
Dr Catherine Cianflone		
_____	:	membre du jury
Dr Jean Bergeron		

Thèse acceptée le: _____

Sommaire

Un niveau abaissé de cholestérol-HDL plasmatique (hypoalphalipoprotéinémie) est l'anomalie des lipides la plus communément rencontrée chez des sujets présentant une maladie coronarienne précoce. Le plus souvent chez les sujets coronariens une diminution du cholestérol-HDL résulte d'une hypersécrétion hépatique de lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine (apo) B avec augmentation des triglycérides plasmatiques et l'expression d'une hypoalphalipoprotéinémie secondaire. Le défaut ségrègue fréquemment au sein d'une même famille et fut nommé hyperlipoprotéinémie familiale combinée. La cause génétique du défaut demeure encore inconnue. Des formes primaires d'hypoalphalipoprotéinémie sont rencontrées chez environ 4% des sujets présentant une maladie coronarienne précoce.

Pour tenter de mieux comprendre le métabolisme des HDL et son implication dans les dysfonctions lipidiques fréquemment associées au développement de la maladie coronarienne, l'étude de deux expressions génétiques d'hypoalphalipoprotéinémie est présentée: l'une secondaire dans l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée et l'autre primaire dans la déficience familiale en HDL. Ces dyslipidémies sont investiguées du point de vue clinique, génétique, biochimique et de la physiologie cellulaire.

Des données précédemment rapportées ont indiqué que le défaut moléculaire de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée pourrait résider au niveau des gènes de l'apoA-I et de la lipoprotéine lipase, deux protéines étroitement impliquées dans le métabolisme des HDL. Nous avons vérifié chez 54 familles de souche canadienne française des polymorphismes du complexe génique apoA-I-C-III-A-IV et la présence des mutations fonctionnelles communes du gène de la lipoprotéine lipase retrouvées dans cette population. Des analyses de coségrégation entre les polymorphismes trouvés et l'expression phénotypique de la dyslipidémie chez les sujets des différentes familles a permis d'éliminer l'implication potentielle d'un défaut du gène de l'apoA-I de même que des mutations fonctionnelles communes du gène de la lipoprotéine lipase comme cause moléculaire de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée dans la population canadienne française. Le défaut semble plutôt polygénique, fortement associé au développement d'une maladie coronarienne précoce et, dû à la forte variabilité du phénotype, mal défini du point de vue métabolique.

Les causes d'une forme primaire d'hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère ont été examinées dans 3 familles canadiennes françaises présentant un niveau plasmatique fortement abaissé de cholestérol-HDL avec une diminution importante de l'apoA-I sans autre anomalie importante des lipides. L'anomalie paraissait transmise selon un mode autosomique codominant dans les 3 familles mais n'apparaissait pas associée à la présence de maladie coronarienne précoce. L'analyse des lipoprotéines plasmatiques a révélé la présence de HDL de taille réduite. Le défaut n'apparaissait pas relié à une forme anormale de l'apoA-I bien qu'une augmentation relative de la proapoA-I par rapport à l'apoA-I était observée, suggérant une synthèse normale de l'apoA-I mais une dégradation rapide de la protéine mature. Les analyses moléculaires du gène de l'apoA-I et de l'apoA-II n'ont révélé aucune anomalie. L'activité de l'enzyme plasmatique LCAT et de la protéine CETP impliquée dans la transformation plasmatique des HDL paraissait également normale. Au plan clinique, aucun des sujets affectés ne présentaient les signes caractéristiques de la maladie de Tangier (une forme récessive de déficience sévère en HDL), suggérant un désordre de nature différente. L'anomalie fut nommée déficience familiale en HDL. La présence de HDL de taille réduite nous suggérait un défaut d'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL, affectant le processus normal de maturation des particules.

Subséquentement, des investigations au niveau cellulaire nous ont permis de détecter un défaut d'efflux du cholestérol associée à une anomalie de mobilisation du cholestérol intracellulaire chez deux familles. Ce défaut n'apparaissait pas relié à un récepteur putatif des HDL ou à une liaison déficiente des particules HDL à la surface cellulaire. Une caractérisation biochimique des particules HDL plasmatiques chez les sujets affectés démontrait la présence de particules naissantes appauvries en lipides et phospholipides, de même qu'une forte réduction des particules HDL matures enrichies en cholestérol. Nous concluons que cette forme sévère d'hypoalphalipoprotéinémie est due à un défaut de transport intracellulaire et d'efflux du cholestérol cellulaire. Une captation insuffisante de cholestérol cellulaire par les particules HDL naissantes réduirait les processus de maturation des HDL en particules globulaires enrichies en esters de cholestérol. Les petites particules plasmatiques seraient ainsi plus rapidement catabolisées et éliminées de la circulation.

Le défaut cellulaire identifié dans cette forme sévère d'hypoalphalipoprotéinémie familiale s'apparente de près à celui rapporté dans la maladie de Tangier. Nous

postulons que la déficience familiale en HDL pourrait être une expression atténuée de la maladie de Tangier sans manifestation clinique.

L'étude de ces deux formes génétiques d'hypoalphalipoprotéïnémie a démontré une hétérogénéité des désordres affectant le métabolisme des HDL, tant du point de vue étiologique qu'au point de vue de leur contribution au développement de l'athérosclérose coronarienne.

Table des matières

Sommaire	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abbréviations	xii
Remerciements	xv

Introduction	1
---------------------------	----------

Première partie: revue de la littérature

Chapitre 1: Physiologie et physiopathologie du métabolisme des lipoprotéines de haute densité

1.1 Introduction	12
1.2 HDL et maladie coronarienne, données épidémiologiques	13
1.3 Métabolisme des HDL	16
1.3.1 Production des HDL	16
1.3.2 Voie de retour du cholestérol	18
1.3.3 HDL et efflux de cholestérol cellulaire	19
1.4 Autres fonctions des particules HDL	23
1.4.1 Prévention de l'oxydation des lipoprotéines	23
1.4.2 Apport cellulaire de cholestérol	23
1.4.3 Captation d'entotoxines lipopolysaccharidiques bactériennes	24
1.4.4 Protection contre l'infection du <i>Trypanosoma brucei brucei</i> chez l'humain.	24
1.4.5 Modulateur de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires des cellules endothéliales	24
1.4.6 Prévention de l'agrégation plaquettaire	25
1.5 Aspect génétique des HDL	25
1.5.1 Désordres génétiques des HDL	27
1.5.2 Mutations du gène de l'apoA-I	28
1.5.3 Déficience en lécithine-cholestérol-acyl transférase	29
1.5.4 Déficience de la lipoprotéine lipase et de l'apoC-II	31
1.5.5 Maladie de Tangier	31
1.5.6 Déficience familiale en HDL	32
1.6 Conclusion	33

Deuxième partie: contribution originale

Chapitre 2: Énoncé du projet

2.1 Introduction	35
2.2 Hyperlipoprotéinémie familiale combinée	35
2.3 Hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère	37
2.4 Objectifs de l'étude	39
2.4.1 Hyperlipoprotéinémie familiale combinée	40
2.4.2 Déficience familiale sévère en HDL	41

Chapitre 3: Article I

Lack of Association of the Apolipoprotein A-I-CIII-AIV Gene XmnI and SstI Polymorphisms and of the Lipoprotein Lipase Gene Mutations in Familial Combined Hyperlipoproteinemia in French Canadian Subjects	42
---	-----------

Abstract	43
Introduction	44
Methods	45
Results	48
Discussion	54
Acknowledgements	59
References	60

Chapitre 4: Article II

Severe Familial HDL Deficiency (FHD) in French Canadian Kindred: Clinical, Biochemical and Molecular Characterization	66
--	-----------

Abstract	67
Introduction	68
Methods	69
Results	73
Discussion	84
Acknowledgements	88
References	89

Chapitre 5: Article III

Cellular Cholesterol Transport and Efflux in Fibroblasts is Abnormal in Subjects with Familial HDL Deficiency	96
Abstract	97
Introduction	98
Material and Methods	99
Results	106
Discussion	119
Acknowledgements	121
References	122

Chapitre 6: Études complémentaires non publiées

6.1 Effet d'une activation pharmacologique de la protéine kinase C sur l'efflux du cholestérol intracellulaire dans les fibroblastes de sujets avec déficience familiale en HDL	127
6.2 Effet de l'inhibition de la synthèse protéique sur l'efflux du cholestérol intracellulaire	129

Chapitre 7: Discussion générale

7.1 Variabilité des niveaux de cholestérol-HDL	131
7.2 Hyperlipoprotéïnémie familiale combinée	132
7.2.1 Aspect métabolique	133
7.2.2 Aspect génétique	133
7.2.3 Aspect moléculaire	134
7.2.4 Aspect cellulaire	135
7.3 Déficience familiale en HDL	136
7.3.1 Défaut homéostatique du cholestérol cellulaire	138
7.3.2 Implication de la voie de transduction de signaux	140
7.3.3 Récepteur à HDL	142
7.3.4 Lipoprotéines	143
7.3.5 Efflux du cholestérol cellulaire	146
7.3.6 Présence de maladie coronarienne	148

Conclusion	152
-------------------------	------------

Addenda	154
----------------------	------------

Bibliographie	xvii
----------------------------	-------------

Liste des tableaux

1-I	Déterminants principaux des niveaux de cholestérol-HDL	14
1-II	Distribution des niveaux de cholestérol-HDL dans la population	15
1-III	Dyslipidémies génétiques associées à un bas niveau de HDL	26
1-IV	Anomalies génétiques associées à une déficience en HDL	30
3-I	Clinical characteristics of FCH probands	49
3-II	Mean lipid, lipoprotein-cholesterol, triglyceride levels and apo B levels in men and women with FCH	49
3-III	Apo AI XmnI and SstI RFLP in reference and FCH subjects	50
3-IV	Effect of the XmnI and SstI RFLP's on plasma lipids and lipoprotein cholesterol in FCH subjects	53
4-I	Subject Demographics	76
4-II	Plasma Lipids and Lecithin :Cholesterol Acyltransferase	78
4-III	Densitometric Analysis of the HDL-Sizing Polyacrylamide Gel Electrophoresis	80
4-IV	Segregation Analysis and Genotyping	83
5	Clinical and Biochemical Characteristics of FHD and Control Subjects	106

Liste des figures

1.1	Métabolisme des lipoprotéines	17
1.2	Homéostasie du cholestérol cellulaire	22
3.1A	Family tree of kindred FCH 2513	51
3.1B	Family tree of kindred FCH 5695	52
4.1	Pedigrees for kindreds 24430, 24842, and 24723	75
4.2	Gradient density profiles of plasma from case 24430-313 with familial HDL deficiency and a normolipemic control subject	79
4.3	Isoelectrofocusing gel of HDL protein	82
5.1	Separation of plasma lipoproteins by density gradient ultracentrifugation from an FHD patient and a control subject	108
5.2	Two-dimensional gel electrophoretic separation of apoA-I-containing lipoproteins from a control subject and the four patients with HDL deficiency (MGA, GCH, ABE, and JBE)	109
5.3	HDL ₃ -mediated cholesterol efflux in fibroblasts from control subjects compared with that in subjects with FHD	110
5.4	ApoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in individual cell lines	111
5.5	Cholesterol efflux of plasma membrane-associated cholesterol	113
5.6	Intracellular cholesteryl ester pools during HDL ₃ -mediated cholesterol efflux in fibroblasts	114
5.7	ApoA-I-mediated phospholipid efflux determined after incubating cholesterol-loaded fibroblasts with ³ Hcholine	115
5.8	¹²⁵ I-HDL binding to cholesterol loaded fibroblasts	116
5.9	HBP mRNA levels determined by RNase protection assay and densitometric analysis of the scanned data, after adjustment for 18S RNA	117
5.10	Immunoblot analysis of HBP in fibroblasts and densitometric scan of the protein bands selected by chemiluminescence	118

6.1	Efflux de cholestérol cellulaire provoqué par des HDL ₃ en présence de 1,2-dioctanoylglycérol dans des fibroblastes de sujets FHD et normal	128
6.2	Efflux de cholestérol cellulaire provoqué par des HDL ₃ en absence et en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique dans des fibroblastes d'un sujet normal	130

Liste des abréviations

ABC	ATP binding cassette
ACAT	acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase
ADN	acide désoxyribonucléique
AGL	acides gras libres
ALP	phénotype de lipoprotéines athérogènes
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
apo	apolipoprotéine(s)
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
BMI	indice de masse corporel
BSA	albumine sérique de bovin
C	cholestérol
CAD	maladie coronarienne athéroscléreuse
CE	cholestérol estérifié
CERP	protéine régulatrice de l'efflux de cholestérol
CETP	protéine de transfert du cholestérol estérifié
CL	cholestérol libre
cM	centimorgan
CoA	coenzyme A
Cox	cyclo-oxygénase
CTL	control
Cys	cystéine
Da	daltons
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DNA	acide désoxyribonucléique
DOG	dioctanoylglycérol
FCH	hyperlipoprotéïnémie familiale combinée
FH	hypercholestérolémie familiale
FHD	déficience familiale en HDL
g	gramme
Gln	glutamine
Glu	acide glutamique
Gly	glycine
HB	hyperapobétalipoprotéïnémie
HBP	protéine qui lie les HDL
HDL	lipoprotéine de haute densité
HDL-C	cholestérol lié à la HDL
HDL-R	récepteur HDL
His	histidine
HMG-CoA réductase	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase
HNCE	hydrolase neutre d'esters de cholestérol
hyperapoB	hyperapolipoprotéine B

ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
IL	interleukine
INH	inhibiteur
L	litre
LCAT	lécithine : cholestérol-acyl-transférase
LDL	lipoprotéine de faible densité
LDL-C	cholestérol lié à la LDL
Leu	leucine
LH	lipase hépatique
LOD	logarythme du odds ratio
Lp(a)	lipoprotéine petit "a"
LpA-I	lipoprotéine contenant l'apolipoprotéine A-I
LpA-I-A-II	lipoprotéine contenant l'apolipoprotéine A-I et une protéine autre que l'apolipoprotéine A-II
LpA-II : LpA-I	lipoprotéine contenant l'apolipoprotéine A-I et l'apolipoprotéine A-II
LPB	protéine qui lie les lipopolysaccharides
LpE	lipoprotéine contenant l'apolipoprotéine E
LPL	lipoprotéine lipase
LYS	lysosome
MAP	protéine à activité mitogène
mg	milligramme
mmol	millimole
mRNA	acide ribonucléique messenger
NCEH	hydrolase neutre du cholestérol estérifié
NCEP	programme national d'éducation sur le cholestérol
NCS	sérum de veau nouveau-né
nm	nanomètre
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAGGE	électrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PC	phosphatidylcholine
PCR	réaction en chaîne à la polymérase
PKC	protéine kinase C
PL	phospholipides
Pro	proline
proapo	proapolipoprotéine
REL	réticulum endoplasmique lisse
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RFLP	fragment de restriction polymorphique
RNA	acide ribonucléique
RNase	ribonucléase
SR-BI	récepteur <i>scavenger</i> de classe B, type I
TG	triglycérides
Thr	thréonine
TLC	chromatographie sur couche mince
TLF	facteur trypanolytique
TNF	facteur de nécrose tumoral

tPA	activateur tissulaire du plasminogène
TRL	lipoprotéines riches en triglycérides
Tyr	tyrosine
UTR	région non traduite
Val	valine
VCAM	molécule d'adhésion des cellules vasculaires
VLDL	lipoprotéine de très faible densité
VLDL-C	cholestérol lié à la VLDL
μCi	microcurie
μg	microgramme
μM	micromolaire

Remerciements

J'aimerais remercier mes directeur et co-directeur, le Dr B. Charles Solymoss et le Dr Jacques Genest Jr pour leur enseignement et leur supervision tout au cours de mes études graduées. Au Dr Solymoss, pour mon initiation au domaine des lipides et maladies cardio-vasculaires et ce contact fructueux avec le laboratoire du Dr Genest Jr qui a permis d'amorcer cette thèse. Au Dr Genest Jr, pour mon accueil dans son laboratoire et son enseignement généreux d'une multitude de concepts cliniques et biochimiques sur les dyslipidémies et techniques de biologie moléculaire et cellulaire qui ont mené le développement et la réalisation de cette thèse.

L'ensemble de ces travaux n'aurait pu être réalisé sans l'aide et l'implication de plusieurs personnes. De l'équipe du laboratoire du Dr Genest Jr, je remercie tout spécialement ma collègue Betsie Boucher pour sa vaillante collaboration technique à toutes les étapes de ces travaux, le Dr Yu Lu pour sa précieuse contribution aux analyses moléculaires et cellulaires, ainsi que Paule Marchand pour ses nombreux services. Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Larbi Krimbou pour le partage de ses connaissances érudites, son enseignement de plusieurs techniques et méthodes d'analyse et son importante contribution scientifique aux développements des travaux de ces études.

Mes remerciements s'adressent également à l'équipe du laboratoire du Dr Jean Davignon, pour leurs conseils ou leurs aides techniques inestimables. Particulièrement, je remercie le Dr Louise Marie Giroux pour son enseignement des techniques de culture cellulaire, Claudia Rodriguez pour les techniques d'analyses des protéines, Nancy Doyle et Louis-Jacques Fortin pour les techniques d'isolation des lipoprotéines. Les conseils de Jacques Lavigne et Ann Chamberland pour les travaux de biologie moléculaire étaient aussi fort appréciés. Je remercie de plus le Dr Jeffrey Cohn et le Dr Jean Davignon pour les discussions stimulantes.

J'aimerais souligner l'aimable contribution du groupe des technologistes médicaux du laboratoire de biochimie de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour la référence de sujets avec déficience en HDL. Je remercie tout particulièrement Madame Claire Hudon pour son grand dévouement.

Finalement, j'aimerais exprimer ma reconnaissance au Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal sous la direction du Dr Stanley Nattel, de même qu'au Dr Jacques Genest Jr pour le support financier tout au long de ces travaux.

L'ensemble de ces travaux fut réalisé au laboratoire de génétique cardio-vasculaire de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal sous la direction du Dr Jacques Genest Jr.

Introduction

Au cours des dernières décennies, plusieurs études prospectives [1-4] et rétrospectives [5-9] marquantes ont démontré l'importance incontestable des dyslipidémies dans le développement de l'athérosclérose coronarienne. De ces anomalies lipidiques, quatre types sont fréquemment rencontrés dans la population en général: l'augmentation du cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (cholestérol-LDL); la diminution du cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (cholestérol-HDL), habituellement accompagnée d'une augmentation des triglycérides ou des niveaux de lipoprotéines de très basse densité (VLDL); l'augmentation des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et des particules résiduelles de chylomicrons; la présence anormalement élevée de la lipoprotéine (a) [Lp(a)] dans le plasma. L'une ou plus d'une de ces anomalies sont retrouvées chez 50-80% des survivants d'infarctus du myocarde [10].

-LDL et HDL

Des niveaux plasmatiques anormalement élevés de cholestérol-LDL [11-13] et abaissés de cholestérol-HDL [14-17] ont été associés depuis longtemps à une augmentation du risque de la maladie coronarienne. Il a été observé qu'une augmentation du cholestérol total reflétait le plus souvent une augmentation du cholestérol-LDL, lequel représente 70% du cholestérol plasmatique [28], mais que des niveaux abaissés de cholestérol-HDL constituaient l'anomalie la plus fréquemment rencontrée dans la maladie coronarienne précoce [29]. À partir de profils lipidiques obtenus auprès de patients examinés par angiographie coronarienne, le cholestérol-HDL est identifié comme variable indépendante la plus étroitement associée à la présence et à la sévérité de la maladie coronarienne après ajustement pour l'âge et le genre [30]. Au cours des deux dernières décennies, l'attention portée aux lipides des lipoprotéines comme marqueurs du risque coronarien s'est déplacée vers les constituants protéiques des lipoprotéines. Ainsi dans certaines études, mais non dans toutes, les niveaux plasmatiques ou sériques d'apolipoprotéine (apo) B-100 et d'apoA-I, principales protéines des LDL et HDL respectivement, sont rapportés comme étant de meilleurs indicateurs du risque d'athérosclérose coronarienne que les niveaux de cholestérol-LDL ou HDL plus classiquement mesurés [revu dans 18,72].

- *Triglycérides*

Les niveaux élevés de triglycérides sont communément rencontrés dans la population. L'anomalie est souvent reliée à une sensibilité plus marquée des triglycérides à l'alcool, aux œstrogènes exogènes, à la prise de poids, à une hyperglycémie ou une hypothyroïdie [28]. L'association d'une élévation plasmatique des triglycérides avec le risque coronarien demeure cependant moins bien établie. Bien que des niveaux élevés de triglycérides aient été positivement associés au risque d'athérosclérose coronarienne dans des analyses univariées, ces associations tendent à disparaître dans les analyses multivariées lorsque d'autres facteurs de risque lipidiques et non lipidiques sont pris en compte [19]. Ainsi, en incluant les niveaux de cholestérol-HDL et de triglycérides dans un modèle multivarié, les triglycérides plasmatiques perdent leur pouvoir prédictif de la maladie alors que les niveaux de cholestérol-HDL y demeurent fortement et négativement associés [20,21]. Statistiquement, environ 40% de la variance du cholestérol-HDL peut être expliquée par des variations des niveaux de triglycérides [22]. Également, des altérations du métabolisme du glucose, plus étroitement associées au risque d'athérosclérose et entraînant l'augmentation des triglycérides plasmatiques, contribuent à éliminer ou du moins réduire significativement le rôle des triglycérides comme facteur de risque prédictif indépendant [23]. L'association des triglycérides plasmatiques au risque coronarien apparaît donc complexe et semble surtout dépendre d'une association entre l'augmentation des niveaux de triglycérides, une diminution des niveaux de HDL et la présence de diverses formes athérogéniques inhabituelles de particules LDL [19]. Des niveaux élevés de triglycérides sont souvent le reflet d'une augmentation de particules résiduelles riches en triglycérides au potentiel athérogénique et non révélées par une simple mesure de la triglycéridémie à jeun [19,23]. Les niveaux postprandiaux de triglycérides plasmatiques pourraient ainsi avoir un rôle plus important que les niveaux à jeun de triglycérides, bien que peu de données soient actuellement rapportées [23]. Mentionnons également des associations observées entre les taux élevés de triglycérides et des altérations du système de coagulation, permettant de relier les triglycérides aux événements thrombotiques des complications tardives de l'athérosclérose. Une augmentation plasmatique des triglycérides a été associée à une augmentation de plusieurs facteurs de coagulation, notamment les facteurs VII_c, VIII_c et X_c, de même qu'à une altération des facteurs fibrinolytiques dont une augmentation de l'activité de PAI-1 et une diminution de l'activité du tPA [23-27].

- Chylomicrons résiduels et IDL

Parmi d'autres dyslipidémies rencontrées, l'hyperlipoprotéïnémie de type III se caractérise par une accumulation plasmatique de résidus de chylomicrons et VLDL (nommées IDL), provoquant une augmentation à la fois du cholestérol et des triglycérides [31]. L'anomalie traduit un défaut de catabolisme des particules résiduelles de chylomicrons et VLDL dû à la présence d'une forme dysfonctionnelle de l'apoE à leur surface. Conséquemment, les résidus de chylomicrons et les IDL ne sont pas normalement clairés par la voie des récepteurs cellulaires hépatiques B:E et E, causant leur accumulation dans le plasma. Cette forme de dyslipidémie a été étroitement associée à la maladie coronarienne précoce, à l'accident cérébro-vasculaire et à la maladie vasculaire périphérique [28].

- Lp(a)

Des niveaux élevés de Lp(a) sont retrouvés à des écarts très variables dans la population. L'anomalie a été reconnue par certaines études cas-témoins comme facteur de risque indépendant de l'athérosclérose coronarienne et des maladies cérébro-vasculaires [32-36], paraissant également corrélée avec la sévérité de la maladie coronarienne [37]. Aux côtés des études cas-témoins, les études prospectives ayant mis en relation les niveaux de Lp(a) avec les événements coronariens futurs ont fourni des résultats inconsistants [38,39]. La fraction protéique de la Lp(a) se compose d'une molécule d'apoB liée par un pont disulfure à une molécule d'apo(a) de taille très variable dont la fonction demeure inconnue [28]. L'apo(a) possède une forte homologie de structure avec le plasminogène bien qu'étant dépourvue de son activité fibrinolytique [32]. Les niveaux de Lp(a) apparaissent inversement corrélés avec la taille de l'apo(a), conférant aux individus possédant les plus petits isomorphes d'apo(a) un risque accru de maladie coronarienne [32]. Les polymorphismes de taille de l'apo(a) contribueraient pour près de 70% de la variance des niveaux de Lp(a) [40].

- Dyslipidémies secondaires

Les dyslipidémies peuvent fréquemment être acquises ou secondaires à plusieurs facteurs médicaux. Les causes majeures d'une dyslipidémie secondaire incluent le diabète mellitus, une surconsommation d'alcool, la prise de certains agents pharmacologiques (diurétiques, contraceptifs oraux, rétinoïdes, corticostéroïdes, stéroïdes anabolisants, progestatifs dérivés de la testostérone), une hypothyroïdie, une insuffisance rénale chronique, un syndrome néphrotique, une cholestase, une bilémie, l'anorexie nerveuse et la grossesse [46].

Nous avons récemment démontré que les anomalies lipidiques retrouvées dans la maladie coronarienne accompagnent souvent d'autres troubles métaboliques dont l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline, le diabète et l'obésité [41,42]. Ces observations tendent à démontrer l'existence d'un lien métabolique qui associe les désordres lipidiques à d'autres troubles du métabolisme, le plus souvent génétiquement déterminés [42].

- Dyslipidémies familiales

Les influences génétiques sur le métabolisme des lipoprotéines sont bien établies. Dans des études de population, des niveaux anormaux de lipides sont fréquemment retrouvés au sein de familles entières [43-45]. Une étude rapporte qu'une dyslipidémie familiale a été retrouvée dans 54% des familles de sujets présentant une maladie coronarienne précoce [52]. Parmi ces anomalies, l'hypercholestérolémie familiale [47], l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée [48-50], l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale [51], l'hypertriglycéridémie familiale avec hypoalphalipoprotéïnémie [52], l'hyperapobétalipoprotéïnémie [55] et l'excès familial en Lp(a) [52] ont été identifiées. D'autres cas de désordres lipoprotéiniques familiaux incluent le défaut familial de l'apoB [53] et la dysbétalipoprotéïnémie familiale ou hyperlipoprotéïnémie de type III [54].

Parmi les patients présentant une hypercholestérolémie génétique, la majorité ont un défaut appartenant au groupe des hypercholestérolémies communes ou polygéniques. De loin la cause la plus fréquente d'un niveau élevé de cholestérol, ce défaut reflète l'interaction de multiples gènes, incluant ceux codant pour l'apoE et l'apoB, avec des facteurs diététiques et autres facteurs environnementaux [46].

- Hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale est un défaut spécifique du gène codant pour le récepteur des LDL qui provoque une augmentation marquée du cholestérol-LDL [28]. L'anomalie est retrouvée chez environ 5% des patients avec infarctus du myocarde [56] et apparaît transmise selon un mode autosomique dominant avec plus de 150 différentes mutations décrites [28]. La forme hétérozygote, associée à la maladie coronarienne précoce, est assez répandue dans la population générale avec une incidence d'environ 1/500, pouvant atteindre 1/250 à 1/150 dans certaines régions du Québec [57]. La forme homozygote, plus sévère, prédispose particulièrement l'homme à un infarctus du myocarde fatal vers l'âge de 30 ans [28,57].

- Déficit familial de l'apoB

La déficience familiale de l'apoB est une anomalie monogénique commune due à une mutation du gène de l'apoB [72,73]. La substitution d'un acide aminé dans la protéine qui en résulte altère la liaison de l'apoB au récepteur LDL affectant la captation des particules LDL et causant une élévation plasmatique du cholestérol-LDL [28]. La forme hétérozygote augmente d'au moins 50% les niveaux de cholestérol-LDL comparativement aux sujets non affectés dans la famille [28]. Cliniquement, l'anomalie a une expression moins sévère que l'hypercholestérolémie familiale bien que les niveaux de cholestérol puissent atteindre ceux retrouvés dans l'hypercholestérolémie familiale [28].

- Hyperlipoprotéïnémie de type III

L'hyperlipidémie ou hyperlipoprotéïnémie de type III, moins répandue, est une cause importante de maladie coronarienne précoce d'origine génétique [46]. L'anomalie se présente sous forme polygénique et dominante avec des augmentations marquées typiques des niveaux de cholestérol et de triglycérides, résultant d'une accumulation de particules résiduelles contenant l'apoE en présence d'un phénotype E2/2 de l'apoE [46,57]. Chez les sujets incapables de compenser une apoE dysfonctionnelle, il y a manifestation d'une hyperlipidémie à jeun dû à une élimination inefficace des résidus de chylomicrons dans le plasma en état postprandial [28]. D'autres troubles métaboliques (obésité, hypothyroïdie, diabète) y sont également associés [46].

- Hyperlipoprotéïnémie familiale combinée

L'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée est la dyslipidémie génétique la plus souvent rencontrée et la cause la plus fréquente de maladie coronarienne précoce [28]. Elle se caractérise par la présence d'une élévation du cholestérol-LDL et des triglycérides-VLDL chez des membres d'une même famille. Les sujets affectés peuvent présenter l'une ou l'autre ou les deux anomalies à la fois et leur profil lipidique peut varier au cours du temps [28]. Le désordre est dû à une surproduction de particules VLDL et d'apoB entraînant une augmentation plasmatique des VLDL causant chez certains membres de la famille une hypertriglycéridémie, avec souvent diminution du cholestérol-HDL [46]. Chez d'autres, pourvus d'une lipolyse plus efficace, une augmentation seule des particules LDL apparaît [28]. L'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée est retrouvée chez environ 10% des sujets avec infarctus du myocarde [56]. Le désordre est exacerbé en présence d'obésité, de diabète, d'hypothyroïdie, d'œstrogène exogène et d'alcool [28].

- Hypertriglycéridémie

Alors qu'une hypertriglycéridémie modérée peut être secondaire à d'autres anomalies métaboliques ou à des agents exogènes, une hypertriglycéridémie sévère reflète habituellement une expression génétique de cause hétérogène [28]. Les formes familiales incluent l'hypertriglycéridémie familiale (hyperlipidémie de type IV), le syndrome de chylomicronémie (hyperlipidémie de type I et V) et l'hyperlipidémie des particules résiduelles (hyperlipidémie de type III) [46]. Souvent chez un individu l'hypertriglycéridémie se trouve associée à une constellation de troubles métaboliques dont une agrégation des manifestations (hyperinsulinémie, hyperglycémie et hypertension) est désignée syndrome métabolique ou syndrome X [58]. Au sein de familles une hypertriglycéridémie avec ou sans autres anomalies lipidiques accompagne parfois une augmentation de la pression sanguine; ce syndrome spécifique a été désigné dyslipidémie familiale hypertensive [63]. Ces syndromes sont étroitement reliés à la maladie coronarienne [64]. Étant donné la relation inverse fréquemment observée entre niveaux de triglycérides et de cholestérol-HDL, il est suggéré qu'une hypertriglycéridémie familiale en présence d'un niveau abaissé de cholestérol-HDL définisse une anomalie distincte [62]. Cette forme de dyslipidémie a en effet été retrouvée parmi les anomalies lipidiques familiales les plus communes dans un groupe de familles de patients présentant une maladie coronarienne précoce, alors que 1% de ce même groupe présentaient une hypertriglycéridémie familiale sans niveau abaissé de cholestérol-HDL [62]. La chylomicronémie sévère à jeun, autre forme d'hypertriglycéridémie génétique, a été attribuée à des mutations fonctionnelles du gène codant pour la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme responsable de la lipolyse des particules riches en triglycérides ou de son cofacteur, l'apoC-II. Il n'y a pas évidence que ce défaut augmente le risque de maladie coronarienne [28,46], bien qu'une étude récente y suggère une relation [59]. Des niveaux élevés de triglycérides représenteraient donc un risque de maladie coronarienne seulement lorsque d'autres désordres lipoprotéiniques (cholestérol-LDL augmenté ou cholestérol-HDL abaissé) ou métaboliques athérogènes y sont associés [21,28,62]. L'hypertriglycéridémie génétique a également été associée à des polymorphismes sur le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV [60], d'où il est suggéré que spécifiquement le gène de l'apoC-III soit responsable de la régulation des niveaux de triglycérides plasmatiques [61].

- *Hyperapobétalipoprotéinémie familiale*

L'hyperapobétalipoprotéinémie ou hyperapoB familiale se caractérise par une élévation plasmatique de l'apoB totale et la présence de particules LDL petites et denses [55,65]. Ce syndrome est communément rencontré chez les sujets présentant une maladie coronarienne précoce [62]. Il est suggéré que l'anomalie soit attribuable à une hypersécrétion hépatique de particules renfermant l'apoB [66] et que le syndrome partage suffisamment de caractéristiques biochimiques et physiologiques avec l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée pour considérer ces deux anomalies comme faisant partie du même syndrome [62,75]. Au moins cinq défauts métaboliques ou génétiques associés à l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée/hyperapoB ont été rapportés: une liaison réduite de la protéine *acylation-stimulating protein* [67], un défaut génétique hétérozygote du gène de la lipoprotéine lipase [68], une variabilité génétique sur le locus du gène de l'apoA-I-C-III-A-IV [69] de même que près ou sur le locus du gène du récepteur LDL [70] et un *turnover* diminué des lipides dans les cellules graisseuses périphériques [71].

- *Lp(a) augmentée*

Les niveaux plasmatiques de Lp(a) sont presque entièrement déterminés génétiquement [28]. Une forte prévalence (19%) d'une élévation de Lp(a) est retrouvée auprès de patients présentant une dyslipidémie familiale avec maladie coronarienne précoce [52]. Près de 90% de la variabilité des niveaux de Lp(a) dans la population est attribuable au gène de l'apo(a), lequel présente de nombreuses variations de séquence et de taille [40]. L'hétérogénéité dans la séquence du gène de l'apo(a) contribuerait ainsi aux variations génétiques observées dans le risque de maladie coronarienne non seulement par la modulation des niveaux de Lp(a) mais également par des différences dans la molécule d'apo(a) qui en résulte [28].

- *Hypoalphalipoprotéinémie*

Un niveau abaissé de cholestérol-HDL ou hypoalphalipoprotéinémie est souvent rencontré chez des sujets présentant une maladie coronarienne précoce. Une étude rapporte que l'anomalie est retrouvée chez 36% des hommes de moins de 60 ans présentant une maladie coronarienne documentée par angiographie [76]. Dans une autre étude, l'hypoalphalipoprotéinémie demeurerait l'anomalie lipoprotéinique la plus commune chez des sujets avec maladie coronarienne précoce diagnostiquée par angiographie (39% des cas) [29]. Différentes formes de dyslipidémies génétiques retrouvées dans la maladie coronarienne précoce expriment une hypoalphalipoprotéi-

némie: l'hypertriglycéridémie familiale avec hypoalphalipoprotéinémie, l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée et l'hypoalphalipoprotéinémie familiale sans autres anomalies lipoprotéiniques [62]. Ainsi, les formes communes d'une hypoalphalipoprotéinémie rencontrées chez les sujets avec maladie coronarienne représentent un spectre large de désordres lipoprotéiniques dont souvent les phénotypes se chevauchent [62]. Il a été observé que dans des familles de sujets présentant une maladie coronarienne précoce et exprimant une forme d'hypoalphalipoprotéinémie familiale, l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée ou hyperapoB représentait la forme la plus commune [62]. De fait, l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée compterait pour la majorité des désordres lipoprotéiniques génétiques rencontrés dans la maladie coronarienne précoce, avec, dans la plupart des cas, l'expression d'une hypoalphalipoprotéinémie. Des études métaboliques sur la cinétique des particules HDL ont démontré une augmentation du taux de catabolisme fractionnel des HDL ou de l'apoA-I chez des sujets présentant différentes formes d'hypoalphalipoprotéinémie, suggérant un catabolisme accru des particules HDL plutôt qu'une réduction de leur synthèse [77-79]. Il est également trouvé que le taux de catabolisme fractionnel des HDL augmente avec la diminution de la taille des particules HDL, laquelle est négativement corrélée aux niveaux de triglycérides [72]. Le catabolisme des particules HDL apparaît donc augmenté en présence d'un niveau abaissé de cholestérol-HDL dû en partie à une réduction de la taille des particules. De rares cas d'hypoalphalipoprotéinémie ont été associés à des réarrangements ou mutations non sens du gène de l'apoA-I [80-83], à une déficience de l'enzyme lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT) [84-86], à la maladie de Tangier [87] ainsi qu'à une hypertriglycéridémie sévère de cause multiple dont une déficience en LPL [88,89] ou en son activateur, l'apoC-II [90]. Dans une étude familiale de sujets avec maladie coronarienne précoce, les cas d'une hypoalphalipoprotéinémie pure, sans autre anomalie des lipoprotéines et d'expression familiale, représentaient 4% des sujets. Cette donnée est comparable à la prévalence de l'hypercholestérolémie familiale retrouvée dans la même population (3-5%) [52,64].

À l'exception de l'hypercholestérolémie familiale, le défaut familial de l'apoB, la dysbêtalipoprotéinémie, l'excès familial en Lp(a) ainsi que de rares défauts sur le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV où une anomalie monogénique a été identifiée [91-93], le défaut moléculaire de la plupart des dyslipidémies familiales demeurent aujourd'hui inconnu. On croit que le mode de transmission de plusieurs de ces

désordres est autosomique dominant ou polygénique et à des degrés variables de pénétrance et/ou d'expression chez l'adulte [62]. Sur une base purement phénotypique, le diagnostic différentiel d'une dyslipidémie familiale est souvent difficile et, communément, des désordres génétiques et secondaires sont présents simultanément [46]. De plus, un chevauchement considérable est retrouvé dans l'expression phénotypique de plusieurs de ces défauts, notamment entre l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée, l'hypertriglycéridémie familiale, l'hypoalphalipoprotéïnémie familiale, le syndrome métabolique, l'hyperapoB et la dyslipidémie hypertensive familiale [64].

Beaucoup de nos connaissances actuelles sur le métabolisme des lipoprotéines ont été acquises par des études biochimiques et moléculaires chez des sujets présentant des altérations des voies physiologiques des lipoprotéines. Celles des LDL notamment ont été particulièrement explorées. Cependant, dû à sa grande complexité, le métabolisme des HDL est demeuré encore mal compris. L'investigation des syndromes de HDL abaissées n'a pu clairement expliquer jusqu'à ce jour les variations majeures des niveaux de cholestérol-HDL observées dans les populations, ni élucider tous les détails des mécanismes par lesquels les HDL participent au transport de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie.

Afin d'apporter de nouvelles connaissances sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines, cette thèse abordera spécifiquement le métabolisme des HDL par l'investigation de dyslipoprotéïnémies familiales exprimant une hypoalphalipoprotéïnémie. Par l'étude de la biochimie et la génétique moléculaire de ce désordre, nous tenterons de préciser les anomalies physiologiques et moléculaires retrouvées dans l'hypoalphalipoprotéïnémie pour en dégager les causes et mieux comprendre certains mécanismes qui sous-tendent l'homéostasie du cholestérol ainsi que leurs altérations impliquées dans le développement de la maladie coronarienne athéroscléreuse.

Les formes d'hypoalphalipoprotéïnémie familiale sont l'expression d'un large spectre d'anomalies génétiques dont la plupart sont de causes biochimiques et moléculaires mal comprises ou inconnues. L'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée compte pour la majorité des anomalies affichant une hypoalphalipoprotéïnémie retrouvées dans la maladie coronarienne précoce [62]. Le défaut a été associé à une hypersécrétion hépatique d'apoB [75]. Les études ayant examiné les associations probables avec le gène de l'apoB ou le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV ont fourni des données inconsistantes. Par ailleurs, chez un cinquième des familles affichant un phénotype d'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée, un défaut du gène de la lipoprotéine lipase a

été démontré [68], suggérant l'existence d'une hétérogénéité génétique dans l'expression de cette dyslipidémie. Une forme familiale beaucoup moins commune d'hypoalphalipoprotéinémie exprime des niveaux sévèrement abaissés de cholestérol-HDL sans autres anomalies sévères des lipoprotéines. Ces formes relativement peu fréquentes ont été associées jusqu'à présent à de rares désordres du complexe génique apoA-I-C-III-A-IV et autres désordres du métabolisme des HDL ainsi qu'à la maladie de Tangier [94].

Dans le cadre d'une investigation des bases métaboliques et moléculaires de l'hypoalphalipoprotéinémie familiale, deux expressions de l'anomalie génétique seront étudiées: une hypoalphalipoprotéinémie secondaire et une hypoalphalipoprotéinémie primaire. Ces études viseront à mieux comprendre le métabolisme des HDL et son implication dans les dysfonctions lipidiques fréquemment associées au développement de la maladie coronarienne. Le premier volet de cette thèse présentera une analyse génétique et moléculaire de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée associée à l'expression secondaire d'une hypoalphalipoprotéinémie et dont les bases moléculaires demeurent actuellement inconnues. La génétique moléculaire de cette dyslipidémie sera examinée dans des familles de souche canadienne française par l'approche "gène candidat". Des polymorphismes sur le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV et la présence d'anomalies fonctionnelles du gène de la lipoprotéine lipase seront vérifiés chez 54 familles bien caractérisées présentant une hyperlipoprotéinémie familiale combinée. Les données moléculaires recueillies chez ces familles seront comparées à une population témoin de même souche pour vérifier la présence d'une association potentielle entre ces locus géniques et l'expression de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée dans cette population. Le deuxième volet de cette thèse portera sur l'étude de 3 cas d'hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère décelés dans la population canadienne française et ne présentant aucune autre anomalie sévère des lipoprotéines. Pour examiner les causes physiopathologiques de cette forme d'anomalie génétique des HDL, le défaut sera caractérisé du point de vue clinique, génétique, biochimique et de la physiologie cellulaire.

Les données de ces études nous ont démontré que l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée n'apparaît pas génétiquement liée au complexe génique apoA-I-C-III-A-IV, ni à des mutations fonctionnelles communes du gène de la lipoprotéine lipase dans la population québécoise de souche canadienne française. Le défaut semblerait plutôt polygénique, phénotypiquement mal défini et influencé par des facteurs

environnementaux. La caractérisation de 3 cas d'hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère dans la population canadienne française nous a permis d'identifier une nouvelle forme de dyslipidémie qui associe un niveau sévèrement abaissé de cholestérol-HDL à un défaut d'efflux de cholestérol cellulaire sans manifestations cliniques. Nous démontrons que ce défaut représente une nouvelle catégorie de désordre des lipoprotéines impliquant une anomalie du transport intracellulaire du cholestérol dont les causes biochimiques et moléculaires demeurent à ce jour inconnues.

Première partie: revue de la littérature

Chapitre 1: Physiologie et physiopathologie du métabolisme des lipoprotéines de haute densité

1.1 Introduction

Les lipides circulant dans le plasma et dans le liquide lymphatique humain se composent essentiellement de cholestérol libre, d'esters de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides. Ils circulent sous forme de larges complexes ou agrégats moléculaires nommés lipoprotéines, formés au centre d'un noyau neutre d'esters de cholestérol et/ou de triglycérides enveloppé à la surface d'une couche lipoprotéique polaire comprenant phospholipides, cholestérol libre et apolipoprotéines. En plus de fournir une intégrité structurelle aux lipoprotéines, les apolipoprotéines sont également impliquées dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, servent à l'activation d'enzymes de modification des lipoprotéines et agissent comme ligands pour un large éventail de récepteurs et protéines de conduction membranaire. Les lipoprotéines plasmatiques se composent de lipoprotéines de basse densité (LDL), de lipoprotéines de haute densité (HDL) et de lipoprotéines riches en triglycérides (TRL), comprenant les chylomicrons, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) [91]. Sur la base de données épidémiologiques, expérimentales et animales, les lipoprotéines riches en triglycérides et les LDL sont considérées athérogènes, alors que les HDL ont un effet protecteur contre l'athérosclérose. On reconnaît de plus en plus de rôles aux lipoprotéines, autre que celui du simple transport de lipides neutres. Chez les mammifères en général, les HDL ont de multiples fonctions reconnues, dont le retour du cholestérol vers le foie [95] fournissant les molécules de cholestérol nécessaires à la synthèse d'acide biliaire, le transport de l'apo J α - β (clusterine) [96,97], le transport de la paraoxonase [98], la prévention contre l'oxydation des lipoprotéines (principalement des LDL) [99] et l'apport de cholestérol aux cellules surrénales et cellules des tissus stéroïdogéniques pour la synthèse d'hormones. Ce processus implique la captation sélective du cholestérol par la voie d'un récepteur *scavenger*, le SR-BI, membre de la superfamille de protéines CD36 [100,211]. Les HDL agissent aussi d'accepteur d'endotoxines lipopolysaccharidiques bactériennes

protégeant la paroi vasculaire des dommages causés par des endotoxines bactériennes [95]. De plus, chez l'humain, les HDL assurent une protection contre l'infection du *Trypanosoma brucei brucei* [101,102]. Elles peuvent également moduler l'expression des molécules d'adhésion cellulaires des cellules endothéliales stimulées par des cytokines [103] et préviendraient l'agrégation plaquettaire en modulant la régulation du gène de la cyclo-oxygénase-2 (Cox-2) dans les cellules musculaires lisses, augmentant la production et le temps de demi-vie de la prostacycline (PGI₂) [104].

1.2 HDL et maladie coronarienne, données épidémiologiques

Dans de larges études de population, des niveaux abaissés de cholestérol-HDL ont été étroitement associés à des concentrations augmentées de triglycérides plasmatiques, au sexe masculin, à un indice plus élevé de masse corporelle, à une consommation réduite d'alcool et à une tension artérielle augmentée. Chez les femmes, à ces facteurs s'ajoutent l'augmentation en âge, le statut ménopausé, des niveaux augmentés de glucose plasmatique et le tabagisme [105]. Le tableau I résume les déterminants principaux des niveaux de cholestérol-HDL retrouvés dans la population. Les études prospectives épidémiologiques ont démontré de façon consistante la relation inverse entre les concentrations de cholestérol-HDL plasmatique et l'incidence de la maladie coronarienne [2,42,76,106-114]. L'étude *Framingham Heart* révèle que les niveaux de cholestérol-HDL sont un facteur de risque fort et indépendant de maladie coronarienne, bien gradé dans la population. Les effets protecteurs d'un niveau élevé de cholestérol-HDL persistaient jusqu'aux âges de 80 ans [107]. Par contre, des niveaux abaissés étaient associés au risque d'athérosclérose coronarienne même en présence de niveaux désirables de cholestérol plasmatique total (< 5.2 mmol/L). Le risque de maladie coronarienne s'accroît de 2% chez l'homme et de 3% chez la femme à chaque niveau de réduction de 1 mg/dL (0.03 mmol/L) du cholestérol-HDL. Dans la majorité des études, cette relation demeure statistiquement significative après ajustement pour d'autres facteurs de risque lipidiques et non lipidiques. L'habilité du cholestérol-HDL à prédire le risque coronarien indépendamment du cholestérol-LDL est démontrée par les données de l'étude PROCAM [115] où près de 5 000 hommes participants étaient suivis pendant une période de 6 ans. L'incidence de maladie coronarienne corrélait avec une diminution des niveaux de cholestérol-HDL aussi bien qu'avec une augmentation des

niveaux de cholestérol-LDL. Les niveaux de cholestérol-HDL ont aussi été spécifiquement reliés à la mortalité coronarienne, particulièrement chez les sujets diabétiques [116]. L'augmentation de décès par maladie coronarienne a été associée à des niveaux abaissés de cholestérol-HDL (< 0.9 mmol/L) peu importe la concentration de cholestérol total au-dessus ou au-dessous de 5.2 mmol/L [114]. Des études cas-témoins ont démontré que les particules plus larges de HDL₂, plutôt que les particules de HDL₃, étaient responsables de la relation inverse entre les niveaux de HDL et le risque de maladie coronarienne. Cependant, les données de l'étude longitudinale *Physician's Health*, impliquant plus de 14 000 hommes médecins, ont démontré que les deux fractions de HDL, HDL₂ et HDL₃, ont un rôle protecteur contre la maladie coronarienne [117]. Malgré les évidences épidémiologiques associant les niveaux abaissés de cholestérol-HDL à une incidence accrue d'athérosclérose coronarienne, il demeure incertain si les HDL jouent un rôle direct ou indirect dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Les niveaux de cholestérol-HDL retrouvés dans une population normale, d'après les données du *Lipid Research Clinics database* [118], sont présentés au Tableau II. Des concentrations inférieures à 0.90 mmol/L sont considérées comme un facteur de risque indépendant pour le développement de la maladie coronarienne [119].

Tableau I - Déterminants principaux des niveaux de cholestérol-HDL

Sexe masculin
Triglycérides augmentés
Postménopause
Tabagisme
Indice de masse corporelle
Tension artérielle
Glucose plasmatique
Consommation d'alcool (réduite)

Des évidences considérables, largement basés sur des données épidémiologiques, supportent un rôle indirect des HDL dans l'athérosclérose. Ces évidences viennent du lien entre des niveaux abaissés de cholestérol-HDL et une combinaison de facteurs de risque d'athérosclérose rencontrés chez un même individu et communément référé sous le terme de "syndrome métabolique", "syndrome X" ou "syndrome plurimétabolique". Ce syndrome est caractérisé par une résistance périphérique à l'insuline, une élévation systémique de la pression sanguine, un état procoagulant et un

Tableau II - Distribution des niveaux cholestérol-HDL dans la population

Âge	cholestérol-HDL (mmol/L)						
	percentile						
	5	10	25	50	75	90	95
Hommes							
5 - 9	0.98	1.09	1.27	1.40	1.63	1.81	1.91
10 - 14	0.96	1.03	1.19	1.42	1.58	1.84	1.91
15 - 19	0.78	0.88	1.01	1.19	1.34	1.53	1.63
20 - 24	0.78	0.83	0.98	1.16	1.32	1.47	1.63
25 - 29	0.80	0.83	0.96	1.14	1.29	1.50	1.63
30 - 34	0.72	0.83	0.98	1.16	1.34	1.53	1.63
35 - 39	0.75	0.80	0.93	1.11	1.27	1.50	1.60
40 - 44	0.70	0.80	0.93	1.11	1.32	1.55	1.73
45 - 49	0.78	0.85	0.98	1.16	1.34	1.55	1.66
50 - 54	0.72	0.80	0.93	1.14	1.32	1.50	1.63
55 - 59	0.72	0.80	0.98	1.19	1.42	1.66	1.84
60 - 64	0.78	0.88	1.06	1.27	1.58	1.78	1.91
65 - 69	0.78	0.85	1.01	1.27	1.60	1.91	2.02
70 - 100	0.80	0.85	1.03	1.24	1.45	1.81	1.94
Femmes							
5 - 9	0.93	0.98	1.22	1.34	1.58	1.73	1.89
10 - 14	0.96	1.03	1.16	1.34	1.50	1.66	1.81
15 - 19	0.91	0.98	1.11	1.32	1.58	1.76	1.91
20 - 24	0.85	0.96	1.14	1.32	1.60	1.86	2.04
25 - 29	0.96	1.01	1.22	1.42	1.63	1.91	2.15
30 - 34	0.93	1.03	1.19	1.42	1.66	1.89	1.99
35 - 39	0.88	0.98	1.14	1.37	1.66	1.91	2.12
40 - 44	0.88	1.01	1.24	1.45	1.68	2.04	2.28
45 - 49	0.88	1.06	1.22	1.50	1.76	2.12	2.25
50 - 54	0.96	1.06	1.29	1.60	1.84	2.17	2.38
55 - 59	0.96	1.06	1.29	1.55	1.89	2.20	2.35
60 - 64	0.98	1.14	1.32	1.58	1.94	2.25	2.38
65 - 69	0.91	0.98	1.27	1.60	1.89	2.20	2.53
70 - 100	0.85	0.98	1.24	1.55	1.84	2.12	2.38

Valeurs des niveaux de cholestérol-HDL d'après l'étude de population *Lipid Research Clinics* chez les hommes et les femmes (sans hormonothérapie) aux Canada et aux États-Unis.

D'après: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, D.C., *The Lipid Research Clinics Population Studies Data Book*, vol. 1. The prevalence study. *NIH publication 80-1527*, 1980; pp. 28-81.

état dyslipidémique ou un phénotype de lipoprotéines athérogènes (ALP). Les caractéristiques communes de l'ALP, ne survenant pas nécessairement toutes chez un

même individu, sont: une augmentation modérée des niveaux plasmatiques de triglycérides, évidence d'une accumulation de résidus de lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) (e.g. concentration augmentée de particules IDL), un niveau abaissé de cholestérol-HDL et la présence de particules LDL denses et petites [120]. Il a été proposé que la résistance périphérique à l'insuline soit la cause centrale du syndrome métabolique, bien que d'autres facteurs, dont l'obésité viscérale (androgénique) et l'âge, puissent en être principalement responsables. Du point de vue étiologique, il est généralement admis que les niveaux abaissés de cholestérol-HDL sont le résultat plutôt que la cause de cette anomalie métabolique. En établissant à 0.9 mmol/L la valeur critique du niveau plasmatique de cholestérol-HDL, selon les recommandations du *National Cholesterol Education Program* (NCEP 93) [19] ou les récentes recommandations canadiennes [121], près de la moitié des sujets présentant une maladie coronarienne ont un niveau abaissé de cholestérol-HDL [122]. Cependant, dans la plupart des cas, un bas niveau de cholestérol-HDL résulte d'une augmentation de la sécrétion hépatique de triglycérides et d'apoB, et non d'un défaut primaire [62].

1.3 Métabolisme des HDL

Une revue détaillée du métabolisme des lipoprotéines a été présentée dans le mémoire de maîtrise (M. Marcil) [18]. Rappelons sommairement que le système de transport des lipides a 3 principales fonctions (fig. 1.1): 1) il assure le transport rapide et efficace des triglycérides alimentaires aux sites d'entreposage (tissus adipeux) ou aux sites d'oxydation (muscles) et assure aux tissus périphériques un approvisionnement continu de triglycérides hépatiques pour un apport constant d'énergie; 2) il transporte le cholestérol permettant à la plupart des tissus d'avoir rapidement accès à des molécules de cholestérol nécessaires aux différentes fonctions métaboliques (synthèse de membranes, synthèse d'hormones stéroïdes, de vitamine D et d'acides biliaires); 3) il assure le courant de retour du cholestérol (voie des HDL) [123,124].

1.3.1 Production des HDL

L'apolipoprotéine A-I contribue approximativement à 70% de la masse protéique totale des HDL, tandis que l'apoA-II y représente environ 20%. L'apoA-I est synthétisée

dans le foie et l'intestin chez les mammifères et l'apoA-II a principalement une origine hépatique.

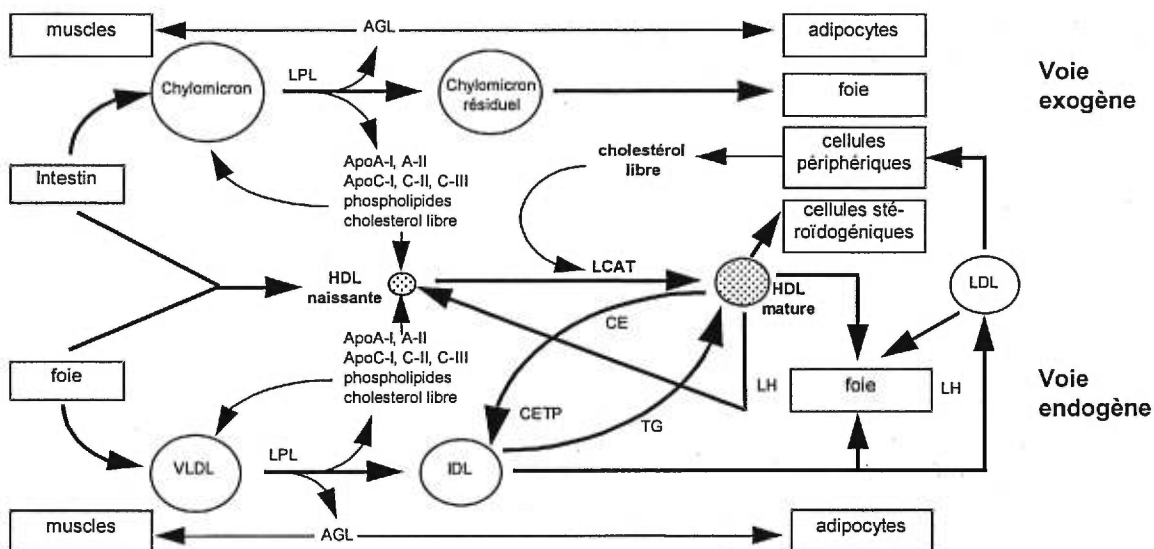


Figure 1.1. Métabolisme des lipoprotéines. Vue générale du métabolisme des lipoprotéines. La voie exogène (lipides d'origine diététique) est démontrée dans la partie supérieure du diagramme et la voie endogène (lipides d'origine hépatique) dans la partie inférieure. AGL, acides gras libres; LPL, lipoprotéine lipase; LCAT, lécithine-cholestérol-acyl transférase; LH, lipase hépatique; CE, cholestérol estérifié; TG, triglycérides; CETP, protéine de transfert du cholestérol estérifié. Adaptation de: Schaefer, E.J., Levy, R.I., Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *New Eng J Med* 1985; 312:1300-1310.

Les HDL circulant dans le plasma composent une population hétérogène de particules discoïdes et sphériques d'un diamètre variant de 70 à 100 Å avec une masse moléculaire de 200 à 400 kDa [123]. La taille des particules HDL, déterminée par électrophorèse sur gradient de gel, est principalement dépendante du contenu en cholestérol libre [125]. L'ultracentrifugation de densité différentielle distingue deux fractions majeures: les HDL₂ (1.063 - 1.125 g/mL) et les HDL₃ (1.125 - 1.210 g/mL) [126], où les HDL₂ de densité plus élevée contiennent plus d'esters de cholestérol que les HDL₃.

L'apoA-I est une protéine de 243 acides aminés de poids moléculaire de 28.3 kDa sécrétée par le foie et l'intestin. Au niveau cellulaire, l'apoA-I est d'abord synthétisée sous forme d'un prépropeptide comportant un peptide signal de 18 acides aminés. Le

clivage du peptide signal dans la cellule est nécessaire pour la sécrétion de l'apoA-I, sous forme de propeptide, dans le fluide interstitiel et le plasma, où un second clivage de 6 acides aminés formera un peptide mature. Le gène de l'apoA-I est localisé sur le chromosome 11q23 et retrouvé en tandem avec les gènes de l'apoC-III et de l'apoA-IV [123].

Des particules HDL contenant seulement l'apoA-I (désignées LpA-I) ou l'apoA-I et l'apoA-II (désignées LpA-I:A-II) ou l'apoA-I avec une protéine autre que l'apoA-II (désignées LpA-I-A-II) ont été identifiés. Ces particules se distinguent non seulement par leur composition mais également par leur métabolisme et leur habilité à capter du cholestérol libre. Ainsi, des niveaux abaissés de LpA-I ont été associés à un risque accru de maladie coronarienne dans une population normolipidémique [127], mais non dans une population de sujets présentant une maladie coronarienne précoce [128]. Une fraction mineure des particules HDL totales incorpore préférentiellement du cholestérol provenant de fibroblastes en culture. Ces particules de forme discoïdes, désignées pré- β -LpA-I, contiennent l'apoA-I et des phospholipides [129]. Il a été proposé que la présence de l'apoA-II à la surface des particules HDL interfère avec l'efflux de cholestérol cellulaire.

1.3.2 Voie de retour du cholestérol

Les principales fonctions des HDL sont le transport du cholestérol extrahépatique vers le foie et l'approvisionnement de cholestérol aux tissus responsables de la synthèse de produits stérol [124]. Cette dernière s'accomplit en plusieurs étapes: 1) formation de petites particules HDL pauvres en lipides et contenant principalement une seule molécule d'apoA-I; 2) transfert du cholestérol cellulaire de la membrane plasmique aux petites particules HDL formées de phospholipides et d'apoA-I; 3) estérification du cholestérol par la lécithine-cholestérol-acyl transférase (LCAT) utilisant l'apoA-I comme cofacteur; 4) transport du cholestérol au foie, soit directement ou soit par un transfert du cholestérol estérifié aux lipoprotéines contenant l'apoB (fig. 1.1). Cette étape est spécifiquement accomplie par la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP).

Le catabolisme des particules HDL apparaît particulièrement augmenté dans des conditions de déficiences en cholestérol-HDL dû en partie à la réduction de la taille des particules [130-137]. Sur la base d'études métaboliques, il a été établi que le temps

normal de résidence des particules HDL dans le plasma est de 4.1 à 6.6 jours et 3.0 à 4.5 jours pour l'apoA-I. Par contre, chez un sujet présentant la maladie de Tangier (une forme rare de déficience sévère en HDL), le temps de résidence plasmatique est trouvé réduit à 0.53 jours pour les HDL et 0.22 jours pour l'apoA-I. En utilisant les mêmes techniques, le temps de résidence de l'apoA-I a été estimé à 2.9 jours dans l'hyperlipidémie de type IV, 2.45 jours dans l'hyperlipidémie de type I et 2.51 jours dans l'hyperlipidémie de type V [135]. Des données similaires démontrant une clairance accélérée de l'apoA-I par marquage endogène sont aussi rapportées dans un cas d'hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère [131].

D'autres groupes ont précédemment démontré un catabolisme augmenté des HDL chez des sujets avec hypoalphalipoprotéinémie présentant des mutations géniques de l'apoA-I [132,134,137]. Afin de souligner l'importance de la taille des particules dans le catabolisme des HDL, Breslow et ses collaborateurs [136] ont mis en évidence une augmentation du taux de catabolisme fractionnel des HDL avec une diminution de la taille des particules, laquelle était corrélée avec une augmentation des niveaux plasmatiques de triglycérides.

1.3.3 HDL et efflux de cholestérol cellulaire

L'efflux de cholestérol cellulaire est accompli par une désorption passive du cholestérol de la membrane cellulaire à des complexes d'apoA-I/phospholipides suivant un gradient de concentration de cholestérol libre [138] et dépendant de la présence de particules acceptrices [139]. La forme, la composition et la conformation des particules HDL pourraient aussi influencer l'efflux de cholestérol [140]. Pour sa désorption passive, le cholestérol doit d'abord être acheminé des pools intracellulaires à la membrane plasmique par des processus actifs de signaux cellulaires et transport non entièrement résolu. La translocation du cholestérol intracellulaire à la membrane plasmique serait stimulée par des interactions entre l'apoA-I et des protéines membranaires spécifiques, à ce jour, non caractérisées.

Plusieurs études par *ligand-blotting* ont identifié des récepteurs putatifs à HDL de masse moléculaire variant de 58 à 120 kDa [262-270] et, dans la plupart des cellules humaines, de 100 à 120 kDa. Toutefois dû à leur hétérogénéité, la nature de ces sites de liaison demeure encore un sujet débattu. L'une de ces protéines membranaires

désignée *HDL-binding protein* (HBP) [141,142] a été reconnue récemment comme étant la vigiline, une protéine riche en valine-glycine-leucine qui lie l'ARN [144,145] et qui, dans certaines cellules dont les fibroblastes, apparaît en partie régulée par les niveaux de cholestérol intracellulaire [143,144].

Des études subséquentes ont suggéré qu'un récepteur à HDL puisse agir d'effecteur déclenchant la transduction de signaux qui stimule le transport intracellulaire du cholestérol vers la membrane plasmique [239]. Dans ce modèle, la liaison de la particule HDL à une protéine de la membrane cellulaire stimulerait l'activation et le déplacement vers la membrane plasmique d'une protéine kinase C (PKC), très probablement par la voie des phosphoinositols [146,147], impliquant possiblement les phospholipases C et D dépendantes de la phosphatidylcholine et l'interaction de molécules couplées à la protéine G [148,149]. Les fibroblastes humains étant les cellules les plus fréquemment utilisés pour l'étude du transport intracellulaire du cholestérol, il fut trouvé que les isomorphes de la PKC α , ϵ , et ζ sont spécifiquement présentes dans ces cellules alors que les formes β_1 , β_2 , γ et η y sont absentes ou très faiblement exprimées [148]. De plus, il a été observé dans les fibroblastes humains que la liaison des HDL₃ aux cellules stimule la phosphorylation de plusieurs protéines, notamment les protéines ERK-1 et ERK-2 appartenant à la famille des protéines kinases à activité mitogène (MAP kinases) [150], et d'autres protéines dont les rôles ne sont pas entièrement connus [147]. Le concept actuellement soutenu propose un mécanisme cellulaire dans lequel une protéine kinase C activée par une transduction de signaux stimulerait la translocation du cholestérol cellulaire de différents sites ou compartiments cellulaires à la membrane plasmique, d'où il devient disponible à l'efflux par désorption vers des accepteurs extracellulaires.

Dans les fibroblastes de sujets présentant la maladie de Tangier (une forme autosomique rare et sévère de déficience en HDL associée à un défaut d'efflux de cholestérol cellulaire) une altération marquée de la transduction de signaux a été observé par l'activité fortement diminuée d'une phospholipase C spécifique aux phosphatidylinositols normalement stimulée par la présence de HDL₃ [148]. D'autres études sur la maladie de Tangier ont mis en évidence un défaut cellulaire de régulation des phospholipases C et D spécifiques aux phosphatidylcholines en réponse à une stimulation des fibroblastes par des HDL₃ et de l'apoA-I [149]. Une réponse

similairement altérée était recréée dans des fibroblastes de sujets normaux par un prétraitement des cellules avec la toxine de pertussis, qui affecte l'activité de la protéine G, suggérant son implication dans la maladie de Tangier [149]. Par ailleurs, la stimulation de la protéine kinase C par un agent pharmacologique conduisait à normaliser l'efflux de cholestérol dans les cellules de Tangier [164]. Ces données supportent donc l'hypothèse que le mécanisme de translocation cellulaire du cholestérol implique principalement une voie de transduction de signaux comportant la régulation de phospholipases spécifiques aux phosphatidylinositols et phosphatidylcholines dépendantes de la protéine G et l'activation d'une protéine kinase C. Le défaut moléculaire de la maladie de Tangier pourrait ainsi résider au niveau d'un effecteur en amont de la protéine kinase C.

Le contenu en cholestérol cellulaire est régulé par 4 voies principales: a) la synthèse endogène du cholestérol dans le réticulum endoplasmique lisse, impliquant l'enzyme HMG-CoA réductase; b) l'endocytose de particules LDL par la voie d'un récepteur et dégradation lysosomiale des particules; c) l'estérification intracellulaire du cholestérol par l'enzyme acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase (ACAT); d) l'efflux du cholestérol de la membrane plasmique à des particules acceptrices (principalement des particules HDL) [151] (fig. 1.2). Les deux premières voies sont régulées de façon coordonnée au niveau de la transcription de gènes [152]. Les cellules acquièrent du cholestérol de deux sources principales: la synthèse *de novo* impliquant la voie de la HMG-CoA réductase ou, préférablement, par l'endocytose de particules LDL. La première source réfère à la voie endogène et la seconde, à la voie lysosomiale.

Étonnamment, le transport intracellulaire du cholestérol et son déplacement de différents sites ou compartiments cellulaires à la membrane plasmique sont très peu connus [153-157]. Il a été démontré que l'intégrité de structures cellulaires dont l'appareil de Golgi et le cytosquelette est une condition essentielle au transport du cholestérol du cytosol à la membrane plasmique [158]. En plus du cholestérol, des produits intermédiaires de sa synthèse, tel le desmostérol, seraient également déplacés à la membrane plasmique [159]. Le cholestérol apparaît sélectivement transporté du réticulum endoplasmique ou du Golgi vers des structures membranaires discrètes nommées *caveolæ*. Ces structures forment de petites invaginations de la membrane et

renferment une variété de protéines dont la cavéoline, qui favoriserait par une action d'ancrage le transport de molécules du cytosol aux *caveolæ* [162]. Il y a évidence que le cholestérol soit rapidement transporté aux *caveolæ* avant d'être relargué dans la membrane plasmique [161].

Walter [163], Rogler [164], Francis [165] et leurs collaborateurs ont indépendamment observé un défaut d'efflux de cholestérol intracellulaire dans les fibroblastes de sujets présentant la maladie de Tangier. Dans l'étude de Rogler, où une différence nette d'efflux de cholestérol endogène radiomarqué (à partir de ^3H -mévalonolactone) est démontré entre les cellules de Tangier et des cellules contrôles, le défaut était réversible par une activation sélective de la PKC en présence de 1,2-dioctanoylglycérol. Ces données suggèrent fortement l'implication de la voie de la PKC dans les mécanismes du transport intracellulaire du cholestérol dont les anomalies font ressortir une nouvelle classe de désordres des lipoprotéines.

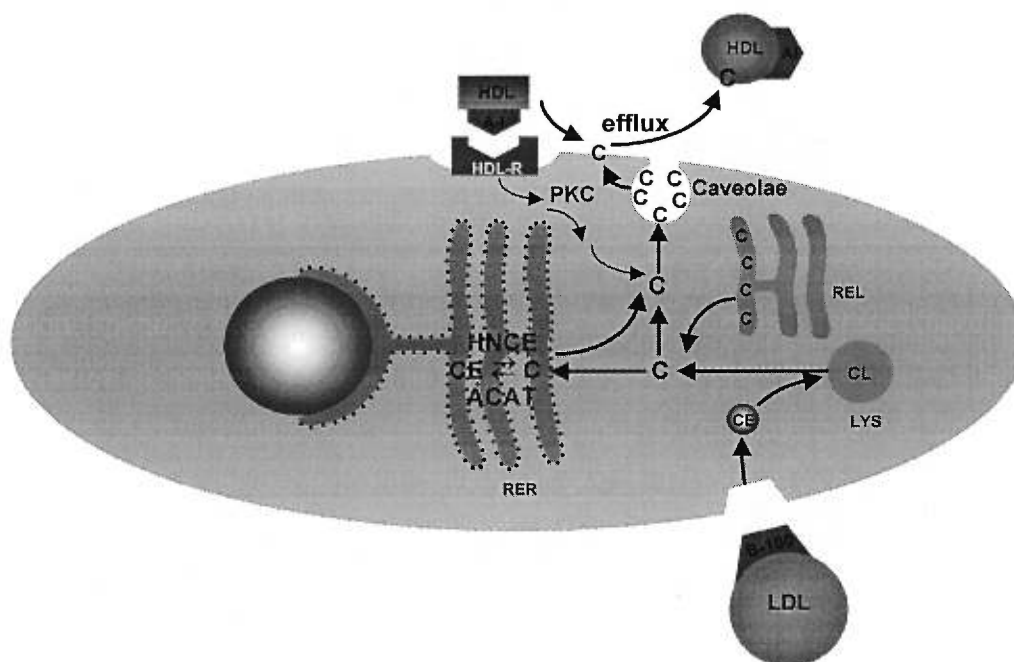


Figure 1.2. Homéostasie du cholestérol cellulaire. L'homéostasie du cholestérol cellulaire est régulée par: a) la synthèse endogène du cholestérol dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) par l'enzyme HMG CoA réductase; b) l'endocytose par voie d'un récepteur et dégradation lysosomiale de particules LDL contenant du cholestérol estérifié (CE); c) l'estérification intracellulaire du cholestérol par l'enzyme ACAT; d) l'efflux du cholestérol de la membrane plasmique à des particules acceptrices (principalement des particules HDL). B-100, apoB; A-I, apoA-I; CL, cholestérol libre; C, cholestérol; HNCE, hydrolase neutre d'esters de cholestérol; PKC, protéine kinase C; HDL-R, récepteur HDL putatif; RER, réticulum endoplasmique rugueux; LYS, lysosome.

1.4 Autres fonctions des particules HDL

La caractérisation des protéines retrouvée dans la fraction des lipoprotéines HDL a permis l'identification de plusieurs apolipoprotéines, notamment l'apoA-I, l'apoA-II, l'apoA-IV, l'apoC-I, l'apoC-II, l'apoC-III et l'apoE [91,122]. Les particules HDL sont également responsables du transport de l'apo $J_{\alpha+\beta}$ (clusterine) [96,97], de la paraoxonase [98] et de l'haptoglobine [101,102]. Elles ont été trouvées associées à plusieurs lignées cellulaires *in vitro* et responsables d'une variété de réponses autres que le transport intracellulaire du cholestérol.

1.4.1 Prévention de l'oxydation des lipoprotéines

En présence de HDL, les particules LDL se trouvent protégées contre l'oxydation par des mécanismes variés [166,167]. En plus de diverses molécules naturellement antioxydantes, les particules HDL transportent aussi des enzymes, dont l'hydrolase du facteur d'activation plaquettaire et la paraoxonase, dotées de propriétés antioxydantes [166]. Les effets protecteurs des HDL relèveraient principalement de la sous-fraction des HDL₃ et contribueraient également à l'inhibition de l'activité des particules LDL minimalement oxydées [169].

1.4.2 Apport cellulaire de cholestérol

Les particules HDL fournissent des molécules de cholestérol aux cellules surrénaliennes, aux cellules des tissus stéroïdogéniques non placentaires et au foie par la voie d'un récepteur *scavenger* de classe B, type I (SR-BI). Ce récepteur, membre de la superfamille de protéines CD-36 [211], lie les HDL et provoque le transfert sélectif d'esters de cholestérol des HDL aux cellules [100,210] sans l'incorporation complète de la lipoprotéine [170]. Différemment du processus d'internalisation des particules LDL par la voie de récepteur, ce mécanisme est indépendant des puits tapissés de clathrine de la membrane plasmique et n'implique pas la formation d'endosomes.

1.4.3 Captation d'endotoxines lipopolysaccharidiques bactériennes

Dû à leur haute affinité pour les phospholipides et autres composants des membranes plasmiques, les HDL adsorbent aisément les lipopolysaccharides (endotoxines) libérés au cours de la destruction des bactéries [95]. Dans des modèles animaux, un effet protecteur des HDL contre les chocs endotoxiques était observé. Une protection contre des dommages vasculaires provoqués par des lipopolysaccharides serait dépendante d'une protéine spécifique, la *lipopolysaccharide binding protein* (LPB) associée à la fraction HDL [171].

1.4.4 Protection contre l'infection du *Trypanosoma brucei brucei* chez l'humain

Contrairement à la maladie parasitaire *ngana* du bétail, les infections par le trypanosome *T. brucei brucei* n'affecte pas l'humain. Cette protection est due à deux agents identifiés chez l'humain: les facteurs trypanolytiques 1 et 2 (TLF1 et TLF2). Le facteur TLF1 a été apparenté à une haptoglobine et trouvé associé à la fraction HDL [101,102, 172]. Raper et ses collaborateurs [173] ont démontré que le facteur TLF1 compétitionnait l'haptoglobine mais le facteur TLF2 semblait indépendant des HDL et de l'haptoglobine.

1.4.5 Modulateur de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires des cellules endothéliales

Dans une série d'expériences, Cockerill et ses collaborateurs [103] ont examiné la production et les niveaux d'ARNm des molécules d'adhésion cellulaires ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et E-sélectine dans les cellules endothéliales stimulées par des cytokines, dont l'interleukine 1 (IL-1) et le TNF (*tumor necrosis factor*). Ils ont trouvé que la présence de particules HDL abaissait les niveaux d'ARNm et d'expression de ces protéines dans les cellules. Les HDL pourraient ainsi contribuer à moduler les premiers changements observés dans les cellules endothéliales au cours d'un traumatisme inflammatoire.

1.4.6 Prévention de l'agrégation plaquettaire

Lorsque incubées en présence de HDL, les plaquettes ont une tendance moindre à s'agréger *in vitro* [104]. Cependant, les phénomènes par lesquels les HDL modulent l'agrégation plaquettaire sont complexes et non entièrement résolus. Ces effets pourraient en partie être attribuable à la formation de lysophosphatidylcholine provenant de l'action de la phospholipase A2 sur la phosphatidylcholine [174] et d'une activité diminuée de la lipoxygénase des plaquettes [175]. De plus, il est trouvé que l'activité de la cyclo-oxygénase-2 dans les cellules musculaires lisses est modulée par les HDL au niveau transcriptionnel [104]. Cette sur-régulation du gène Cox-2 contribuerait à accroître les niveaux de prostaglandine I₂ dans les cellules musculaires lisses et ainsi diminuer l'agrégation plaquettaire.

1.5 Aspect génétique des HDL

La plupart des désordres du métabolisme des HDL rencontrés en pratique clinique sont intimement associés au métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. Dans plusieurs cas, un niveau abaissé de cholestérol-HDL est secondaire à une augmentation des triglycérides plasmatiques, à une augmentation des niveaux d'apolipoprotéine B ou les deux à la fois. Dans une étude de 102 familles de sujets avec maladie coronarienne précoce, 4% des sujets présentaient une forme d'hypoalphalipoprotéinémie familiale isolée (niveau abaissé de cholestérol-HDL sans autres anomalies lipidiques), 14% avaient une hypertriglycéridémie familiale avec des niveaux abaissés de cholestérol-HDL et 11% présentaient une hyperlipoprotéinémie familiale combinée [52]. Toutes ces formes de dyslipoprotéinémies familiales étaient associées à un niveau de cholestérol-HDL inférieur au 10^e percentile de la population selon l'âge et le genre. Lorsque les niveaux d'apoB plasmatiques étaient examinés, tous les sujets, incluant ceux présentant une forme isolée de cholestérol-HDL abaissé, présentaient un niveau élevé d'apoB, suggérant que les bas niveaux de cholestérol-HDL étaient secondaires à une augmentation d'apoB et ne représentaient donc pas un défaut primaire [62].

Un bas niveau de cholestérol-HDL est également rencontré dans la dyslipidémie familiale hypertensive. Ce désordre est manifesté par une pression sanguine élevée et

la présence d'une dyslipidémie typique caractérisée par une hypertriglycéridémie, un niveau abaissé de cholestérol-HDL [63,176] et un phénotype de lipoprotéines athérogènes (ALP), où une élévation des triglycérides plasmatiques est trouvée associée à la présence de particules LDL petites et denses, une résistance à l'insuline et une obésité abdominale [120,176]. Le tableau 3 résume les désordres familiaux des lipoprotéines associés à un niveau abaissé de cholestérol-HDL rencontrés dans la population et leur susceptibilité à favoriser le développement de la maladie coronarienne. Il est à noter que plusieurs de ces désordres présentent un chevauchement dans l'expression de leurs phénotypes.

Tableau III. Dyslipidémies génétiques associées à un bas niveau de HDL

Dyslipidémie	Désordre biochimique	Susceptibilité à la maladie coronarienne
Hyperlipémie familiale combinée	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ nombre de particules VLDL et LDL • ↑ apoB 	augmentée
Hypertriglycéridémie familiale avec niveau abaissé de HDL	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ triglycérides • ↓ HDL 	augmentée
Hypoalphalipoprotéïnémie familiale	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ HDL 	probablement non augmentée
Dyslipidémie familiale hypertensive	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ triglycérides • ↓ HDL • ↑ pression sanguine 	augmentée
Phénotype de lipoprotéines athérogènes	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ VLDL et triglycérides • ↓ HDL • particules LDL petites et denses 	augmentée
Hyperchylomicronémie familiale†	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ chylomicrons 	non augmentée ou légèrement augmentée
Dysbêtalipoprotéïnémie familiale ‡	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ β-VLDL 	augmentée

† Due à une déficience de la lipoprotéine lipase ou une déficience de l'apoC-II.

‡ Associée à un phénotype E2/2 de l'apo E.

Dans des études familiales et de population, des analyses statistiques de ségrégation et linkage suggèrent que les niveaux de cholestérol-HDL soient en partie génétiquement déterminés et associés aux locus géniques de l'apoA-I-C-III-A-IV, de la lipoprotéine lipase, de l'apoB et de la lipase hépatique [177]. Récemment, les

polymorphismes géniques de ces locus et d'autres ont été examinés dans des populations génétiquement isolées. Il a été trouvé que ces polymorphismes ne contribuent en fait que pour une très faible fraction de la variabilité totale des niveaux plasmatiques de HDL et d'apoA-I dans ces populations [178]. D'autres études familiales ont révélé de forts déterminants génétiques pour les niveaux de cholestérol-HDL dans des populations de l'Utah [179]. Par ailleurs, l'étude *Bogalusa Heart* observait de multiples polymorphismes de gènes, notamment sur les gènes de l'apoB, de la CETP et de la lipoprotéine lipase, statistiquement associés aux niveaux de cholestérol-HDL [180].

1.5.1 Désordres génétiques des HDL

L'ensemble des causes d'une hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère a fait l'objet d'une revue récente [181]. Actuellement, ces causes incluent de rares cas de maladie de Tangier [191,192], divers réarrangements ou mutations non sens du gène de l'apoA-I [83,123,181-188], des altérations du métabolisme des HDL dues à une déficience de l'enzyme LCAT [189,190] ou des états sévères d'hypertriglycéridémie de causes multiples, dont une déficience de la lipoprotéine lipase [99,193] ou de son activateur, l'apoC-II [90]. Le tableau 4 résume les différentes causes génétiques connues jusqu'à maintenant associées à une déficience sévères en HDL. À l'opposé des cas de déficience en HDL, des niveaux anormalement élevés de cholestérol-HDL sont également rencontrés. Ces anomalies impliquent soit une déficience en lipase hépatique, soit une déficience en CETP due à des mutations géniques de ces protéines [72,73]. Malgré une élévation du cholestérol-HDL, la déficience en lipase hépatique entraîne une augmentation du risque de maladie coronarienne précoce. Par contre, la déficience en CETP entraîne une diminution de l'apoB et du cholestérol-LDL, conférant, quoique controversée, une protection contre la maladie coronarienne associée à une longévité [28].

Les mutations de la CETP sont fréquemment rencontrées dans la population japonaise et sont une cause commune de niveaux augmentés de HDL [194]. Des études génétiques plus récentes basées sur des populations japonaises rapportent des données contradictoires sur les effets protecteurs d'une déficience en CETP, démontrant qu'une hyperalphalipoprotéinémie causée par des mutations du gène de la

CETP n'est pas associée à un syndrome de longévité [300]. Il est également démontré une augmentation significative du risque de maladie coronarienne chez des hommes de descendance japonaise porteurs de la mutation Asp⁴⁴²→Gly du gène de la CETP qui présentent des valeurs de cholestérol-HDL entre 1.06 et 1.55 mmol/L [301]. D'autres études ont suggéré un métabolisme retardé des particules HDL pré β -1 associé à la déficience en CETP [302] et des niveaux sériques significativement augmentés de LDL oxydées par le malondialdéhyde chez des patients avec déficience complète en CETP [303].

1.5.2 Mutations du gène de l'apoA-I

De rares défauts génétiques sur le locus du gène de l'apoA-I entraînent de sévères diminutions des niveaux de cholestérol-HDL et d'apoA-I. Au moins 11 mutations différentes du gène de l'apoA-I causant une déficience en HDL et apoA-I sont rapportées [96, revu dans 181] (présentation au Tableau 4). Selon l'altération de la protéine qui en résulte, les défauts génétiques de l'apoA-I ont été séparés en 3 classes. Les défauts de classe I abolissent la synthèse de la protéine et sont associés à une xanthomatose, à des opacifications cornéennes et à un risque élevé de maladie coronarienne; les défauts de classe II conduisent à une forme tronquée de la protéine et expriment un tableau clinique variable quant au risque d'athérosclérose coronarienne; les défauts de classe III produisent une forme altérée de l'apoA-I sans évidence d'une forte association avec la maladie coronarienne. Aux côtés de ces défauts génétiques, plusieurs mutations ponctuelle du gène de l'apoA-I ont également été rapportées [195]. Ces mutations, plus souvent de classe III, entraînent une réduction marquée des niveaux de cholestérol-HDL et d'apoA-I et pourraient affecter le transport intracellulaire du cholestérol.

Des mutations du gène de l'apoA-I peuvent aussi conduire à une amyloïdose systémique. Dans l'une des premières familles rapportées démontrant une amyloïdose systémique due à des mutations du gène de l'apoA-I, un polymorphisme insertion/délétion était identifié sur le gène de l'apoA-I avec perte des codons 60-71 et l'insertion de résidus Val et Thr [196]. Les fibres amyloïdes ont été identifiées comme étant des résidus N-terminaux d'apoA-I. Par la suite, parmi d'autres mutations du gène de l'apoA-I identifiées, la mutation Leu⁶⁰→Arg [196] trouvée dans une famille

canadienne et la mutation Gly²⁶ → Arg [197] révélèrent que l'ajout d'une charge positive au groupement amino de la portion d'apoA-I était une condition essentielle à la formation de fibres d'amyloïdes.

L'apoA-I_{Milano} (Arg¹⁷³ → Cys) a été identifiée dans une très large famille d'Italie et associée à une augmentation du taux de catabolisme fractionnel des HDL mais sans risque augmenté de maladie coronarienne précoce. L'apoA-I_{Milano} semble au contraire conférer aux porteurs une longévité. Dans cette mutation, la présence d'un résidu Cys au codon 173 permet la formation d'un lien dimérique disulfure avec une autre molécule d'apoA-I ou une molécule d'apoA-II. Un phénomène similaire est observé dans l'apoA-I_{Paris} (Arg¹⁵¹ → Cys) où un résidu Arg est aussi remplacé par un résidu Cys au codon 151 [212]. Dans une autre variante de l'apoA-I, l'apoA-I_{Pisa} (Leu¹⁴¹ → Arg) a été associée à des opacifications cornéennes et à la maladie coronarienne chez les porteurs homozygotes.

Les variantes de l'apoA-I ont été identifiées par l'analyse de sang séché provenant de 32 000 nouveau-nés. Par l'utilisation des techniques de chromatographie liquide à haute pression, de spectroscopie de masse *time-of-flight secondary ion* (TOF-SIMS) et séquenceur en phase gazeuse automatisé, l'apoA-I Pro¹⁶⁵ → Arg, Pro³ → Arg et Pro⁴ → Arg ont été identifiées. La forme Pro⁴ → Arg a été associée à des niveaux significativement abaissés de cholestérol-HDL dans la famille affectée [199].

1.5.3 Déficience en lécithine-cholestérol-acyl transférase

La lécithine-cholestérol-acyl transférase catabolise la réaction d'estérification du cholestérol à partir des deux chaînes d'acides gras de la phosphatidylcholine. La particule HDL portant l'apoA-I représente le substrat préférentiel de la LCAT où l'apoA-I agit d'activateur. Il existe deux manifestations cliniques importantes d'une déficience de la LCAT: la maladie *fish eye* et la déficience familiale en LCAT. L'expression marquante de la maladie *fish eye* est une opacification cornéenne sévère et l'incapacité de la LCAT à estérifier du cholestérol associé aux particules HDL. Toutefois, une capacité à former des esters de cholestérol à partir du cholestérol-LDL non estérifié est maintenue dû à des formes mutantes de l'enzyme. Ainsi, le ratio plasmatique cholestérol non

estérifié/cholestérol estérifié est maintenu près de la normale. La déficience familiale en LCAT est caractérisée par une inhabilité complète d'estérification du cholestérol avec

Tableau IV. Anomalies génétiques associées à une déficience en HDL

Défaut génétique de l'apoA-I	xanthomes	opacification cornéenne	maladie coronarienne	âge - sexe - pays
apoA-I-C-III _{inversion}	oui	oui	oui	31 - F - É.-U.
apoA-I-C-III-A-IV _{délétion}	non	oui	oui	45 - F - É.-U.
apoA-I _{délétion146-160}	non	oui	non	34 - M - nord Europe
apoA-I _{202délétionG,230stop}	non	oui	non	42 - M - Allemagne
apoA-I _{84stop}	oui	non	oui	60 - F - Japon
apoA-I _{5insertionC,33stop}	oui	oui	non	7 - F - Turquie
apoA-I _{2stop}	oui	non	oui	34 - F - Canada
apoA-I _{32stop}	non	non	non	31 - F - Italie
apoA-I _{8stop}	non	oui	non	39 - M - Japon
apoA-I _{208stop}	oui	oui	?	F - Japon
apoA-I _{11stop}	non	oui	oui	Italie
Mutations ponctuelles de l'apoA-I				
ApoA-I _{Pisa}	Leu ¹⁴¹ → Arg			
ApoA-I _{Fin}	Leu ¹⁵⁹ → Arg			
ApoA-I _{Paris}	Arg ¹⁵¹ → Cys			
ApoA-I _{Karatsu}	Tyr ¹⁰⁰ → His			
ApoA-I _{Kirune}	His ¹⁶² → Gln			
ApoA-I _{Milano}	Arg ¹⁷³ → Cys			
ApoA-I variantes	Pro ¹⁶⁵ → Arg; Pro ³ → Arg; Pro ⁴ → Arg			
Mutations dans les enzymes affectant le métabolisme extracellulaire des HDL				
déficience de la LCAT				
déficiences de la LPL/apoC-II				
Défaut génétique affectant l'efflux du cholestérol cellulaire				
maladie de Tangier				

une élévation marquée du ratio plasmatique cholestérol non estérifié/cholestérol estérifié. Les particules HDL ont une composition anormale et les sujets présentent aussi une opacification cornéenne avec en plus une anémie et une insuffisance rénale. Les relations entre les déficiences de la LCAT et la maladie coronarienne ne sont pas encore clairement établies [84,85,189,190, 195].

1.5.4 Déficience de la lipoprotéine lipase et de l'apoC-II

Les mutations de la lipoprotéine lipase (LPL) entraînent un état sévère d'hypertriglycéridémie associé à un bas niveau de cholestérol-HDL chez les sujets homozygotes ou hétérozygotes combinés. Ces mutations sont la base génétique du syndrome familial d'hyperchylomicronémie [99,193]. Les mutations de l'apoC-II, activateur de la LPL, sont décrites comme étant une cause rare de l'absence d'activité de la LPL dans le plasma des sujets affectés [90]. L'hypertriglycéridémie massive qui en résulte occasionne une forme secondaire de déficience en HDL, en partie causée par une disponibilité réduite d'apolipoprotéines, de cholestérol libre et de phospholipides, principaux composants des HDL, libérés dans le plasma au cours du processus lipolytique des chylomicrons et VLDL sous l'action de la LPL.

1.5.5 Maladie de Tangier

La maladie de Tangier est une affection rare (52 cas actuellement rapportés dans le monde) transmise selon un mode autosomique récessif, caractérisée par une absence ou une déficience sévère des particules HDL plasmatiques et une accumulation d'esters de cholestérol dans plusieurs tissus, dont le foie, la muqueuse intestinale, les nerfs périphériques, la moelle osseuse, la peau, la cornée et les tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques, amygdales, thymus, omentum). Les triglycérides sont normaux ou élevés, le cholestérol abaissé et les niveaux d'apoA-I extrêmement réduits. Au plan clinique, la maladie est révélée par un très faible niveau de cholestérol-HDL et d'apoA-I plasmatique parfois accompagnée d'une hypertriglycéridémie légère ou modérée; la présence d'amygdales et tissus adénoïdes hyperplasiques de couleur jaune-orangée vient confirmer le diagnostic. Parmi d'autres manifestations cliniques majeures, une splénomégalie et une neuropathie périphérique récurrente sont également observées. Toutefois, malgré la déficience en HDL, le risque de maladie coronarienne apparaît faiblement augmenté chez les cas rapportés. Les symptômes de la maladie proviennent de dépôts d'esters de cholestérol dans plusieurs tissus appartenant surtout au système réticulo-endothélial bien que d'autres cellules dont les fibroblastes de la cornée, les mélanocytes, les cellules de Schwann, les neurones et les cellules musculaires lisses non vasculaires soient aussi touchées [191,192]. Les

particules HDL retrouvées en très faible quantité dans le plasma de ces patients, se différencient des HDL de sujets normaux par leur diamètre hétérogène et leur contenu en apolipoprotéine [192]. Une sous-classe des HDL ne contient que l'apoA-II sans apoA-I, l'apoA-I étant retrouvée dans les particules de migration électrophorétique pré- β . L'analyse des protéines HDL par isofocalisation électrique révèle chez les Tangier homozygotes une concentration plasmatique relativement augmentée de la proapoA-I par rapport à l'apoA-I mature [213-214]. Cette caractéristique biochimique est considérée comme l'un des signes pathognomoniques de la maladie. Toutefois, des études *in vitro* ont démontré un taux normal de conversion de la proapoA-I en apoA-I mature chez les Tangier éliminant ainsi des défauts de structure du propeptide de l'apoA-I ou de l'activité de l'enzyme proapoA-I propeptidase comme cause de la maladie [215]. Pour déterminer si cette déficience en HDL provenait d'une synthèse diminuée ou d'un catabolisme augmenté des apolipoprotéines-HDL, plusieurs études d'analyse cinétique de HDL, d'apoA-I, de proapoA-I et d'apoA-II radiomarquées *in vivo* ont été effectuées chez des sujets avec la maladie de Tangier. Les données de ces études ont toutes révélé une augmentation marquée du catabolisme de l'apoA-I, de l'apoA-II et des particules HDL chez les Tangier homozygotes de même que chez les hétérozygotes [216]. Ces analyses ont permis d'établir initialement que le défaut métabolique de la maladie de Tangier est associé à un catabolisme accéléré des particules HDL et de l'apoA-I et non à un défaut de biosynthèse des apolipoprotéines-HDL. Les Tangier hétérozygotes présentent des niveaux de cholestérol-HDL, d'apoA-I et d'apoA-II réduits à la moitié des niveaux normaux. Cependant, la structure et la composition des HDL ne paraissent pas altérées et les sujets ne présentent aucune manifestation clinique [192]. Bien que les défauts biochimique et moléculaire de la maladie de Tangier demeurent encore inconnus, l'attention portée à l'homéostasie du cholestérol cellulaire chez ces sujets a permis de mettre en évidence un défaut du transport intracellulaire du cholestérol et de l'efflux du cholestérol cellulaire provoqués par les HDL ou l'apoA-I [163-165, 200].

1.5.6 Déficience familiale en HDL

La caractérisation clinique, biochimique et moléculaire d'une forme sévère d'hypoalphalipoprotéïnémie pure a fait naître une nouvelle classe de désordre des

lipoprotéines dont l'étiologie demeure encore inconnue [78,134,201,204]. Les sujets affectés présentent de très bas niveaux de cholestérol-HDL plasmatique, inférieurs au 5^e percentile de la population selon l'âge et le sexe, un niveau d'apoA-I de 20 à 50% de la normale, une augmentation relative de le proapoA-I plasmatique et l'absence des signes cliniques de la maladie de Tangier. Ces patients ne présentent pas de diabète, ni d'hypertriglycéridémie sévère et le désordre n'est expliqué par aucune cause connue d'hypoalphalipoprotéinémie sévère (défauts génétiques de l'apoA-I, déficience en LCAT ou lipoprotéine lipase). L'anomalie est d'expression familiale et apparaît transmise selon un mode autosomique dominant ou co-dominant de type mendélien. Dû à l'expression particulière de cette forme sévère d'hypoalphalipoprotéinémie familiale de cause inconnue, le désordre fut spécifiquement désigné "déficience familiale en HDL" (FHD) [201]. Des études métaboliques sur la cinétique *in vivo* des apolipoprotéines-HDL radiomarquées au [D,D,D]-leucine ont démontré chez les sujets affectés un hypercatabolisme marqué de l'apoA-I et des particules HDL [202] tel que rencontré dans plusieurs cas d'hypoalphalipoprotéinémie [130-137]. Bien que quelques cas de cette déficience familiale en HDL aient été décrits [78,134,204], l'homéostasie du cholestérol cellulaire et les mécanismes de transport et d'efflux du cholestérol cellulaire n'ont pas été examinés chez ces sujets.

1.6 Conclusion

Les lipoprotéines de haute densité représentent un groupe de petites particules lipoprotéiniques de taille hétérogène qui diffèrent par leur composition en lipides et protéines. Leurs fonctions chez l'humain sont multiples et bénéfiques assurant entre autres une protection contre le développement de l'athérosclérose (par la voie du transport de retour du cholestérol, la modulation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires et des propriétés antioxydantes), une protection contre les infections du trypanosome *T. brucei brucei* et des chocs endotoxiques et fournissant des molécules de cholestérol au foie pour la synthèse d'acides biliaires ainsi qu'aux tissus stéroïdogéniques non placentaires pour la synthèse d'hormones. Au niveau cellulaire, les HDL agissent par des interactions protéines-protéines déclenchant la phosphorylation de protéines cellulaires impliquées dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes. Toutefois, les mécanismes d'action de ces voies sont encore mal

connus. Des déficiences en HDL sont souvent associées à des états pathologiques chez l'humain mais n'entraînent pas nécessairement une accumulation de cholestérol cellulaire dû à un système de régulation hautement efficace du cholestérol cellulaire normalement présent dans les cellules [152]. De plus, des mécanismes alternatifs d'efflux de cholestérol cellulaire impliquant des particules transportant l'apoE et migrant en position γ à l'électrophorèse sur gel d'agarose, ont été identifiés récemment et pourrait potentiellement suppléer un système déficient des HDL (système d'efflux du cholestérol par les particules γ -LpE) [206-208]. Le plus souvent une diminution des niveaux de cholestérol-HDL ne représente pas un défaut primaire mais reflète plutôt un dérangement du métabolisme des lipoprotéines associé à une constellation de troubles métaboliques dont l'obésité abdominale, une résistance à l'insuline et une hypersécrétion hépatique de triglycérides et/ou d'apoB. Des déficiences sévères en HDL indiquent habituellement des causes génétiques qui peuvent entraîner des désordres systémiques considérables telle l'amyloïdose, des neuropathies et la maladie coronarienne. Devant l'importante contribution des formes d'hypoalphalipoprotéïnémie dans les états morbides chez l'humain, des thérapies d'interventions pharmacologiques ou géniques visant à augmenter les niveaux de cholestérol-HDL et d'apoA-I devraient être envisagées.

Deuxième partie: contribution originale

Chapitre 2: Énoncé du projet

2.1 Introduction

Un niveau abaissé de cholestérol-HDL (< 0.9 mmol/L, selon les recommandations du *National Cholesterol Education Program* [19]) est retrouvé chez près de la moitié des sujets présentant une maladie coronarienne précoce et constitue un facteur de risque hautement discriminant entre des sujets normaux et coronariens [42,76]. Dans la plupart des cas un bas niveau de cholestérol-HDL reflète une hypersécrétion hépatique d'apoB et de triglycérides ou des altérations du métabolisme des particules riches en triglycérides, souvent associés à d'autres troubles métaboliques et au développement de la maladie coronarienne, et ne représente pas un défaut primaire [55]. L'hyperlipoprotéinémie familiale combinée, vraisemblablement attribuable à une surproduction et une hypersécrétion hépatique d'apoB [75], est le désordre génétique des lipoprotéines le plus fréquemment rencontré dans la maladie coronarienne précoce, impliquant dans la plupart des cas un abaissement des niveaux de cholestérol-HDL [29,62]. Les causes génétiques de cette forme commune d'hypoalphalipoprotéinémie secondaire demeurent actuellement inconnues bien que plusieurs investigations aient démontré que la pathogenèse de cette dyslipidémie serait génétiquement hétérogène [217]. Une autre forme génétique d'hypoalphalipoprotéinémie, sans autres altérations sévères des lipoprotéines, est retrouvée dans la maladie coronarienne précoce. Cette forme dite "pure" est peu fréquente et associée à de rares défauts génétiques du complexe génique apoA-I-C-III-A-IV, à la maladie Tangier ainsi qu'à d'autres désordres inhabituels du métabolisme des HDL provoquant des niveaux extrêmement abaissés de cholestérol-HDL [52].

2.2 Hyperlipoprotéinémie familiale combinée

L'hyperlipoprotéinémie familiale combinée a été décrite en 1973 par Goldstein et ses collaborateurs [218] comme une dyslipidémie génétique distincte causant une expression variable d'hypercholestérolémie et/ou d'hypertriglycéridémie chez des sujets

de même famille. Cette forme génétique d'hyperlipidémie est la plus commune chez les survivants d'infarctus du myocarde de moins de 60 ans avec une prévalence estimée à environ 10% [56]. En considérant une élévation plasmatique des VLDL ou LDL ou des deux à la fois comme trait phénotypique dans les familles affectées, le défaut apparaît autosomique dominant avec un haut degré de pénétrance [218,219]. Depuis l'établissement du dosage des HDL et des apolipoprotéines, il est généralement admis aujourd'hui que l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée est également associée à des niveaux abaissés de cholestérol-HDL et des niveaux élevés d'apoB. Le défaut métabolique des lipoprotéines entraînerait dans ce désordre une hyperproduction hépatique d'apoB conduisant à une augmentation des niveaux plasmatiques de VLDL et de LDL [221,222]. Des particules LDL denses et petites y sont également fréquemment retrouvées [223,224]. Les données actuelles suggèrent qu'une régulation déficiente du métabolisme de l'apoB contribuerait pour une part importante au développement de l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée.

Les causes génétiques du défaut demeurent encore inconnues. Des facteurs génétiques influençant les niveaux plasmatiques d'apoB, de cholestérol et de triglycérides ont été examinés par l'approche de gènes candidats. Malgré une élévation constante des niveaux d'apoB, aucune association n'a pu être établie entre des marqueurs du gène de l'apoB et la dyslipidémie [220]. Par ailleurs, une activité diminuée de la lipoprotéine lipase impliquée dans le catabolisme des particules riches en triglycérides a été retrouvée chez environ 30% des individus affectés, suggérant que des mutations hétérozygotes du gène de la lipoprotéine lipase puissent aussi contribuer au phénotype lipidique [225-227]. Ces mutations ne seraient toutefois impliquées que dans une fraction limitée des cas d'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée et ne constitueraient pas une cause majeure [228]. D'autres investigations génétiques ont porté sur le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV localisé sur le chromosome 11q23-24. Hayden et ses collaborateurs [229] ont observé dans des familles une association entre le fragment de restriction polymorphique (RFLP) XmnI sur ce locus et la présence du phénotype dyslipidémique. Cette association était également rapportée par Wojciechowski et ses collaborateurs [69] qui démontraient un linkage déséquilibré entre la présence de la dyslipidémie et l'allèle portant le RFLP XmnI au locus apoA-I-C-III-A-IV. Ces données n'ont cependant pu être confirmées dans une autre étude [234]. Plusieurs associations entre des polymorphismes du complexe génique apoA-I-C-III-

A-IV et des paramètres du métabolisme des lipides ont été rapportées chez des patients et dans la population générale [229-233]. Dans une étude de 18 familles avec hyperlipoprotéinémie familiale combinée bien caractérisée, trois enzymes de restriction polymorphiques (Xmnl, MspI et SstI) ont été examinées au locus apoA-I-C-III-A-IV [235]. Les données de cette étude suggèrent fortement un effet spécifique du complexe génique apoA-I-C-III-A-IV sur les niveaux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol-LDL bien que ce locus ne semblerait pas être la cause primaire. Dans une analyse plus sophistiquée des haplotypes, une combinaison particulière des haplotypes Xmnl, MspI et SstI a révélé une association significative entre le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV et le phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée chez ces 18 familles [236]. Ces données suggèrent une contribution réelle du locus apoA-I-C-III-A-IV à l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée mais cette contribution serait génétiquement complexe. Aucune donnée actuelle ne propose un endroit précis sur le locus où pourrait résider le défaut. Une mutation seule du gène de l'apoA-I serait improbable puisque plusieurs de ces mutations ont été associées à des diminutions isolées des niveaux de cholestérol-HDL. Bien que le défaut puisse résider sur le gène de l'apoC-III ou le gène de l'apoA-IV, les fonctions de ces apolipoprotéines demeurent encore peu connues.

2.3 Hypoalphalipoprotéinémie familiale sévère

Des études familiales suggèrent une large composante génétique dans la détermination des niveaux plasmatiques de cholestérol-HDL [181]. Les variantes génétiques associées à une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol-HDL, de cause moléculaire connue ou inconnue, ont été regroupées sous le terme d'hypoalphalipoprotéinémie familiale. Parmi les cas sévères d'hypoalphalipoprotéinémie familiale, plusieurs défauts structurels du gène de l'apoA-I affectant le métabolisme des HDL ont été identifiés [83,123,181-188,195,237]. Alors que certaines de ces mutations entraînent des diminutions drastiques ou une quasi-absence de particules HDL dans le plasma [237], bon nombre des variants d'apoA-I identifiés n'altèrent pas les niveaux de lipides et d'apolipoprotéines ou le risque cardio-vasculaire. Un abaissement des niveaux de cholestérol-HDL dû à des défauts génétiques de l'apoA-I résulte de la réduction ou de l'absence de production d'apoA-I et/ou d'une augmentation de la clairance

plasmatique de la protéine. D'autres défauts génétiques affectant les enzymes de transfert des lipides impliquées dans le métabolisme des HDL (LCAT, CETP) sont aussi reconnus pour leur effet déterminant sur les niveaux plasmatiques de cholestérol-HDL (84,85,189,190).

L'absence familiale de cholestérol-HDL demeure un désordre métabolique rare où environ 10 cas ont été caractérisés au niveau moléculaire et impliquent des défauts majeurs du gène de l'apoA-I [238]. La majorité des cas familiaux de réduction sévère ou absence complète de HDL a été attribuée à une déficience en apoA-I, une déficience en LCAT, à la maladie *fish eye*, à une déficience en lipoprotéine lipase ou une déficience en apoC-II; les défauts moléculaires de ces désordres sont aujourd'hui identifiés [181,195,238,240]. Le reste des cas appartient à des défauts de cause moléculaire inconnue dont les caractéristiques cliniques et métaboliques ne sont pas retrouvées dans d'autres désordres. Ces défauts incluent la maladie de Tangier [191,92,216] et les cas de déficience ou absence familiale en HDL [78,134,204] d'origine inconnue.

La maladie de Tangier a été décrite pour la première fois chez deux familles de l'Île de Tangier [203]. Elle est caractérisée par une réduction sévère des niveaux plasmatique de cholestérol-HDL sans altération des protéines HDL. La structure de la protéine et la séquence du gène de l'apoA-I sont normales malgré une diminution ou une absence des niveaux de cholestérol-HDL et une forte réduction de l'apoA-I. Bien que certains cas de déficience en apoA-I parallèle à une xanthomatose soient associés à une athérosclérose prématurée [82,240], la maladie de Tangier n'apparaît pas associée invariablement à la maladie coronarienne pécore. Typiquement, les sujets homozygotes présentent une accumulation d'esters de cholestérol à divers endroits de l'organisme, principalement dans les tissus réticulo-endothéliaux, entraînant des signes cliniques caractéristiques de la maladie dont une hyperplasie des amygdales, une splénomégalie et une neuropathie périphérique. Alors que le phénotype clinique apparaît transmis selon le mode autosomique récessif, le phénotype biochimique apparaît transmis selon le mode autosomique co-dominant [80]. Plusieurs études ont examiné le métabolisme du cholestérol cellulaire dans les macrophages et les fibroblastes en cultures provenant de sujets affectés de la maladie de Tangier. Les analyses initiales ont démontré que les HDL sont normalement internalisées dans les macrophages de Tangier mais dégradées au niveau du lysosome plutôt que normalement enrichies en lipides et cholestérol cellulaire puis resécrétées de la cellule,

selon le processus normal de rétroendocytose des HDL notamment impliqué dans les cellules de macrophages [241,242]. L'emmagasinement massif des esters de cholestérol retrouvé dans les macrophages des sujets de Tangier suggère un dérangement de l'homéostasie du cholestérol cellulaire dû à une altération disproportionnée des mécanismes d'influx et d'efflux du cholestérol. Ces premières constatations ont conduit à la conclusion d'un désordre du transport intracellulaire associé à la maladie de Tangier [243].

D'autres cas d'hypoalphalipoprotéinémie sévère d'origine inconnue ont été rapportés par Cheung [204], Rader [134] et Emmerich [131]. Chez les propositus présentés, les signes cliniques de la maladie de Tangier étaient absents ou partiellement présents. Malgré des pedigrees peu développés, deux de ces études [131,134] démontrent une base familiale du défaut dont l'une [131] suggère un mode de transmission co-dominant. Dans une étude [204], la caractérisation des particules HDL plasmatiques démontrait une majorité de particules de taille réduite (diamètre de Stokes < 8.2 nm) et la présence inhabituelle d'une population de particules ne renfermant que l'apoA-II. Selon les auteurs, malgré l'altération physico-chimique des particules, les HDL conservaient une fonction normale et efficace à provoquer l'efflux du cholestérol cellulaire d'après une mesure indirecte évaluant l'habileté des HDL à réprimer l'estérfication du cholestérol cellulaire dans des fibroblastes chargés en cholestérol et provenant de sujets normaux. Les auteurs suggèrent un catabolisme accéléré des particules HDL comme cause métabolique de cette déficience en HDL. Dans les deux autres études [131,134], un hypercatabolisme des particules HDL et/ou de l'apoA-I était directement démontré chez les propositus. Toutefois, toutes ces études n'ont pu mettre en évidence une relation entre la présence de maladie coronarienne précoce et la déficience en HDL chez les sujets affectés.

2.4 Objectifs de l'étude

Les études présentées dans cette thèse portent sur l'investigation des causes de l'expression d'une hypoalphalipoprotéinémie familiale. Deux manifestations du désordre seront étudiées: l'une commune et secondaire aux désordres lipidiques retrouvés dans l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée; l'autre, rare, sévère et constituant une forme primaire sans autres altérations des lipoprotéines. Les deux formes

d'hypoalphalipoprotéinémie familiale seront investiguées selon une approche descriptive et exploratoire: par une caractérisation clinique, biochimique et moléculaire approfondie des défauts, puis, dans un cas, par l'exploration des mécanismes physiologiques cellulaires du cholestérol impliqués dans la voie métabolique des HDL. L'investigation de désordres du métabolisme des HDL, exprimés dans ces cas d'hypoalphalipoprotéinémie, visent essentiellement à mieux comprendre les mécanismes physiologiques de cette voie métabolique des lipides non entièrement élucidée ainsi que ses dérangements pouvant conduire au développement de la maladie coronarienne.

2.4.1 Hyperlipoprotéinémie familiale combinée

L'hyperlipoprotéinémie familiale combinée exprime la forme d'hypoalphalipoprotéinémie familiale la plus commune chez des sujets présentant une maladie coronarienne précoce. Ce désordre génétique des lipoprotéines est associé à une élévation plasmatique variable du cholestérol-LDL et des triglycérides, une élévation de l'apoB et un bas niveau de cholestérol-HDL. Pour explorer les causes moléculaires de cette anomalie lipidique affectant les HDL, des polymorphismes du gène de l'apoA-I et des anomalies fonctionnelles du gène de la lipoprotéine lipase seront examinés chez des sujets de souche génétique canadienne française présentant un désordre familial des lipoprotéines compatible à une hyperlipoprotéinémie familiale combinée. L'objectif de cette étude sera vérifier dans ces familles la présence d'une association entre le phénotype dyslipidémique et les fragments de restrictions polymorphiques XmnI et SstI du complexe génique apoA-I-C-III-A-IV ainsi que trois mutations communes du gène de la lipoprotéine lipase ($LPL_{Gly188Glu}$, $LPL_{Pro207Leu}$, $LPL_{Asp250Asn}$), responsable de la presque totalité des cas de déficience en lipoprotéine lipase dans la population canadienne française. Les données de cette étude permettront d'examiner dans cette population la contribution potentielle du gène de l'apoA-I et de la lipoprotéine lipase à l'expression de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée.

2.4.2 Déficience familiale sévère en HDL

Dans une deuxième étude, trois familles de souche canadienne française, où quatre sujets présentent une déficience sévère en HDL, seront l'objet d'une investigation approfondie pour explorer les causes métaboliques et génétiques de cette anomalie. Le but de cette étude sera de vérifier la présence d'une cause connue de déficience sévère en HDL chez ces sujets par la caractérisation clinique, biochimique et moléculaire du défaut. Chez chacun des propositus, il sera examiné la présence de mutations sur le complexe génique apoA-I-C-III-A-IV et sur le gène de la lipoprotéine lipase, des altérations du gène de l'apoA-I, une déficience de l'enzyme LCAT, des anomalies physico-chimiques des particules et protéines HDL et les manifestations cliniques de la maladie de Tangier. Si aucune de ces anomalies n'est décelée, la cause de cette hypoalphalipoprotéïnémie familiale sévère sera alors considérée primaire et le défaut fera l'objet d'investigations additionnelles au niveau cellulaire. Le terme "déficience familiale sévère en HDL" fut suggéré ici pour identifier une forme sévère d'hypoalphalipoprotéïnémie familiale dont le défaut est primaire et d'origine métabolique et génétique inconnue.

Une troisième étude portera principalement sur l'examen des fonctions cellulaires de transport et d'efflux du cholestérol dans les fibroblastes en culture provenant des sujets avec une déficience familiale sévère en HDL tel qu'identifiés dans l'étude précédente. Ces données seront comparées à celles obtenues des cellules provenant de sujets normaux. L'objectif de cette analyse sera de vérifier chez les sujets avec une déficience familiale sévère en HDL une anomalie de l'homéostasie du cholestérol cellulaire tel que décrit dans la maladie de Tangier. Afin de vérifier d'autres anomalies cellulaires, il sera également examiné la liaison des HDL aux cellules de même que la protéine *HDL-binding protein* au niveau génique ainsi qu'au niveau de sa régulation et son expression cellulaire. Cette étude sera complétée par une analyse de la composition lipidique et protéinique des lipoprotéines plasmatiques ainsi qu'une caractérisation biochimique des particules HDL retrouvées dans cette forme particulière d'hypoalphalipoprotéïnémie familiale.

Chapitre 3: Article I

Lack of Association of the Apolipoprotein AI-CIII-AIV Gene XmnI and SstI Polymorphisms and of the Lipoprotein Lipase Gene Mutations in Familial Combined Hyperlipoproteinemia in French Canadian Subjects

Marcil M^{1,4}, Boucher B¹, Gagné E⁵, Davignon J², Hayden M⁵, Genest J Jr^{1,3,4}

From the Cardiovascular Genetics Laboratory¹, and the Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group², Clinical Research Institute of Montréal; the Cardiology Services, Hôpital Hôtel-Dieu de Montréal³ and the Montréal Heart Institute⁴, Montréal, Québec and the Department of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver⁵, Canada.

Supported by an operating grant from the Medical Research Council of Canada, the Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal and a Scholarship from the Medical Research Council of Canada (JG Jr).

Publié: *J Lipid Res* 1996; 37:309-319.

Abstract

Familial combined hyperlipoproteinemia (FCH) is a common familial lipoprotein disorder characterized by elevated plasma cholesterol and triglyceride levels with segregation in first-degree relatives. Most affected subjects with FCH have elevated plasma levels of apolipoprotein (apo) B. The disorder results from over-secretion of hepatic apoB-containing lipoprotein particles. The genetic defect(s) are unknown. Previous work has suggested that genetic polymorphisms of the apo AI gene and functional abnormalities of the lipoprotein lipase (LPL) gene are associated with FCH. We investigated the XmnI and SstI restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of the apo AI gene in FCH subjects of French Canadian descent. We also investigated commonly encountered functional mutations of the lipoprotein lipase (LPL) gene (LPLGly188Glu, LPLPro207Leu and LPLAsp250Asn) in French Canadians, that account for approximately 97% of cases of LPL deficiency in the province of Québec, Canada. We identified and characterized 54 FCH probands in lipid clinics and examined at least one first-degree relative. There were 37 men and 17 women (mean age 48 ± 9 and 58 ± 8 years, respectively). None of the probands had diabetes mellitus; mean plasma glucose was 5.5 mmol/L. High blood pressure was diagnosed in 32% of men and 29% of women. The body mass index ($\text{weight}(\text{kg})/\text{height}(\text{m}^2)$) was elevated in probands (27 ± 4 for men and 26 ± 4 for women). Mean plasma levels of cholesterol (C) was 7.6 ± 1.5 mmol/L, triglycerides 3.5 ± 1.6 mmol/L, LDL-C 4.9 ± 1.2 mmol/L, HDL-C 1.0 ± 0.3 mmol/L and apo B 1.83 ± 0.67 g/L in the probands. Allele frequency of the rare alleles of the XmnI and SstI RFLP were not significantly different from a healthy reference group. In several families studied, the XmnI and SstI RFLP did not unequivocally segregate with the FCH phenotype. There was no significant effect of the presence or absence of the XmnI or SstI RFLP's on plasma lipids, lipoprotein cholesterol or apoB levels. Only one FCH proband was found to have a mutation of the LPL gene (Gly188Glu), and this did not segregate with the FCH phenotype in the family. We conclude that in our highly selected group of FCH subjects of French Canadian descent, the XmnI and SstI RFLP's of the apo AI gene and common functional mutations of the LPL gene are not associated with FCH.

Introduction

Familial combined hyperlipoproteinemia (FCH) is a syndrome defined initially by elevations in total-cholesterol and triglycerides and by lipoprotein electrophoresis profile [1-3]. With improvement in laboratory methods, it is generally accepted that FCH is characterized by elevations in the number of apo B-containing particles, resulting in lipoprotein phenotypes IIa (elevated LDL-C), IIb (elevated LDL-C and triglycerides), IV (elevated triglycerides), or even normal, depending on which lipoprotein-cholesterol fraction is increased [4-10]. LDL particle size is usually decreased and HDL-cholesterol usually reduced in FCH [11], an elevated level of plasma apo B is a common denominator in affected individuals. Hyperapobetalipoproteinemia (HB), described over 15 years ago [12] shares many biochemical characteristics with FCH and the two can be considered part of the same syndrome. FCH is the most common familial lipoprotein abnormality in subjects with premature CAD [1,13]. Understanding the molecular genetics of FCH may yield considerable insight in the fields of cardiovascular genetics and lipoprotein metabolism.

Previous reports have investigated a possible association between apo AI-CIII-AIV gene complex and FCH/HB [14]; the rare allele of the XmnI RFLP 5' to the apo AI gene was seen more frequently in FCH subjects than controls [15]. Our previous work on the apo AI-CIII-AIV gene complex [16] or the apo B gene [17] did not suggest an association between RFLP's at these loci and alteration in apo B levels, nor did we find an association with the presence of familial lipoprotein abnormalities.

In the province of Québec, mutations within the LPL gene leading to an abnormally functioning protein are common [18]. Several point mutations involving exons 5 and 6 have been described in the French Canadian population with LPLGly188Glu, LPLPro207Leu and LPLAsp250Asn [19-21] accounting for the majority (97%) of LPL deficient subjects [19]. The heterozygous state for LPL deficiency is seen frequently. Based on the measurement of post-heparin lipoprotein lipase activity, Babirak et al. [22] postulated that the heterozygous state for LPL deficiency could account for nearly one third of FCH cases. Subjects known to have a mutation on one allele for the LPL gene often have elevated plasma LDL apo B/cholesterol ratios [18]. One large kindred with obligatory heterozygote subjects for the LPL188 mutation revealed an association between type IV hyperlipoproteinemia and the presence of the mutation in affected

individuals [23,24]. It is uncertain, however whether the heterozygous state for functional mutations of the LPL gene is one of the genetic defect in FCH.

In an attempt to better characterize the metabolic and genetic disorders in subjects with premature CAD [25], we examined a group of well characterized subjects with FCH. Our purpose was to examine the association between the presence of the *XmnI* and *SstI* RFLP's of the apo AI gene, the presence of known mutations of the LPL gene and the FCH phenotype in subjects of French Canadian descent.

Methods

Subject selection. Subjects for this study were selected from the lipid clinics of the Clinical Research Institute of Montréal (CRIM) and from the Montréal Heart Institute (MHI). Patients at either institutions are screened for the presence of lipoprotein abnormalities and standardized assays for cholesterol are available at both. Lipoprotein-cholesterol and the measurement of apolipoprotein B are part of the clinical evaluation at each institution. In all subjects, at least one first-degree relative was identified as having a lipoprotein abnormality characteristic of FCH. Careful clinical examination by experienced physicians ruled out the presence of familial hypercholesterolemia (FH) or type III dysbetalipoproteinemia. In several subjects (n=19), a more complete family examination was performed with all available first- and second-degree relatives. The protocol for the study was reviewed and accepted by the Ethics Committees of both institutions.

The FCH phenotype was characterized as an elevation of LDL-C or triglycerides >90th percentile for age- and gender-matched subjects [13], or an apo B level >1.50 g/L. In addition, one first-degree relative had to have a similar lipoprotein abnormality. Secondary causes of dyslipoproteinemia were cause of exclusion. Specifically, no subject had diabetes mellitus, hypothyroidism (as assessed by elevated thyroid stimulating hormone), were obese with a BMI >35 or any medical condition known to alter lipoprotein levels. Familial hypercholesterolemia and type III dysbetalipoproteinemia were excluded on clinical grounds and, when appropriate, by the molecular analysis of the LDL receptor gene for common mutations causing FH in French Canadians [26] and by apo E phenotyping. LDL-Receptor mutations frequently seen in subjects of

French Canadian descent [26] were determined in subjects with elevated LDL-cholesterol (>95th percentile).

Clinical Variables. Data was obtained on cigarette smoking, defined as a history of cigarette smoking; the presence of hypertension, defined as a history of hypertension, drug treatment specifically prescribed for the treatment of hypertension by a physician or the presence of arterial blood pressure >150/90 mmHg; diabetes is defined as a physician diagnosis of diabetes or treatment with oral hypoglycemic drugs or insulin, and a family history of premature CAD, as defined in the NCEP II [27]. The use of medications was recorded; all patients on lipid-lowering medications were asked to stop their medication for two months prior to blood sampling (no patient was taking the drug probucol). The family history was determined on all patients, including age of death of first and second degree relatives or onset of symptoms, presence of vascular disease, hypertension or diabetes and cause of death of all relatives for three generations. Height and weight were recorded on all patients and body mass index calculated (BMI: weight (kg)/height² (m)). Blood pressure was recorded with the patient in the sitting position for at least five minutes.

Comparison group. Allele frequencies of apo AI RFLP's were assessed in a population selected for health from a major utility company in Montréal, Canada. This population has previously been described [28] and allele frequencies for several apolipoprotein genes have been published [29]. We used this group to examine differences in allele frequencies between a group of normal subjects and our patients with FCH. Since LPL mutations 188, 207 and 250 are known to impart abnormal function in lipoprotein lipase, we sought to ascertain through family studies whether mutations at the catalytic site of LPL segregated with the FCH phenotype.

Plasma lipids, lipoprotein-cholesterol and apolipoprotein B measurements. Blood was drawn in ethylenediaminetetraacetic acid- (EDTA) containing tubes as an anticoagulant (final concentration 1.2 mg/mL) for determination of biochemical variables. All patients were fasting. Plasma was separated by centrifugation (20 min, 4°C, 2000 x g), multiple one mL aliquots (n=5) were stored at -80°C for future studies. Total cholesterol and triglyceride levels were measured as previously described [25] using the Cobas Mira-S analyzer (Hoffman LaRoche Diagnostics, Basel, Switzerland). Lipoprotein-cholesterol was determined after ultracentrifugation of plasma at density

d=1.006 g/mL. HDL-cholesterol was determined after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins [25]; LDL-cholesterol was determined as infranatant cholesterol - HDL-cholesterol. The laboratory participates and meets the requirements of the Centers for Disease Control cholesterol standardization program. Apo B levels were determined by nephelometry on a laser nephelometer (BN-100 Behring) as described [30].

AI-CIII-AIV XmnI and SstI RFLP analysis. Southern blot hybridization was carried out on all probands after digestion of genomic DNA with the enzymes XmnI (New England BioLabs, Ma) or SstI (BRL, Bethesda, MD) and the apo AI cDNA used as a probe. Radiolabeling with ^{32}P dCTP was carried out with the random primer technique (Pharmacia). In many cases, the presence of the XmnI and SstI RFLP's was also assessed by the polymerase chain reaction (PCR) as previously reported [31]. There was complete agreement between Southern blotting analysis and the results obtained by PCR-based diagnosis. Allele frequencies of the XmnI and SstI RFLP's in a healthy French Canadian population of men and women have already been determined [29]. We considered this group of subjects to be representative of a healthy segment of the population. In addition, these reference subjects were sampled from the same geographical region as our FCH patients.

LPL mutations. Exon 5 of the LPL gene was amplified using the polymerase chain reaction (PCR), using the following primers LPL-14 5'-TGTTCTGCTTTTTTCCCTT -3' (forward) and 5'- TAATTCGCTTCTAAATAATA -3' (reverse) [20]. We used 30 cycles of PCR with a deannealing temperature of 94°C for 1 min, annealing temperature of 55°C for 1 min and a prolongation temperature of 72°C for 2 min. We used the Taq polymerase from Bethesda Research Laboratories (BLR) laboratories, with 2 μmol MgCl_2 . For the determination of mutation LPL188, the amplified fragments of exon 5 of the LPL gene are precipitated and resuspended in tris-EDTA buffer and cut with the restriction enzyme Avall [20]. The fragments are resolved on an 1.5% agarose gel and visualized under ultraviolet light after staining with ethidium bromide. The presence of the LPL-188 mutation deletes an Avall site within exon 5. For mutation LPL-207, the amplified fragment is cleaved with the enzyme BslI which cleaves the wild type but not the mutant allele. Finally, mutation LPL-250 on exon 6 of the LPL gene was assessed by PCR as previously described [32]. The primers used for exon 6 are 5'-GCC-GAG-ATA-CAA-TCT-TTG-GTA-3'(forward) and 5'-CTG-CTT-CTT-TTG-GCT-CTG-ACT-GTA-

3' (reverse). Mutation LPL-250 was detected after digestion with the restriction enzyme TaqI.

Statistical analysis. The data were stored on a personal computer and the analysis was performed using commercially available software (Sigma-Stat, Jandel Scientific, San Rafael, CA). Differences for continuous variables were determined by t-test or by Mann-Whitney analysis (in the case of non-parametric data). Differences in discrete variables were determined by chi-square analysis. We considered a level of $p < 0.05$ to be significant.

Results

Subjects characteristics. We identified 54 subjects of French Canadian descent who were identified as having FCH based on the proband's lipoprotein profile and at least one first degree relative. There were 37 men, with a mean age of 48 ± 9 years and 17 women, with a mean age of 58 ± 8 years. The age difference between genders was statistically significantly different and likely reflects differences in physician's referral to the lipid clinics or different age of expression of FCH in women. Of the 37 men, 12 (34%) had documented coronary artery disease and 5 of 17 women (29%) also had CAD. Table I shows the clinical features of the study subjects, separated by gender. There was a strong history of cigarette smoking especially among the men, although this includes past history of cigarette smoking as well. Hypertension was seen frequently, 12 (34%) of the men and 5 (17%) of the women had a history of high blood pressure. Although none of the patients were diagnosed as having, or being treated, for diabetes mellitus (an exclusion criterion for entry into the study), two men were told they had "borderline" diabetes but had a normal fasting glucose level at the time of sampling. Oral glucose tolerance tests were not performed. A family history of coronary artery disease was frequently encountered both in men (86%) and in women (75%). The BMI was slightly higher in men (27 ± 4) than in women (26 ± 4), $p = \text{ns}$. The mean fasting plasma glucose was similar in men and in women (Table I). This elevated prevalence of cardiovascular risk factors reflects not only a population of patients targeted for being at high risk of cardiovascular disorders but also the commonly observed clustering of cardiovascular risk factors in high risk individuals.

Table I. Clinical characteristics of FCH probands

FCH	n	Age (years)	Smoking (History)	HBP (Presence)	Diabetes (Presence)	Fam Hx (Presence)	BMI	Glucose
		yr	%	%	%	%	kg/m ²	mmol/L
Men	37	48±9	90%	32%	0	86%	27±4	5.5±0.4
Women	17	58±8	53%	29%	0	75%	26±4	5.4±0.8

HBP: high blood pressure; Fam Hx: family history of coronary artery disease; BMI: body mass index.

Plasma lipids. Plasma lipid and lipoprotein-cholesterol levels are shown in Table II. The apo E phenotype was obtained in 42/54 subjects (78%). None of the subjects examined was homozygous for the apo E2/2 phenotype and no study subject had a diagnosis of type III dysbetalipoproteinemia. Mean levels of plasma-cholesterol was 7.3±0.9 mmol/L in men and 8.1±1.3 mmol/L in women; mean triglyceride levels were 3.3±1.7 mmol/L for men and 3.8±1.2 mmol/L for women. Mean levels of LDL-cholesterol were 4.8±1.0 mmol/L and 5.3±0.9 mmol/L while mean HDL-cholesterol levels were 0.9±0.2 mmol/L and 1.1±0.2 mmol/L men and women, respectively. For comparison purposes, mean levels of cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol from the Lipid Research Clinics data [33] for men aged 48 and women aged 58 are shown in Table II. Mean levels of apolipoprotein B was determined. In men, the mean apo B level was 1.89±0.37 g/L and 1.71±0.91 g/L in women. Mean level of apo B in a random Quebec population sample of men (n=152) aged 47±8 years was 1.28±0.28 g/L and for women (n=61), 1.19±0.29 g/L (Davignon J, Lussier-Cacan S, unpublished observations). A statistical level of comparison for biochemical variables between genders is not given as such a value has little meaning in the present context.

Table II. Mean lipid, lipoprotein-cholesterol, triglyceride levels and apo B levels in men and women with FCH

	Cholesterol (mmol/L)	Triglycerides (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ApoB (g/L)
FCH Men (n=34)	7.3±0.9	3.3±1.7	4.8±1.0	0.9±0.2	1.89±0.37
LRC Men (45-49 years) ^a	5.43	1.34	3.65	1.16	---
FCH Women (n=17)	8.1±1.3	3.8±1.2	5.3±1.5	1.1±0.2	1.71±0.91
LRC [†] Women (55-59 years) ^a	5.92	1.25	3.75	1.55	---
FCH Combined (n=54)	7.6±1.5	3.5±1.6	4.9±1.2	1.0±0.3	1.83±0.67

^aNormal group from the Lipid Research Clinics data [33].

Apo AI XmnI RFLP. The prevalence of the apo AI XmnI RFLP is shown in Table III. Data analysis were performed separately for men and women, and then combined. Absence of the cutting site was seen in 25/37 (68%) of men and 11/17 (65%) of women; overall, therefore, 36/54 (67%) of patients with FCH were heterozygous for absence of the XmnI cutting site. Based on the study of Kessling et al. summarized in Table III [29], the prevalence of the absence of the XmnI RFLP was 79% (163/206) for control men and 74% (82/111) for control women (difference non-significant by chi-square analysis).

Table III. Apo AI XmnI and SstI RFLP in reference and FCH subjects

RFLP ^a	Men			Women		
	Control	FCH	p ^b	Control	FCH	p ^b
XmnI 00	79% (163/206)	68% (25/37)	0.297	74% (82/111)	65% (11/17)	0.559
XmnI 01	19% (40/206)	30% (11/37)		24% (27/111)	35% (6/17)	
XmnI 11	2% (3/206)	3% (1/37)		2% (2/111)	0% (0/17)	
SstI 00	82% (177/215)	75% (27/36) ^c	0.433	88% (99/112)	71% (12/17)	0.088
SstI 01	14% (30/215)	22% (8/36) ^c		11% (12/112)	24% (4/17)	
SstI 11	4% (8/215)	3% (1/36) ^c		1% (1/112)	6% (1/17)	

^a "0" refers to the absence of the cutting site and "1" to its presence on each allele.

^b p value indicated for allele frequencies in a 2 x 3 contingency table.

^c the SstI RFLP on one FCH proband was not determined.

Family studies of two probands are shown in Figures 1A and 1B. As can be seen from FCH kindred 21513 (Figure 1A), all first-degree relative of the probands are considered affected (shaded symbols). The offspring of subject II2 are not affected despite sharing at least one XmnI allele. Subjects IIIa7 and IIIa9 are more informative; the former is affected and does not have the XmnI allele of maternal origin whereas subject IIIa9 has one XmnI allele but is unaffected. Ssubjects IIIb8 and III 4 are considered affected and do not have the XmnI RFLP. Similarly, the first- degree relatives in kindred FCH 5695 are affected but no clear association of the XmnI allele and the FCH phenotype can be unequivocally shown. For instance, subjects FCH 5695 II3, II6, II7 and II10 are considered affected but do not bear the XmnI RFLP. Conversely, subject II12 is considered unaffected but has the XmnI RFLP. Thus, we were unable to show that the FCH phenotype is associated with the XmnI RFLP (Figure 1B).

Apo AI-CIII SstI RFLP. The prevalence of the apo AI SstI RFLP is shown in Table III. In the control group, data on 327 subjects (215 men and 112 women) are available. The frequency of the common SstI RFLP allele (absence of the cutting site) in control men

FCH 21513

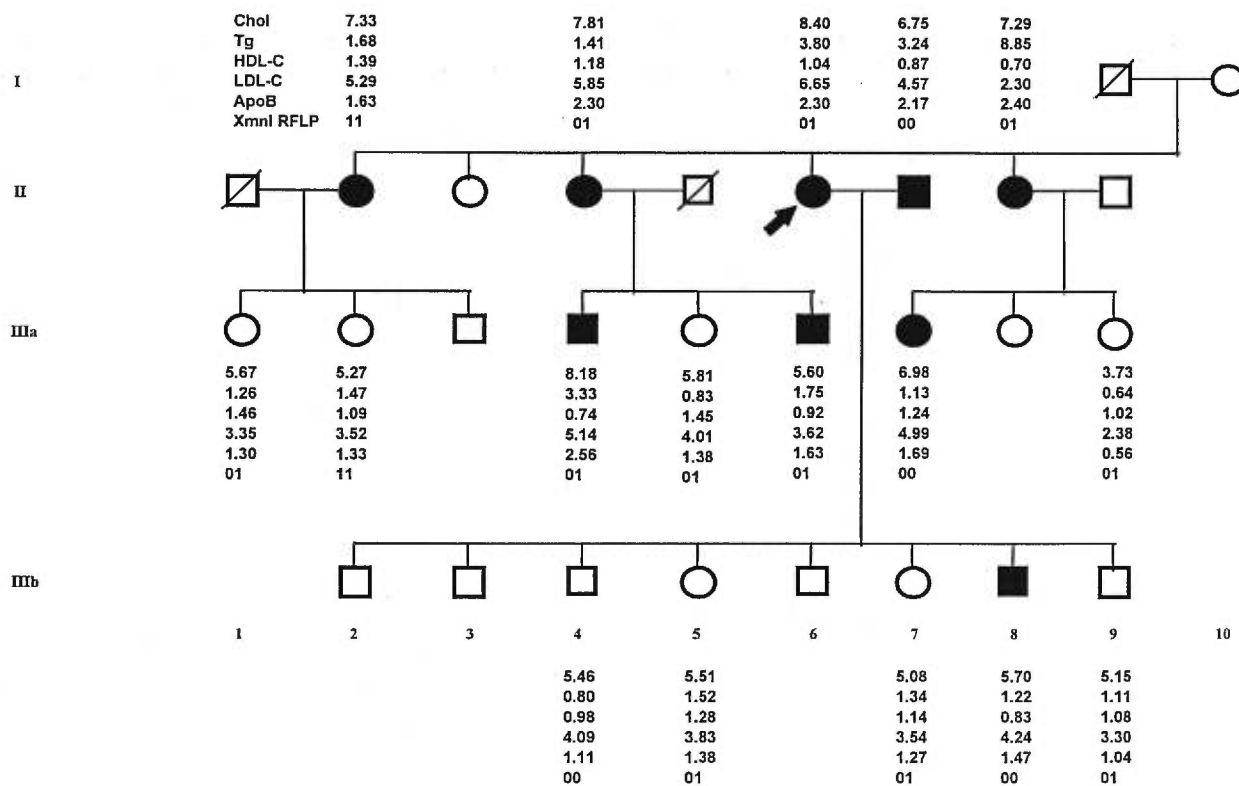


Fig. 1A. Family of kindred FCH 2513.

FCH 5695

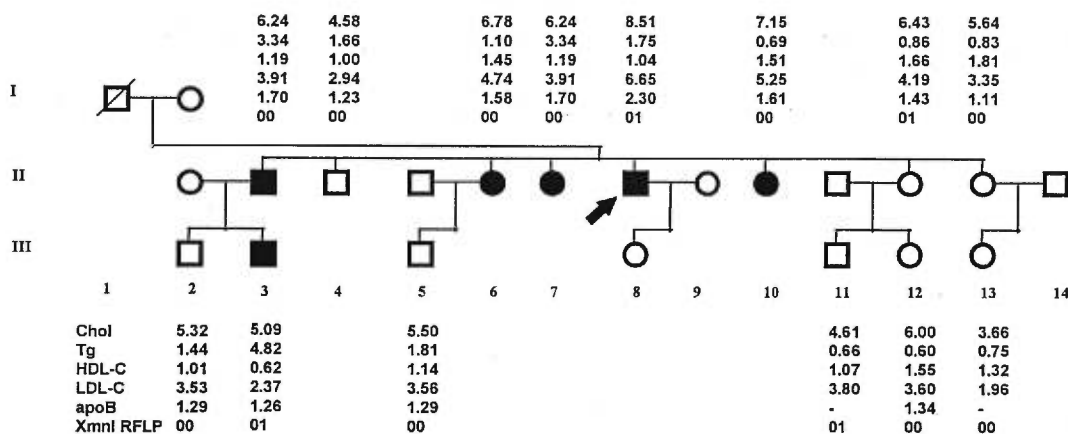


Fig. 1 B. Family tree of kindred FCH 5695.

Men are indicated by a square and women by a circle. Proband is shown by a thick arrow. Deceased subjects are marked with a diagonal line. Shaded symbols represent the subjects who are considered affected. Total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels (in mmol/L), apo B values (in g/L) and XmnI RFLP (0, absence; 1, presence of the cutting site) respectively are shown above or below the symbols of all sampled subjects.

was 89.3% and 93.8% in control women ($p=ns$). Overall, the combined (men and women) prevalence of the frequent allele in control men and women was 90.8% and 9.2% for the rare allele. In the FCH group, the frequency of the frequent allele (absence of the cutting site) was 84.9%, and of the rare allele, 15.1%. This difference in allele frequencies was not significantly different.

Effects of the XmnI and SstI RFLP on plasma levels of lipids, lipoprotein-cholesterol and apolipoprotein B. We examined the effects of the presence or absence of the XmnI and SstI RFLP's on plasma levels of total-cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol as well as apo B in the probands; the data are shown in Table IV. In the study by Kessling et al [29], the XmnI or SstI RFLP's did not have a significant effect on plasma-cholesterol, triglycerides or lipoprotein-cholesterol levels. In the FCH subjects, the analysis was carried out on men and women combined. The presence of either the XmnI or SstI RFLP did not alter plasma levels of total cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol, HDL cholesterol or apo B levels. The sample size is small, however and this study cannot determine with certainty that these RFLP's in this selected, hyperlipidemic sample do not have a significant effect on lipid parameters.

Table IV. Effect of the XmnI and SstI RFLP's on plasma lipids and lipoprotein cholesterol in FCH subjects

RFLP	Cholesterol (mmol/L)	Triglycerides (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	Apo B (mg/dL)
XmnI 00 (n=36)	7.52±1.09	3.44±1.47	4.87±1.06	0.97±0.21	190±30
XmnI 01 (n=17)	7.65±1.3	3.69±1.83	4.96±0.90	0.95±0.21	217±48
XmnI 11 (n=1)	7.30	1.53	5.49	1.14	180
SstI 00 (n=39)	7.52±1.09	3.52±1.76	4.85±0.91	0.98±0.23	201±41
SstI 01 (n=12)	7.66±1.30	3.38±1.07	5.07±1.22	0.91±0.14	190±25
SstI 11 (n=2)	6.69	2.99	4.28	0.87	180

Lipoprotein lipase mutations. We assessed mutations LPL188, 207 and 250 which are seen in the homozygous state in 97% of subjects with LPL deficiencies in the Province of Québec, Canada. This high prevalence of single mutations indicates a founder effect, which is frequently seen in populations with inbreeding. We determined the presence of mutations LPL 188, LPL 207 and LPL 250 by PCR-based diagnosis in all probands. All the analyses were performed in the Vancouver (Canada) laboratory. In all but one proband with FCH, none of the aforementioned functional mutations of the LPL gene were found. Only one patient was found to carry a mutation of the LPL gene (LPLGly188Glu). This patient was previously reported in our initial study of 31 FCH patients (all of whom are included in the present study) [34]. Careful family study failed to show unequivocally that the FCH phenotype was associated with the presence of the LPL 188 mutation. We did not assess the presence of other known mutations of the LPL

gene than the three mentioned above. Our previous experience has revealed that other mutations of the LPL gene (even those not affecting the catalytic site) are not associated with FCH in our subjects [34]. In addition, the three mutations LPL 188, LPL 207 and LPL 250 account for ~97% of mutations in LPL deficient subjects of French Canadian descent.

Discussion

Familial combined hyperlipidemia is the most frequent familial lipoprotein disorder seen in subjects with premature CAD [1,13]. Despite a decade of research in genetic markers for FCH using the candidate gene approach, no consistent genetic marker has been identified. We took advantage of a well defined population of French Canadians where there is an enrichment of genetic lipoprotein disorders with a founder effect to examine genes that have previously been associated with the FCH phenotype in other populations. In the present study, we examined two candidate genes that have been associated or postulated to be associated with FCH in other populations. We have failed to find an association between the XmnI and SstI RFLP's of the apo AI gene and FCH. Although the study by Wojciechowski et al. [14] strongly suggested that the apo AI gene (or one in close linkage disequilibrium) may be associated with FCH, there is data obtained from population studies that cast doubt on the physiological effect of the XmnI RFLP on lipoprotein metabolism. First, there is little evidence in normal populations that the XmnI RFLP is associated with alterations in plasma lipoprotein cholesterol levels [29]. Second, the XmnI RFLP is not seen with increasing frequency in our FCH subjects compared with healthy controls and third, the XmnI RFLP does not segregate with the FCH phenotype in the present study.

The SstI RFLP has been associated with altered triglycerides levels in selected populations [29, reviewed in 16], but not in others. In our group of FCH subjects and controls, the SstI polymorphism was not associated with altered lipid levels, nor was it seen more frequently in FCH probands than in control subjects. Family studies performed within the context of the present study were inconclusive because of the relative rarity of the SstI RFLP in our kindred.

Functional mutations of the LPL gene have been postulated to be associated with FCH [22]. We have examined the most frequent mutations of the LPL gene causing

familial LPL deficiency (LPLGly188Glu, LPLPro207Leu and LPLAsp250Asn) in French Canadians in a group of 31 unrelated individuals with FCH as well as silent mutations detected by single stranded conformational polymorphism (SSCP) and direct sequencing [34], and have not been able to find mutations in other domains of LPL that are associated with FCH. It is still possible that mutations other than those affecting the catalytic domain of LPL may be associated with FCH (for example, a domain responsible for the cellular uptake of triglyceride-rich lipoproteins[35,36]). However, based on our previous study [34], this does not appear to be the case. We took advantage of the high prevalence of three mutations of the LPL gene seen in French Canadians to examine whether these mutations are associated with the FCH phenotype. Our results suggest that functional mutations of the LPL gene may not be associated with a sub-group of FCH subject, as previously suggested. Minnich et al [32] reported that these mutations of the LPL gene are frequently seen in subjects with hypertriglyceridemia. Unfortunately, no family data has been provided by the authors but the data are compelling to suggest that in patients with moderately severe and severe hypertriglyceridemia (triglyceride levels >6 mmol/L), LPL mutations are common in subjects of French Canadian descent.

The pathogenesis of FCH remains in dispute. Based on cell culture, perfused liver studies, animal and human studies, a consensus is emerging that FCH results from over-secretion of apo B-containing particles from the liver. This data is derived on the following:

Apo B mRNA production. The apo B gene is approximately 45 kb in length and codes for an mRNA of 14 kb. The cDNA of the gene has been sequenced by at least five independent groups [37] and several positive and negative *cis*-regulatory regions have been mapped in the 5' end and in the second intron. Several *trans*-acting elements have been partly characterized [38]. Cell culture studies using hepatocarcinoma-derived cell lines (HepG2) have attempted to better characterize the environmental stimuli for apo B secretion and mRNA production. The current data suggest that apo B secretion is related to alteration in apo B mRNA production under short term experimental conditions only to a small extent [39] but rather that apo B secretion rate is regulated post-transcriptionally and post-translationally.

Cellular control of apo B secretion. Efforts at understanding apo B mRNA regulation using *in vitro* cell culture systems, and non-human primates have so far failed to reveal important changes in mRNA production with various interventions, such as changes in fatty acids in the culture medium or in the diet [40]. Recent evidence suggests that apo B undergoes post-translational modifications from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus that may be critical in determining the amount of protein secreted [41-43]. The nascent polypeptide chain is synthesized on the rough endoplasmic reticulum (ER) and triglyceride synthesis occurs on the smooth ER. It appears that apo B is degraded before secretion. One can postulate that nascent apo B may be protected from proteolysis by association with neutral lipids which would then mask the sites of amino acid cleavage. Alternatively, recent data suggest that cholesterol ester formation may be a rate-limiting step in apo B secretion. It is therefore conceivable that apo B degradation occurs before its association with triglycerides and that ACAT activity (acyl CoA: cholesterol acyltransferase) may play an important role in determining the formation of nascent apo B containing lipoproteins before transfer to the Golgi apparatus [44]. Apo B secretion, therefore, is in great part substrate driven.

Kinetic studies using radiolabeled VLDL particles or by endogenous labeling of apo B using stable isotope methodology have shown that the VLDL apo B production is increased in FCH [45-48]. Although this concept is now generally accepted, the cellular mechanisms by which increased secretion of apo B occurs without increased mRNA production remains elusive. One potential mechanism is a decrease in the rate of intracellular apo B degradation in genetically predisposed individuals [48]. By this mechanism, the amount of constitutively synthesized apo B destined for intracellular degradation is shifted to a secretory pathway instead. The elucidation of this pathway and the proteins involved will be of crucial importance in understanding disorders of hepatic oversecretion of apo B.

There are important limitations with this type of studies. First and foremost, a major difficulty lies in the assignment of the FCH phenotype. We have defined FCH based on the 90th percentile plasma levels of LDL-cholesterol and triglycerides [13], or an apo B level > 1.50 g/L. These arbitrary cut-points are based on the normal distribution of these biological variables within a population. In doing so, we have dichotomized a continuous

variable. Despite these caveats, the families shown in Figures 1A and 1B have not presented a serious problem in the diagnosis of FCH.

Second, the familial aggregation of lipoprotein disorders, resistance to insulin-mediated glucose uptake, hypertension, fasting hyperglycemia, and abdominal obesity are seen frequently as part of the “metabolic syndrome” (syndrome X) [49], familial dyslipidemic hypertension [50], and in clustering of cardiovascular risk factors [51,52]. The genetic basis or the molecular defect(s) of this clustering of risk factors remains unknown. It is not surprising, however, that candidate genes within the gene associated with lipoprotein metabolism not be strongly associated with the phenotype under study. This is particularly relevant if the main stimulus for increased secretion of hepatic apoB-containing lipoproteins is substrate availability. Any condition that causes increased fatty acid delivery to the liver, such as a diet rich in saturated fats, peripheral insulin resistance, increased hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins or decreased fatty acid utilization or incorporation into peripheral (adipose) tissues, may increase hepatic apo B (and triglyceride secretion). Under these conditions, it is difficult to associate genetic variability of the apo AI-CIII-AIV gene cluster and hepatic secretion of apo B.

Functional defects within LPL have been reported to be present in roughly one third of FCH probands (Babirak). We have taken the opportunity, in our population, of the relatively high frequency of three functional mutations of the LPL gene seen in approximately 97% of LPL deficiency in the province of Quebec, Canada. We were unable to identify an association with these LPL mutations in our 54 probands with FCH. As we have previously reported in 31 of the probands of the present study, molecular analysis of the LPL gene in FCH did not reveal an association with other mutations of the LPL gene in our French Canadian subjects. In only one proband, a functional mutation of the LPL gene (LPL188) was identified. As previously reported, the FCH trait could not be unequivocally associated with this mutation [34].

In light of these findings in our FCH probands, the data suggest the following: first, the previously reported association of FCH with the XmnI RFLP of the apo AI gene does not appear substantiated in those highly selected probands. Second, common functional mutations within the LPL gene are not associated with FCH. Third, FCH represents a poorly defined lipoprotein abnormality, very often associated with abdominal obesity (or increased BMI, as seen here), high blood pressure and peripheral insulin resistance. Despite the tremendous progress in the fields of lipoprotein metabolism and molecular

biology made since the original description of FCH, we are no closer to finding an acceptable definition or a molecular defect. Our current concept is that a genetic predisposition to FCH (not yet characterized) may be expressed fully in the presence of a poor lifestyle, which includes abdominal obesity, a diet rich in saturated fats and physical inactivity. In turn, the metabolic abnormalities seen in the context of abdominal obesity and decreased insulin-mediated glucose uptake contribute to decreased fatty acid uptake into adipose tissue and secondary increased in hepatic apo B secretion. The recently characterized acylation stimulated protein (ASP) - adipsin system at the level of adipose tissue may provide important insight into the pathogenesis of FCH and other familial lipoprotein disorders [53].

The search for a genetic basis of FCH is sorely needed. Unlike monogenic disorders such as familial hypercholesterolemia, type III dyslipoproteinemia or familial defective apo B-100 [53], the basis for FCH is likely to be polygenic and have an important environmental influence. Culler et al. [55] recently performed complex segregation analysis in a group of 55 British families with FCH and re-examined the original data published by Goldstein et al. [1]. They have found evidence for a major gene acting on triglyceride levels but not on other lipoprotein fractions. This analysis confirms the genetic nature of the disorder and points to the importance of triglyceride metabolism in FCH. An association of FCH with genetic markers for the short arm of chromosome 19 (near the LDL receptor gene locus) has raised the possibility that the LDL-R gene or a gene close to it may be involved with the disorder [56]. Physiologically, it is difficult to implicate the LDL-R gene in FCH. One must keep in mind, however, that overproduction of apo B is seen in FH individuals. This association warrants further research.

Acknowledgements

The authors wish to thank the research nurses from the Clinical Research Institute of Montréal and the Montréal Heart Institute, especially Colette Rondeau and Francine Lemieux for gathering probands and family members for this study; and the clinical laboratory staff of the Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group of the Clinical Research Institute of Montréal for the measurement of lipids, lipoprotein-cholesterol, and apolipoprotein B. In addition, the dedication and editorial skills of Paule Marchand are gratefully acknowledged.

References

1. Goldstein J.L., H.G. Schrott, W.R. Hazzard, E.L. Bierman, A.G. Motulsky. 1973. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.* 52:1544-1568.
2. Rose H.G., P. Kranz, M. Weinstock, J. Juliano, J.I. Haft. 1973. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: Evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am. J. Med.* 54:148-160.
3. Nikkila E.A., A. Aro. 1973. Family study of lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* 1:954-959.
4. Glueck C.J., R. Fallat, C.R. Buncher, R. Tsang, P. Steiner. 1973. Familial combined hyperlipoproteinemia: Studies in 91 adults and 95 children from 33 kindreds. *Metabolism.* 23:1403-1428.
5. Brunzell J.D., J.J. Albers, A. Chait, S.M. Grundy, E. Groszek, G.B. McDonald. 1983. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 24:147-155.
6. Vega G.L., W.F. Beltz, S.M. Grundy. 1985. Low density lipoprotein metabolism in hypertriglyceridemic and normolipidemic patients with coronary heart disease. *J. Lipid Res.* 26:115-126.
7. Teng B, A.D. Sniderman, A.K. Soutar, G.R. Thompson. 1986. Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 77:663-672.
8. Grundy S.M., A. Chait, J.D. Brunzell. 1987. Familial combined hyperlipidemia workshop. Meeting summary. *Arteriosclerosis.* 7:203-207.
9. Ericsson S., M. Eriksson, L. Berglund, B. Angelin 1988. Low density lipoprotein metabolism in hereditary forms of hypertriglyceridemia: studies in familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipidemia. 8th International Symposium on Atherosclerosis. 231.
10. Sane T., E.A. Nikkilä. 1988. Very low density lipoprotein triglyceride metabolism in relatives of hypertriglyceridemic probands. Evidence for genetic control of triglyceride removal. *Arteriosclerosis.* 8:217-226.
11. Genest J. Jr., J-M. Bard, J-C. Fruchart, J.M. Ordovas, E.J. Schaefer. 1993. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb.* 13:1728-1737.

12. Sniderman A., S. Shapiro, D. Marpole B. Skinner, B. Teng, P.O. Kwiterovich Jr. 1980. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:604-608.
13. Genest J.J. Jr., S.S. Martin-Munley, J.R. McNamara, J.M. Ordovas, J.M. Jenner, R.H. Meyers, S.R. Silberman, P.W.F. Wilson, D.N. Salem, E.J. Schaefer. 1992. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation.* 85:2025-2033.
14. Wojciechowski A.P., M. Farrall, P. Cullen, T.M. Wilson, J.D. Bayliss, B. Farren, B.A. Griffin, M.J. Caslake, C.J. Packard, J. Shepherd. 1991. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature.* 349:161-164.
15. Hayden M.R., H. Kirk, C. Clark, J. Frolich, S. Rabkin, R. McLeod, J. Hewitt. 1987. DNA polymorphisms in and around the Apo AI-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am. J. Hum. Genet.* 40:421-430.
16. Ordovas J.M., F. Civeira, J. Genest Jr, S. Craig, A.H. Robbins, T. Meade, M. Pocovi, P.M. Frossard, U. Masharani, P.W.F. Wilson, D.N. Salem, R.H. Ward, E.J. Schaefer. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 87:75-86.
17. Genest J. Jr., J.M. Ordovas, J.R. McNamara, A.M. Robbins, T. Meade, S.D. Cohn, D.N. Salem, P.W.F. Wilson, U. Masharani, P.M. Frossard, E.J. Schaefer. 1990. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 82:7-17.
18. Gagné C., L.D. Brun, P. Julien, S. Moorjani, P-J. Lupien. 1989. Primary lipoprotein-lipase activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *Can. Med. Assoc. J.* 140:405-411.
19. Ma Y., H.E. Henderson, M.R.V. Murthy, G. Roederer, M.V. Monsalve, L.A. Clarke, T. Normand, P. Julien, C. Gagné, M. Lambert, J. Davignon, P.J. Lupien, J.D. Brunzell, M.R. Hayden. 1991. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *New Eng. J. Med.* 324:1761-1766.
20. Monsalve M.V., H. Henderson, G. Roederer, P. Julien, S. Deeb, J.J.P. Kastelein, L. Perity, R. Devlin, T. Bruin, M.R. V. Murthy, C. Gagné, J. Davignon, P.J. Lupien, J.D. Brunzell, M.R. Hayden. 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.* 86:728-734.

21. Henderson H.E., Y. Ma, F. Hassan, M.V. Monsalve, A.D. Marais, F. Winkler, K. Gubernator, J. Peterson, J.D. Brunzell, M.R. Hayden. 1991. Amino acid substitution (Ile194-->Thr) in exon 5 of the lipoprotein lipase gene causes lipoprotein lipase deficiency in three unrelated probands. Support for a multicentric origin. *J. Clin. Invest.* 87:2005-2011.
22. Babirak S.P., P-H. Iverius, W.Y. Fujimoto, J.D. Brunzell. 1989. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis.* 9:326-334.
23. Emi M., D.E. Wilson, P-H. Iverius, L. Wu, A. Hata, R. Hegele, R.R. Williams, J-M. Lalouel. 1990. Missense mutation (Gly-->Glu188) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency. *J. Biol. Chem.* 265:5910-5916.
24. Wilson D.E., M. Emi, P-H. Iverius, A. Hata, L.L. Wu, E. Hillas, R.R. Williams, J.M. Lalouel. 1990. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J. Clin. Invest.* 86:735-750.
25. McNicoll S., Y. Latour, C. Rondeau, D. Bouthillier, J. Davignon, J. Genest Jr. 1995. Cardiovascular risk factors and lipoprotein profile in French Canadians with premature CAD: impact of the National Cholesterol Education Program II. *Can. J. Cardiol.* 11:109-116.
26. Hobbs H.H., M.S. Brown, J.L. Goldstein. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1:445-466.
27. Expert Panel. 1993. Summary of the Second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). *JAMA* 269:3015-3023.
28. Xhignesse M., S. Lussier-Cacan, C.F. Sing, A.M. Kessling, J. Davignon. 1991. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler. Thromb.* 11:1100-1110.
29. Kessling A., S. Ouelette, O. Bouffard, A. Chamberland, C. Betard, E. Selinger, M. Xhignesse, S. Lussier-Cacan, J. Davignon. 1992. Patterns of association between genetic variability in apolipoprotein (apo) B, apo AI-CIII-AIV, and cholesterol ester transfer protein gene regions and quantitative variation in lipid and lipoprotein traits: influence of gender and exogenous hormones. *Am. J. Hum. Genet.* 50:92-106.
30. Fievet-Desreumaux C., E. Dedender-Decoopman, J-C. Fruchart, P. Dewailly, G. Sezille. 1979. Immunochemical determination of human apolipoprotein B by laser nephelometry. *Clin. Chim. Acta.* 95:405-408.
31. Saiki R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

32. Minnich A., A. Kessling, M. Roy, C. Giry, G. DeLangavant, J. Lavigne, S. Lussier-Cacan, J. Davignon. 1995. Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J. Lipid Res.* 36:117-124.
33. The Lipid Research Clinics. 1980. Population studies Data Book. Vol I: The Prevalence Study. Washington, DC, US Department of Health and Human Services. NIH Publication No. 80-1527.
34. Gagné E., J. Genest Jr, H. Zhang, L.A. Clarke, M.R. Hayden. 1994. Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* 14:1250-1257.
35. Beisiegel U., W. Weber, G. Bengtsson-Olivecrona. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8342-8346.
36. Hussain M.M., F.R. Maxfield, J. Mas-Oliva, I. Tabas, Z-S. Ji, T.L. Innerarity, R.W. Mahley. 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha-2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 266:13936-13940.
37. Young S.G. 1990. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation.* 82:1574-1594.
39. Dashti N., E.A. Smith, P. Alaupovic. 1990. Increased production of apolipoprotein B and its lipoproteins by oleic acid in Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* 31:113-123.
38. Zannis V.I., D. Kardassis, P. Cardot, M. Hadzopoulou-Cladaras, E.E. Zanni, C. Cladaras. 1992. Molecular biology of the human apolipoprotein genes: gene regulation and structure/function relationship. *Curr. Opin. Lipid.* 3:96-113.
40. Sorci-Thomas M., M.D. Wilson, F.L. Johnson, D.L. Williams, L.L. Rudel. 1989. Studies on the expression of genes encoding apolipoproteins B100 and B48 and the low density lipoprotein receptor in non human primates. *J. Biol. Chem.* 264:9039-9045.
41. Davis R.A., J.R. Boogaerts, R.A. Borchardt, M. Malone-McNeal, J. Archambault-Schexnayder. 1985. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Varied synthetic response of individual apolipoprotein to fasting. *J. Biol. Chem.* 260:14137-14144.
42. Bamberger M.J., M.D. Lane. 1988. Assembly of very low density lipoprotein in the hepatocyte. Differential transport of apoproteins through the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 263:11868-11878.
43. Borén J., M. Wettsten, A. Sjöberg, T. Thorlin, G. Bondjers, O. Wiklund, S.O. Olofsson. 1990. The assembly and secretion of ApoB 100 containing lipoproteins in hep G2 cells. Evidence for different sites for protein synthesis and lipoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* 265:10556-10564.

44. Cianflone K.M., Z. Yasruel, M.A. Rodriguez, D. Vas, A.D. Sniderman. 1990. Regulation of apoB secretion from HepG2 cells: evidence for a critical role for cholesteryl ester synthesis in the response to a fatty acid challenge. *J. Lipid Res.* 31:2045-2055.
45. Chait A., J.J. Albers, J.D. Brunzell. 1980. Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 10:17-22.
46. Cortner J.A., P.M. Coates, M.J. Bennett, D.R. Cryer, N.A. Le. 1991. Familial combined hyperlipidaemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very low density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* 14:915-922.
47. Kissebach A.H., S. Alfarsi, P.W. Adams. 1981. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in man: normolipemic subjects, familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 30:856-868.
48. Venkatesan S., P. Cullen, P. Pacy, D. Halliday, J. Scott. 1993. Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* 13:1110-1118.
49. Reaven G.M. 1988. Banting lecture 1988. The role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-1607.
50. Williams R.R., S.C. Hunt, P.N. Hopkins, B.M. Stults, L.L. Wu, S.J. Hasstedt, G.K. Barlow, S.H. Stephenson, J-M. Lalouel, H. Kuida. 1988. Familial dyslipidemic hypertension. Evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 12% of patients with essential hypertension. *JAMA.* 259:3579-3586.
51. Assmann G., H. Schulte. 1992. Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am. J. Cardiol.* 70:733-737.
52. Genest J. Jr, J. Cohn. 1995. Clustering of cardiovascular risk factors: Targeting high risk individuals. *Am. J. Cardiol.* 75:8A-20A.
53. Sniderman A., B.G. Brown, B.F. Stewart, K. Cianflone. 1992. From familial combined hyperlipidemia to hyperapoB: unraveling the overproduction of hepatic apolipoprotein B. *Curr. Opin. Lipidol.* 3:137-142.

54. Innerarity T.L., R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, T.P. Bersot, R.M. Krauss, G.L. Vega, S.M. Grundy, W. Friedl, J. Davignon, B.J. McCarthy. 1990. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 31:1337-1349.
55. Cullen P., B. Farren, J. Scott, M. Farrall. 1994. Complex segregation analysis provides evidence for a major gene acting on serum triglyceride levels in 55 British families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* 14:1233-1249.
56. Nishina P.M., J.P. Johnson, J.K. Naggert, R.M. Krauss. 1992. Linkage of atherogenic lipoprotein phenotype to the low density lipoprotein receptor locus on the short arm of chromosome 19. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:708-712.

Chapitre 4: Article II

Severe Familial HDL Deficiency (FHD) in French Canadian Kindred: Clinical, Biochemical and Molecular Characterization

Michel Marcil^{1,3}, Betsie Boucher¹, Larbi Krimbou¹, B. Charles Solymoss³, Jean Davignon², Jiri Frohlich⁵, Jacques Genest Jr.^{1,3,4}

From the Cardiovascular Genetics Laboratory¹ and the Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group², Clinical Research Institute of Montréal, the Montréal Heart Institute³ and the Cardiology Services⁴, Hôpital Hôtel-Dieu de Montréal, Montréal, Québec, Canada; and the Department of Pathology and Laboratory Medicine⁵, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Supported by a Medical Research Council of Canada scholarship to Dr. J. Genest Jr., MD, by an operating grant from the Medical Research Council of Canada and by the Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Publié: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1015-1024.

Abstract

A decreased level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is the most common lipoprotein abnormality seen in premature CAD subjects. In many cases, HDL-C reduction in CAD subjects may be the result of increased apo B-containing lipoprotein production by the liver with secondary hypoalphalipoproteinemia. Primary hypoalphalipoproteinemia is seen in approximately 4% of CAD cases. We report four subjects with severe familial HDL deficiency (HDL-C << 5th percentile for age and gender, HDL-C 0.08-0.38 mmol/L) in three French Canadian kindred with autosomal co-dominant inheritance. By inclusion criteria, all four subjects had normal fasting triglycerides and none were diabetic. HDL particle size by gradient gel electrophoresis revealed small HDL particles (estimated Stoke's diameter 8.14-8.30 nm). Apolipoprotein AI analysis by PAGE and IEF in affected subjects reveal normal molecular weight (28.3 kd) and normal isoelectrofocusing point but a relative increase in pro-apo AI, with near normal levels of pro-apo AI in plasma; suggesting normal secretion of apo AI. Quantitative Southern blot analysis of the apo AI-CIII-AIV gene cluster reveals no gene rearrangements or allele deletion. Haplotypes of the apo AI gene, using the restriction enzymes PstI, XmnI and SstI; and of the apo AII gene using the enzyme MspI, did not reveal segregation of the low HDL-C trait with either the apo AI or AII genes. Sequence analysis of the promoter region of apo AI gene reveals heterozygosity for an G-->A-76 substitution in two kindred with no evidence of segregation with the low HDL trait. None of the patients had mutations of the lipoprotein lipase gene common in subjects of French Canadian descent. Haplotypes analysis of the LPL gene did not show segregation with the low HDL trait. Plasma lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity was found to be within normal levels in affected subjects and in non-affected first-degree relatives. None of the affected subjects had clinical manifestations of Tangier disease. Two of the four probands examined, both men, had severe CAD and had undergone revascularization procedures. The third is a younger brother of one of these probands, the fourth is a 30-year old woman and both were free of clinical CAD. However, in none of the families the low HDL trait unequivocally cosegregated with CAD. The data reveal that the molecular defect in our patients with severe hypoalphalipoproteinemia is not linked to the apo AI-CIII-AIV gene cluster, LCAT

activity, elevated triglycerides or LPL gene defects. Although CAD was identified in two probands, both had several risk factors for CAD. Although hypercatabolism of HDL particles and apo AI has been shown to occur in such patients, the exact metabolic and molecular defect(s) remain unknown. We hypothesize that an alteration in HDL-mediated cholesterol efflux or in intracellular cholesterol transport to the cell surface may explain the metabolic abnormalities observed.

Introduction

Increased plasma lipids and very low density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL) and low density lipoproteins (LDL) cholesterol levels are associated with the development of coronary artery disease (CAD) in retrospective case-control studies and in prospective, longitudinal studies [reviewed in 1]. Many studies have shown that a decreased level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is the best marker for CAD. Although some controversy exists about which HDL subfraction provides the "optimal" protection, a decrease in the number of HDL particles remains the strongest predictor of risk in many studies [2]. The measurement of HDL-associated apolipoproteins (apo), especially apo AI and AII, has shown little additional predictive value over the measurement HDL-C [3]. The measurement of HDL-cholesterol level is important in the determination of cardiovascular risk [4] and appears to be predictive of future coronary events [5].

In this context, syndromes of HDL deficiency have attracted a great deal of interest over the past ten years mostly because they increase our understanding of the role of HDL in atherogenesis. With the cloning and sequencing of all known apolipoproteins, lipoprotein processing enzymes and lipoprotein receptors, multiple (usually rare) defects of HDL metabolism have been identified. Several mutations of the apo AI gene have been characterized in which apo AI is not produced [6-16], other point mutations alter the protein sequence and are, in general, of little clinical consequence [17-20]. Mutations within the genes coding for lipoprotein lipase (LPL), or its activator apo CII, are associated with severe hypertriglyceridemia and markedly reduced HDL-cholesterol levels [reviewed in 21]. Mutations within the gene coding for the enzyme lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) are associated with corneal opacities, anemia, renal failure and severe HDL deficiency [22-27]. Tangier disease is characterized by extreme

HDL deficiency and increased catabolism of HDL and apo AI; in addition, infiltration of reticuloendothelial tissue and Schwann cells with neutral lipids, is found [28-30]. The genetic or metabolic defects in Tangier disease are still unknown. In contrast to the rarity of defects of HDL metabolism, moderate reductions of HDL-C levels are commonly encountered in patients with premature CAD [31,32].

In the present study, we present four subjects from three kindred with severe HDL deficiency. Our purpose was to examine the known causes of HDL deficiency in each proband, including common causes of a low HDL-cholesterol, mutations at the apo AI-CIII-AIV and lipoprotein lipase gene loci, LCAT deficiency and clinical manifestations of Tangier disease. We also examined the association between the low HDL trait and the presence of premature CAD. We suggest that this syndrome be called "severe familial HDL deficiency". Several groups have reported patients, such as ours, with very low HDL-cholesterol levels and kinetic studies have shown increased catabolism of HDL particles or apo AI [19,20,29,58,60,61,63]. Despite such characterization of lipoprotein kinetics over the past decade or so, the metabolic or genetic abnormalities in such patients have not been identified.

Methods

Subject selection. Patients were selected from the Lipid Clinics of the Montréal Heart Institute and Clinical Research Institute of Montréal. The basis of selection was a HDL-cholesterol level <5th percentile for age- and gender-matched norms [33] with normal fasting triglycerides (<95th percentile). The patients (all adults) were referred to the Clinical Research Institute of Montréal or the Montréal Heart Institute for work-up of lipoprotein disorders. A search of computer databases for actively followed patients was performed with the criteria of low HDL-cholesterol and triglycerides <95th percentile for age and gender, based on the Lipid Research Clinics Database [33].

Lipids and lipoprotein-cholesterol. Blood was drawn by venipuncture in an antecubital vein in ethylenediethylaminetetraacetic acid- (EDTA) containing tubes as an anticoagulant (final concentration 1.2 mg/mL) for the determination of biochemical variables. Plasma was separated by centrifugation (20 min., 4°C, 3000 rpm), multiple one mL aliquots (n=5) were stored at -80°C for future studies. Total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol levels were measured as previously described [34-36],

using the Cobas Mira-S analyzer (Hoffman Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Lipoprotein-cholesterol was determined after ultracentrifugation of plasma as described [37]. HDL-cholesterol was measured after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins [36]; LDL-cholesterol was determined as infranate-cholesterol minus HDL-cholesterol. The laboratory participates and meets the requirements of the Centers for Disease Control cholesterol standardization program.

HDL particle isolation. HDL particles were separated by sequential ultracentrifugation at densities of 1.063 to 1.210 g/mL, adjusted with solid KBr for 22 hours at 50,000 rpm in a Ti 50.3 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), a third centrifugation at $d=1.210$ g/mL was used to wash and concentrate the lipoproteins [37]. HDL particles were also separated by single-step density gradient ultracentrifugation in a SW40 rotor for 24 hours at 38,000 rpm (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) [38]. For the latter step, we overlaid 2 mL of plasma with solutions of decreasing densities (1.210 g/mL, 2 mL; 1.063 g/mL, 3.8 mL; 1.019 g/mL, 3.3 mL; 1.006 g/mL, 1.2 mL) with solid NaBr. The tubes were then punctured through the bottom and the contents gently forced through the top of the tube by injecting a 1.400 g/mL NaBr solution through the bottom of the tube. Optical density at 280 nm was monitored on-line and fractions were separated on a LKB (Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) fraction collector. Each HDL fraction was extensively dialyzed in 0.9% NaCl overnight at 4°C [38]. HDL particle size was performed on non-denaturing 4-30% preformed polyacrylamide gradient gels as described [71]. The Stokes diameter of HDL particles was estimated with the use of the following standards: thyroglobulin (17.0 nm), ferritin (12.2 nm), lactate dehydrogenase (8.1 nm) and albumin (7.1 nm). A large HDL particle has a score of 1 (HDL-1), corresponding to a Stoke's diameter of 12.46 nm, and the smallest HDL particle found with this system was HDL-14 (Stoke's diameter <7.86 nm) [71].

Apolipoproteins AI, B and LpAI. Apo AI was determined by nephelometry [BN-100 nephelometer, Berhing, Germany] using polyclonal antisera directed against apo AI [39]. A similar technique was used for apo B [40], with polyclonal antiserum directed against apo B. Lipoprotein particle LpAI was measured by electroimmunodiffusion (rocket immunoelectrophoresis), using preformed agarose gels with excess anti-apo AI polyclonal antibodies (Sebia Hydragel, Issy-les-Moulineaux, France) as previously described [41, 42].

Polyacrylamide gel electrophoresis. HDL protein was quantified by the Lowry method and approximately 50-100 µg of HDL protein was applied to the gels. We used a 4-16% polyacrylamide gel in addition to straight 6 or 8% gels for the identification of apolipoproteins [43]. On each run, lipoprotein fractions from a normolipidemic control, isolated at the same time and under the same conditions as the patients, were run in parallel.

Isoelectrofocusing gels [IEF] for apo AI. IEF gels were run on delipidated HDL proteins isolated by ultracentrifugation on controls and patients with severe hypoalphalipoproteinemia. We used an IEF gel as previously described [44] and loaded approximately 50-100 µg HDL-protein in each tube. The gels consisted of 7.5% acrylamide, in 8M urea with ampholines pH 4/6 (Bio Rad Laboratories, Mississauga, Ont., Canada). HDL particles were delipidated in acetone:ethanol (1:1) and di-ethyl ether at -20°C. The loading buffer consists of 8M urea and dithiothreitol 10 mM, pH 8.6. The gels were run overnight at 4°C at 250 volts (~2.2 mA/tube) and stained with Coomassie Blue (0.04%) in perchloric acid (3.5%) and destained in 5% acetic acid. They were then photographed and read by densitometry to estimate the relative concentration of pro-apo AI and mature apo AI. To do so, the apo AI bands were scanned and the pro-apo AI band was expressed as a % total apo AI. The concentration of pro-apo AI was then estimated as the % of total apo AI protein (x) total plasma apo AI.

Southern blots, Apo AI gene XmnI, SstI, PstI restriction fragment-length polymorphisms (RFLP). Southern blots were performed on human genomic DNA isolated from peripheral leukocytes as previously described [45]. RFLP's were determined for the apo AI gene with the restriction enzymes XmnI (New England Biolabs, Cambridge, MA) SstI, and PstI (Gibco Bethesda Research Laboratories, Burlington, Ont., Canada). DNA was cut using the recommendations of the manufacturer, separated on 1.0% agarose gels and transferred onto nylon membranes (Hybond N, Amersham, Oakville, Ont., Canada). The nylon filters were hybridized with a full length ³²P-labeled cDNA probe of the apo AI gene at 65°C as described [45]. Labeling of the cDNA probe was performed with the random primer method, using the Klenow polymerase (Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). Molecular weight standards were applied on each gel to determine the

size of the hybridized fragments. The gels were exposed on Kodak XAR-5 film (Kodak Scientific, Oakville, Ont., Canada) and developed after 24 to 72 hours at -80°C.

Polymerase chain reaction (PCR). The apo AI XmnI, SstI and PstI [46] and apo AII MspI RFLP's [47] were determined by PCR and digestion of the amplified products with the appropriate enzymes with subsequent separation of the fragments by agarose electrophoresis. In order to determine haplotypes of the apo AI and apo AII genes, DNA was isolated from probands and all family members available for analysis. The apo AI XmnI, SstI and PstI as well as the apo AII MspI RFLP's were determined as described [46,47]. The presence of a cutting site in one allele was noted as 1, in both allele as 2, and its absence as 0.

The diagnosis of mutations LPL188, LPL207 and LPL250 were performed as described [21]. Haplotypes of the LPL gene were performed by analysis of a polymorphic GT microsatellite flanking the LPL gene, the LPL5GT site, as described [48]. Reactions were run on 6% polyacrylamide gel and the fragments detected by autoradiography.

DNA Sequencing. We performed sequence analysis on the apo AI promoter region, exon 1 and part of intron 1 (-99 to +375) by first amplifying a 475 bp region of the apo AI gene (-99 to +375) and subcloning the fragment obtained by PCR into the pGEM-t vector (Promega, Madison, WI) using T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI) under the conditions suggested by the manufacturer. The sequence of the oligonucleotides used was (5'→3') AGG-ACC-AGT-GAG-CAG-CAA-CA for the forward primer and AGT-GAG-AAA-CCT-GCT-GCC-TCT for the reverse primer. The ligated plasmids were then used to transform the DH5 α strain of E. Coli (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ont., Canada) which lacks the Ampicillin resistance gene. The transformed bacteria were grown on LB agar containing Ampicillin and isopropylthio -D galactoside (IPTG). Colonies which failed to turn blue in the presence of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- -D galactoside (X-Gal) were cultured individually and the plasmid DNA was isolated on Quiagen-100 columns (Quiagen Inc., Chatsworth, CA). The purified plasmid clones were then sequenced with the di-deoxy nucleotide chain termination method, using a T7- or Sp6- dependent DNA polymerase sequencing kit (Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ).

Lecithin:cholesterol:acyl transferase (LCAT) activity was determined in plasma as previously described [25] using an exogenous substrate [24]. The substrate is composed of egg yolk lecithin, unesterified cholesterol and apo AI [24]. Using this assay, LCAT activity of $20 \text{ nmol/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ is > 2 SD below the mean of normal and is used for the phenotypic assessment of heterozygous LCAT deficiency.

Results

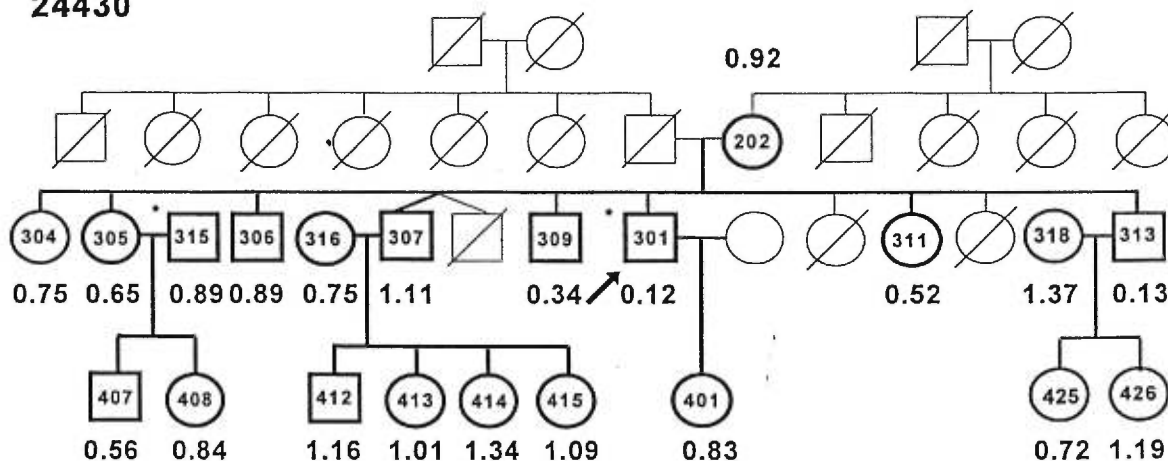
Case 1. 24430-301. The proband is a 48-year old man, father of one daughter. His past medical history is insignificant except for cholestatic jaundice secondary to antibiotic therapy ten years prior to his current evaluation. Liver function tests and bilirubin levels have been consistently within normal limits since this episode. He was diagnosed with coronary artery disease at age 42 and underwent percutaneous transluminal coronary angioplasty of the left anterior descending coronary artery at age 47 for symptoms refractory to medical therapy. One year later, he underwent right femoral angioplasty for stenosis of the common femoral artery. Since then, symptoms of coronary artery disease have progressed, with worsening exertional angina. Repeat coronary angiography revealed a 50% left main coronary artery stenosis and the patient underwent coronary bypass surgery. He was known to have a very low HDL-cholesterol for at least 8 years during routine physical examinations. He was not on medications known to alter plasma lipids, including the drug probucol, at any time. He is a known smoker (one pack per day) and has a history of high blood pressure; his smoking habits have not changed despite medical advice and worsening cardiac symptoms. His medications include aspirin 325 mg every second day and diltiazem SR 90 mg twice per day. On physical examination, the weight is 78.5 Kg, the height 172 cm; the body mass index (BMI, weight (Kg)/height (m^2)) was 26.5. The blood pressure was 150/90 mmHg and the heart rate 70 beats per minute. There are no corneal lipid deposits, no xanthomas (tendinous or plantar), the tonsils are normal in size and color, there is no enlargement of lymphoid tissue and there is no hepatic or splenic enlargement. There are vascular bruits over the femoral arteries. The rest of the examination is within normal limits. A summary of clinical and demographic features is shown in Table I; the family tree is shown in Figure 1.

Case 2. 24430-313. He is the 39-year old brother of the patient described above. He has no significant past medical history and is not known to have cardiovascular disease. The physical examination is within normal limits; there is no clinical evidence of lymphoid tissue infiltration, the tonsils are normal in size and in color and there are no corneal arcus. His BMI is 27. The patient was not taking any medication (Table I, Figure 1). Within this kindred, no other subject was found to have CAD on clinical grounds. All subjects were questioned and examined by a cardiologist (JG Jr). Subject 24430-315 does have significant CAD but is not related to the proband (Figure 2).

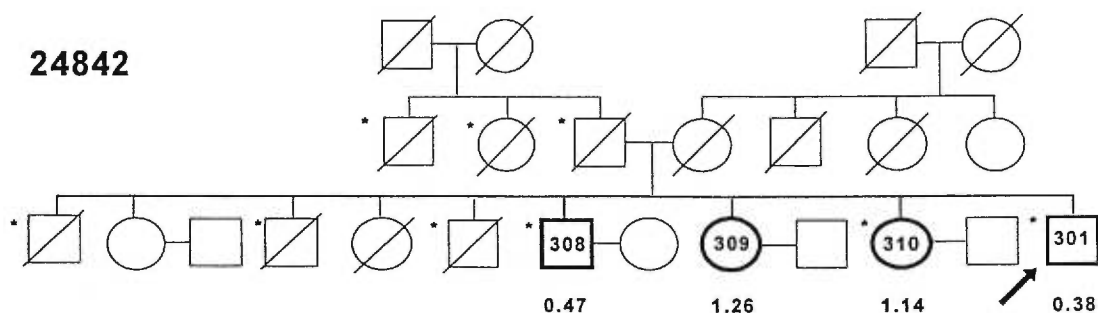
Case 3. 24842-301. The proband is a 53-year old man, slightly overweight, who underwent coronary by-pass surgery 12 years previously at age 41; he has a known history of high blood pressure, cigarette smoking and slightly elevated fasting blood glucose (7.0 mmol/L) although a diagnosis of diabetes was never made. On physical examination, the patient has bilateral corneal arcus but there are no xanthomas or xanthelasmas. The tonsils are normal in size and color, there is no hepatosplenomegaly. The patient has an older brother with established coronary artery disease (Table I, Figure 1). Within this kindred, several members were diagnosed as having CAD (noted by an *). In the subjects examined, no clear association was identified with the presence of CAD and a low HDL-cholesterol. Of interest, the patient has elevated apo B levels (175 mg/dL), triglyceride levels ranging from 1.8 to 4.48 mmol/L, hypertension and abnormal fasting glucose levels. Therefore, this subject has a clustering of cardiovascular risk factors which are often associated with a low HDL-cholesterol.

Case 4. 24723-301. The patient is a 30-year old woman, married and mother of two children. During a routine physical examination, she was found to have a very low HDL-cholesterol and was referred to our clinic. Other than childbearing, there are no significant medical problems. The patient is a non-smoker, does not drink alcohol other than on rare occasions, and does not take any medications (including hormones). The physical examination is within normal limits. The tonsils are slightly enlarged but of normal color and an ear, nose and throat (ENT) consultant thought that the tonsils were at the upper limit of normal in terms of size. Within this kindred, no other member was diagnosed with CAD however the proband's siblings are relatively young and three out of four are women (Table 1, Figure 1).

24430



24842



24723

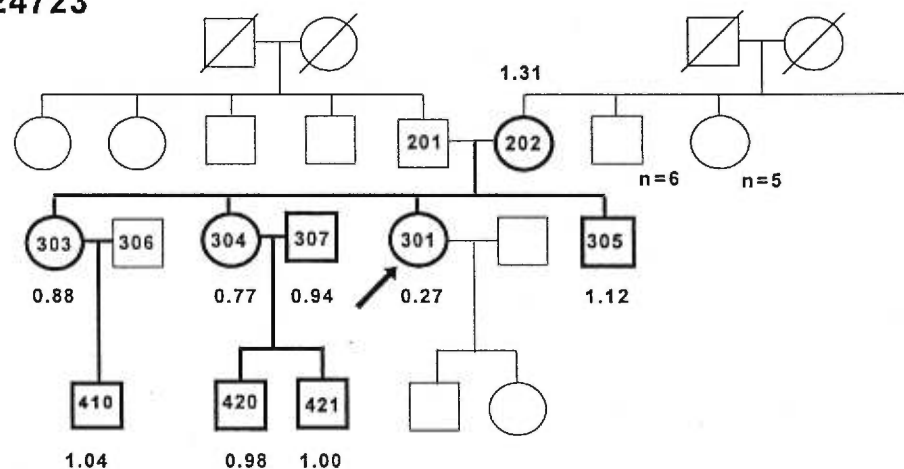


Figure 1. Pedigrees for kindreds 24430 (top), 24842 (middle), and 24723 (bottom) show HDL-cholesterol levels (in mmol/L) below or above the symbols representing family members. Numbers within the symbols (\square for men; \circ for women) relate to their family number; the proband, indicated by a thick arrow, has the suffix 301. Crossed symbols identify a deceased relative, and an asterisk indicates documented premature coronary artery disease. Haplotypes for the apo AI-CIII-AIV gen cluster were determined with the restriction fragment-length polymorphisms identified by use of the enzymes *Xmn* I and *Sst* I (see Table 4).

Table I. Subject Demographics

	Age,y	Sex	CAD	Smoker	HBP	DM
24430-202	81	F	N	N	0	N
24430-301	48	M	Y	Y	1	N
24430-304	57	F	N	N	0	N
24430-305	56	F	N	N	0	N
24430-306	55	M	N	N	0	N
24430-307	53	M	N	N	0	N
24430-309	50	M	N	N	0	N
24430-311	42	F	N	N	0	N
24430-313	39	M	N	N	0	N
24430-315	60	M	Y	Y	0	N
24430-316	48	F	N	N	1	N
24430-318	38	F	N	Y	0	N
24430-401	21	F	N	N	0	N
24430-407	33	M	N	N	0	N
24430-408	30	F	N	N	0	N
24430-412	26	M	N	N	0	N
24430-413	25	F	N	N	0	N
24430-414	24	F	N	N	0	N
24430-415	13	F	N	N	0	N
24430-425	13	F	N	N	0	N
24430-426	8	F	N	N	0	N
24842-301	53	M	Y	N	1	N
24842-308	67	M	Y	Y	1	Y
24842-309	60	F	N	N	1	N
24842-310	56	F	Y	N	2	N
24723-202	62	F	N	N	1	N
24723-301	30	F	N	N	0	N
24723-303	39	F	N	N	0	N
24723-304	38	F	N	N	0	N
24723-305	23	M	N	N	0	N
24723-307	38	M	N	N	2	N
24723-410	13	M	N	N	0	N
24723-420	13	M	N	N	0	N
24723-421	10	M	N	N	0	N

CAD indicates coronary artery disease; smoker, cigarette smoker;; HBP, high blood pressure; DM, diabetes mellitus; 0, absence; 1, presence. Cases are indicated in bold.

The demographic features of the probands and their family members are shown in Table I. By convention, all probands (Table I, bold characters) are identified with the suffix -301, their spouse with the suffix -302 and siblings, by -303; their parents by -200 and their children by -400. Probands 24430-301 and 24842-301 had coronary artery

disease but also had several risk factors for CAD [4], including smoking, hypertension, and the male gender. None of the probands were diabetics but the brother of proband 24842-301, indicated as 24842-308, had non-insulin dependent diabetes mellitus. Case 24430-313, who had an HDL-cholesterol of 0.12 mmol/L (Table II), was clinically free of cardiovascular disease. He was 39 years old, non-smoker, not diabetic or hypertensive. Proband 24723-301 was a 30-year old mother of two with no evidence of CAD.

Lipids and Lipoproteins. The 5th percentile for age and gender were determined according to the Lipid Research Clinics Database [LRC]. All probands had a HDL-cholesterol level << 5th percentile for age and gender. As can be seen (Table II, bold characters), subjects identified as cases 1, 2 and 3 had HDL-cholesterol levels of 0.18, 0.13 and 0.38 mmol/L, respectively while case 4, a woman, had a HDL-cholesterol level of 0.27 mmol/L. Fasting triglyceride levels were <95th percentile in all these subjects. Plasma levels of apo B were within normal limits or only slightly elevated. Apo AI levels were reduced to approximately 20-50% of normal, as were LpAI levels (Table II). A gradient density profile of plasma on probands was performed as described in the Methods section. As shown in Figure 2, the absorbance (at 280 nm) reveals that the cases had a marked reduction in HDL particles, compared with a normal control. Furthermore, the patients also had a reduction of particles in the LDL density range and an accumulation of particles in the intermediate density range. Of note, the apo E phenotype on the subject shown in Figure 2 is apo E3/3; and the patient has no clinical or biochemical evidence of type III dyslipoproteinemia.

HDL particle size was assessed by polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PAGGE) as previously described [71]. The densitometric analysis of the HDL PAGGE reveals that the majority of HDL particles are small (in the range of HDL particles 12-14 [71]). Based on the PAGGE analysis, the "weighted" HDL particle size was 8.30 nm for subject 24430-301, 8.15 nm for 24430-313, 8.14 nm for 24842-301 and 8.16 nm for 24723-301. The majority of HDL particles, were therefore of small size corresponding to a "weighted" Stokes diameter between 8.14 and 8.30 nm (Table III).

Table II. Plasma Lipids and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase

	Total, C mmol/L	TG, mmol/L	HDL-C mmol/L	VLDL-C mmol/L	LDL-C mmol/L	ApoB, mg/dL	ApoAI, mg/dL	LpAI g/L	LCAT mmol/mL·h ⁻¹
24430-202	5.19	1.41	0.84	0.77	3.58	123	116	0.29	26.2
24430-301	3.68	1.48	0.18	0.46	3.04	108	37.2	0.16	19.9
24430-304	5.24	1.58	0.70	0.65	3.89	141	101	0.20	23.3
24430-305	4.75	0.92	0.65	-	3.69	49.2	39.2	0.18	21.1
24430-306	3.90	0.72	0.74	0.45	2.71	92	113	0.29	19.5
24430-307	4.30	1.10	1.02	0.62	2.66	97.4	134	0.32	27.2
24430-309	5.01	4.02	0.40	2.34	2.27	126	65.1	0.21	18.2
24430-311	3.10	1.16	0.54	0.64	1.92	91.7	81	0.22	26.5
24430-313	3.53	2.65	0.13	-	2.21	113	32	0.16	19.2
24430-315	6.03	1.42	0.89	0.76	4.38	153	121	0.34	27.0
24430-316	6.04	2.81	0.75	1.04	4.25	184	119	0.19	27.2
24430-318	5.95	1.40	1.37	0.57	4.01	129	157	0.46	25.1
24430-401	4.58	1.51	0.83	0.64	3.11	123	135	0.40	27.4
24430-407	5.22	1.10	0.56	-	4.05	153	82.4	0.23	27.1
24430-408	3.97	0.73	0.84	-	2.78	86	92.2	0.35	29.0
24430-412	3.66	0.91	1.16	0.42	2.08	78.9	137	0.38	29.7
24430-413	5.06	1.14	1.01	0.32	3.73	132	129	0.30	22.7
24430-414	4.11	0.73	1.34	0.27	2.50	90	145	0.39	29.6
24430-415	2.80	0.83	1.09	0.31	1.40	60.9	137	0.38	32.9
24430-425	2.85	0.59	0.72	0.32	1.81	67.9	82.4	0.19	36.7
24430-426	3.44	0.53	1.19	0.24	2.01	67.6	131	0.24	25.6
24842-301	6.02	1.80	0.38	1.77	3.87	175	66.2	0.31	21.6
24842-308	3.94	3.77	0.47	1.44	2.03	108	91	0.41	20.2
24842-309	5.18	2.06	1.26	0.73	3.19	122	167	0.44	27.7
24842-310	6.08	2.02	1.14	1.09	3.85	142	150	0.42	28.6
24723-202	6.96	2.17	1.31	1.00	4.65	162	155	0.28	26.1
24723-301	4.61	2.61	0.27	1.09	3.25	110	71.2	0.19	36.3
24723-303	4.75	0.69	0.88	0.32	3.55	116	96.5	0.33	32.4
24723-304	5.02	2.18	0.77	1.00	3.25	133	103	0.21	23.2
24723-305	3.98	1.43	1.12	0.66	2.20	98	124	0.28	31.3
24723-307	5.90	3.70	0.94	1.70	3.26	145	150	0.40	27.7
24723-410	4.46	0.96	1.04	0.44	2.98	96	117	0.26	29.7
24723-420	3.83	0.88	0.98	0.40	2.45	88.3	113	0.26	33.6
24723-421	4.60	1.77	1.00	0.81	2.79	109	118	0.21	32.7

C indicates cholesterol; TG, triglycerides; LpAI, lipoprotein containing only apo AI; and LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase. Cases are indicated in bold.

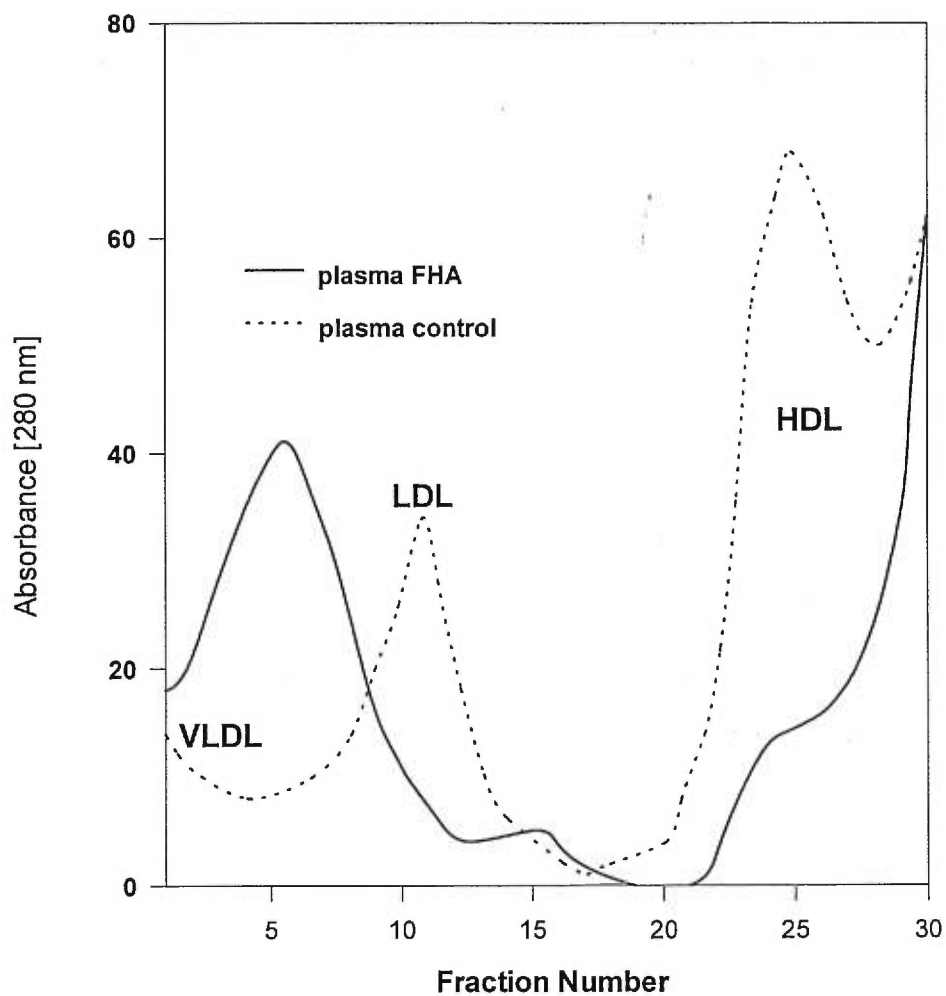


Figure 2. Graph shows gradient density profiles of plasma from case 24430-313 with familial HDL deficiency (FHA; solid line) and a normolipidemic control subject (dashed line). Fraction 1 represents large, buoyant lipoproteins and fractions of more than 28 represent plasma proteins. A marked decrease in HDL particles is noted in the case compared with the control subject.

Table III. Densitometric Analysis of the HDL-Sizing Polyacrylamide Gel Electrophoresis

HDL Band Number	Estimated Stoke's Diameter, nm	Band Area on HDL PAGGE*			
		24430-301	24430-313	24842-301	24723-301
HDL-1	12.46	-	-	-	-
HDL-2	11.74	-	-	-	-
HDL-3	11.25	0.7	-	-	-
HDL-4	10.96	1.8	-	1.8	0.7
HDL-5	10.55	-	-	-	-
HDL-6	10.00	-	0.6	-	1.8
HDL-7	9.57	-	-	-	-
HDL-8	9.24	-	4.7	17.1	-
HDL-9	8.90	18.3	-	-	-
HDL-10	8.73	12.5	-	-	-
HDL-11	8.53	7.6	10.5	-	13.5
HDL-12	8.30	-	29.6	-	35.9
HDL-13	8.14	-	-	-	-
HDL-14	<7.86	59.2	54.7	81	48.0
Mean weighed HDL diameter, nm		8.30	8.15	8.14	8.16

PAGGE indicates polyacrylamide gradient gel electrophoresis; 24430-301, 24430-313, and 24723-301 indicate cases.

Results are calculated on the basis of data from Li *et al.*⁷¹

*Results are reprinted in percent except for mean weighed HDL diameter, which is reported in nanometers.

LCAT activity. LCAT activity determined in the probands and their family members was normal, i.e. > 20 nmol/mL \cdot h⁻¹ except in two probands, 24430-301 with an HDL-cholesterol of 0.18 (range 0.08 to 0.25 mmol/L) and 24430-313 with an HDL-C of 0.13 mmol/L, had an LCAT activity of 19.9 and 19.2 nmol/mL \cdot h⁻¹, respectively and two brothers (24430-306, HDL-C 0.74 mmol/L; and 24430-309, HDL-C 0.40 mmol/L) had LCAT activities of 19.5 and 18.2 nmol/mL \cdot h⁻¹, respectively (Table II).

Apo AI. The molecular weight of apo AI was determined on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). A normal control was always run in parallel with patient's samples and standard molecular weight markers (low molecular weight standards, Bio Rad, Mississauga, Ont., Canada) were loaded in a separate well. The proband's apo AI moved at the same distance as the control and the estimated molecular weight was 28.3 kD.

Isoelectrofocusing of the HDL proteins was performed as described in the Methods section. A relative increase in pro-apo AI was found in all cases. The % concentration of pro-apo AI was 40% for 24430-301, 20% for 24430-313 and 26% for 24723-301. Based on the total apo AI concentration, the estimated concentration of pro-apo AI in

plasma is approximately 14.9 mg/dL, 6.4 mg/dL and 18.5 mg/dL, respectively. These results indicate that the pro-apo AI levels are approximately within the normal range. The mature form of the protein migrated at the same position as that of control subjects (Figure 3). The data show that the molecular weight of apo AI in probands is normal and the charge of the mature protein is also normal. The relative increase in pro-apo AI is similar to that observed in patients with increased catabolism of HDL particles, as seen in Tangier disease or other subjects with severe hypoalphalipoproteinemia of unknown causes.

Molecular genetics. Southern blot analysis of genomic DNA obtained from peripheral lymphocytes was cleaved with the restriction enzymes XmnI, SstI and PstI. These restriction enzymes were chosen in order to identify possible gene rearrangements of the apo AI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23. In all cases, the restriction fragment-length polymorphisms (RFLP) obtained revealed expected fragments. In Cases 1 and 3, the probands were heterozygous for the XmnI RFLP (data not shown); in Cases 2 and 4, the subjects were homozygous for the frequent allele. No major gene rearrangement was found with the use of the RFLPs mentioned above.

Using Southern blot analysis, as well as RFLP data obtained from PCR for the enzymes PstI, SstI and XmnI, segregation analysis was carried out. Results for all kindred are shown in Table IV. It is of interest that the affected brothers in the family 24430 share at most one allele and are heterozygous for the XmnI or SstI RFLP. In addition, none of the haplotypes segregates with the low HDL trait within any of the three families. A similar analysis was performed using the apo AII MspI RFLP. Again, no segregation was shown between the apo AII RFLP and the presence of a low HDL-cholesterol.

Analysis of the allelic variation at the LPL5GT locus [48] revealed 3 alleles varying from 112 to 120 bp in the three families. The genotypes of all family members are presented in Table IV. Four different haplotypes were found in kindred 24430, only 1 haplotype in kindred 24842 and 2 haplotypes in kindred 24723. No allelic association with low HDL-cholesterol appears in the three families.

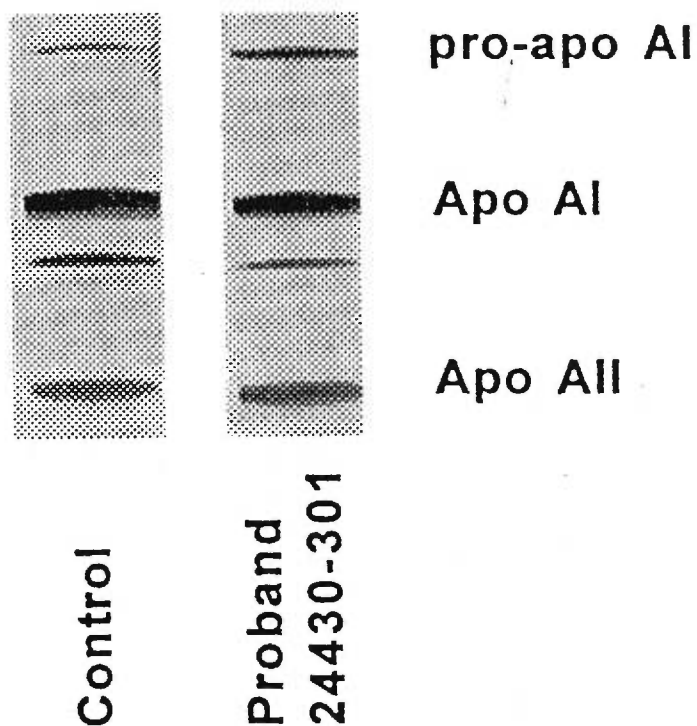


Figure 3. Photograph shows isoelectrofocusing gel of HDL proteins. HDL fraction was obtained after sequential ultracentrifugation of plasma at densities 1.063 and 1.210 g/mL. Approximately 90 $\mu\text{g/mL}$ of HDL protein was loaded onto the polyacrylamide gel in the presence of ampholines (pH 4/6); electrophoresis was carried out as described in "Methods". Note that the proapolipoprotein AI band in proband 24430-301 represents approximately 40% of the total apoAI mass.

Table IV. Segregation Analysis and Genotyping

	Apo AI-CIII-AIV		Apo AII	LPL5GT
	<i>Xmn</i> I	<i>Sst</i> I	<i>Msp</i> I	Alleles, bp
24430-202	1	0	2	114/120
24430-301	1	0	2	112/114
24430-304	1	1	2	112/120
24430-305	1	1	2	112/114
24430-306	0	1	2	112/120
24430-307	0	0	2	112/114
24430-309	1	0	2	112/114
24430-311	0	1	2	112/114
24430-313	0	1	2	112/114
24430-315	0	0	2	112/112
24430-316	0	0	0	112/114
24430-318	0	0	1	112/112
24430-401	1	0	2	112/120
24430-407	1	0	2	112/112
24430-408	1	-	-	112/114
24430-412	0	0	1	114/114
24430-413	0	0	1	112/114
24430-414	0	0	1	112/112
24430-415	0	0	1	114/114
24430-425	0	0	2	112/112
24430-426	0	0	1	112/112
24842-301	1	0	1	112/112
24842-308	0	0	2	112/112
24842-309	0	0	1	112/112
24842-310	0	0	1	112/112
24723-202	0	0	2	112/120
24723-301	0	0	1	112/112
24723-303	0	0	1	112/120
24723-304	0	0	2	112/120
24723-305	1	0	2	112/120
24723-307	0	0	2	112/112
24723-410	0	0	0	112/120
24723-420	0	0	2	112/112
24723-421	0	0	2	112/120

LPL5GT indicates a polymorphic microsatellite containing a guanine (G)-thymine (T) repeat flanking the 5' side of the lipoprotein lipase gene. Segregation analysis was carried out by use of the restriction enzymes *Xmn* I, *Sst* I, and *Msp* I to determine restriction fragment-length polymorphisms for apoAI and apoAII. In genotyping for the LPL5GT alleles, amplified DNA at the LPL5GT locus revealed fragments of 112, 114, and 120 bp in the three kindreds. Cases are indicated in bold

We considered that a mutation within the promoter region of the apo AI gene could cause a decrease in transcriptional activation of the apo AI gene. We sequenced the immediate promoter of the apo AI gene in both alleles in the four probands as described in the Methods section (sequence data not shown). The sequence obtained in our patients was compared to previously published sequences for the apo AI gene [49,50]. We identified a relatively common RFLP of the promoter region with a G→A substitution at position -76 from the transcriptional start site. This substitution has been previously reported and has been associated with hyperalphalipoproteinemia in a group of Italian women [51]. No association with a low HDL-cholesterol was identified in our families.

Discussion

HDL deficiency and CAD. Many studies have shown that HDL-cholesterol is the most frequent lipoprotein abnormality in subjects with premature coronary artery disease and that HDL-cholesterol may be the best discriminator between CAD cases and controls in selected populations [2,3]. In the past decade, considerable progress has been made in understanding HDL metabolism (as reviewed by Eisenberg S. [52] and Karathanasis SK. [53]). There are still unresolved issues concerning the relationship between isolated HDL deficiency and increased risk of CAD. In the three families presented here, a low HDL-cholesterol did not segregate with CAD, although kindred 24723 consisted mostly of relatively young adults, the proband and the siblings in kindred 24842 had CAD, with no clear association with a low HDL-cholesterol; indeed, one sister with CAD had an HDL-C of 1.26 mmol/L. It is noteworthy that proband 24842-301 may have hyperapoB, with multiple metabolic abnormalities, including elevated triglyceride levels (on several occasions), mildly elevated LDL-cholesterol levels, borderline diabetes (elevated fasting glucose level) and high blood pressure in addition to cigarette smoking. Therefore, this patient has multiple risk factors for CAD and the severe hypoalphalipoproteinemia may be, at least in part, secondary to increased hepatic secretion of apo B and triglycerides. This patient, therefore, cannot be considered as having an isolated HDL deficiency.

Rare mutations of the apo AI gene that lead to absent apo AI levels have been described [9,10,12,13,16,73]. Patients with mutations leading to a complete lack of apo AI have been often identified because of the presence of premature CAD. A recently described mutation, apo AIQ32X has recently been characterized in an Italian kindred.

This mutation, AI_{Gln32Stop}, is caused by a single nucleotide substitution in exon 3 of the apo AI gene leading to a stop codon. It does not appear to be associated with CAD in the homozygous proband or in the heterozygous first-degree relatives [73]. Relatively uncommon mutations of apo AI were detected in a large screening program where at least 17 mutations were uncovered [17]. Most were not associated with altered HDL-cholesterol levels but the apo AI_{Milano} and apo AI_{Iowa} mutation results in decreased HDL-cholesterol levels because of increased apo AI turnover rates [18-20].

Mutations affecting the lipoprotein processing enzyme lipoprotein lipase (LPL) or its activator apo CII can cause severe hypertriglyceridemia and marked reductions in HDL-cholesterol levels [21] but are usually not associated with CAD. LPL deficiency in the province of Québec, Canada, are relatively frequent and three mutations, LPL188 (Gly->Glu), LPL207 (Pro->Leu), LPL250(Asp->Asn) account for 97% of cases of LPL deficiency in subjects of French Canadian origin [21]. None of our probands had these LPL mutations. In addition, a highly informative polymorphic GT dinucleotide repeat flanking the LPL gene [48] did not reveal segregation with low HDL-cholesterol levels. As discussed previously, mutations affecting the LCAT gene are also associated with severe HDL deficiency; the relationship with CAD is uncertain.

Tangier disease is a very rare disorder of severe hypoalphalipoproteinemia, characterized by markedly reduced HDL-cholesterol and apo AI levels, reticuloendothelial tissue infiltration by neutral lipids, neurological manifestations secondary to demyelination and, in approximately half of affected subjects, premature coronary artery disease [29].

Initial reports suggested that common genetic polymorphisms of the apo AI gene are associated with alterations in HDL-cholesterol levels but these associations were either population-specific or failed to be confirmed in a large sample size. In addition, RFLP analysis at the apo AI-CIII-AIV gene locus have been found in some studies, but not in others, to be associated with altered lipoprotein cholesterol levels. The strength of this association depends on the study cited but, so far, has been of little clinical significance in predicting lipoprotein cholesterol levels. Similarly, the association between RFLPs at the apo AI-CIII-AIV locus and the presence of coronary artery disease has not been substantiated [reviewed in 54].

Secondary causes of low HDL-cholesterol are thought to be the most common cause of hypoalphalipoproteinemia. The male gender, abdominal obesity, diabetes

mellitus, cigarette smoking and, especially, mild to moderate hypertriglyceridemia or increase in apolipoprotein B-containing lipoprotein particles [4], are associated with decreased HDL-cholesterol levels. An inverse relationship between triglyceride levels and HDL-cholesterol have long been known [3]. Although incompletely elucidated, the mechanism by which elevated triglyceride levels are associated with low HDL-cholesterol levels involves decreased phospholipid and neutral fat transfer onto nascent HDL particles from triglyceride-rich lipoproteins and subsequent enhanced catabolism of HDL particles. Some drugs decrease HDL-cholesterol levels; these include thiazide diuretics, beta-adrenergic blockers and probucol, which is associated with marked reductions in HDL-cholesterol levels. Hospitalization may also be associated with mild, but significant, reductions in HDL-cholesterol levels [55].

We have recently shown that most familial forms of hypoalphalipoproteinemia in subjects with coronary artery disease are associated with complex lipoprotein disorders, including familial combined hyperlipidemia, familial hypertriglyceridemia with reduced HDL-cholesterol; "pure" hypoalphalipoproteinemia is relatively uncommon [56]. In all these familial syndromes, we have noted an increase in apo B levels, suggesting that the primary metabolic lipoprotein abnormality is hepatic over-secretion of apo B-containing particles [57].

Hypoalphalipoproteinemia and HDL catabolism. Metabolic studies carried in subjects with marked reductions in HDL-cholesterol levels have revealed that the catabolism of HDL particles and apo AI are markedly enhanced [58,60-63; reviewed in 72]. In one proband, described by Emmerich et al. [60], the fractional catabolic rate of apo AI endogenously labeled with deuterated leucine was increased tenfold over control subjects. Interestingly, the production rate was also decreased approximately threefold. Evidence from both radiolabeled HDL particles or apo AI or in-vivo labeling with the use of stable isotopes, show that many cases of severe hypoalphalipoproteinemia are associated with increased fractional catabolic rate of apo AI rather than decreased synthetic rate. The clinical characteristics of the patients reported in the aforementioned studies closely resemble the patients presented here. No defects of the apo AI gene were found in these cases of familial hypoalphalipoproteinemia [64]. In conditions of HDL deficiency, as seen clinically, the catabolism of HDL particles is enhanced. Based on kinetic data generated by Schaefer [72], normal plasma HDL or apo AI residency

time in normal individuals is approximately 4.1 to 6.6 days and 3.0 to 4.5 days, respectively [72]. In contrast, HDL from Tangier patients have HDL protein residence time of 0.53 days and apo AI residence time of 0.22 days. Using the same techniques, residence time for apo AI is 2.9 days in type IV hyperlipidemia, 2.45 days in type I and 2.51 days for type V. Several other groups have previously shown increased catabolism of HDL in subjects with hypoalphalipoproteinemia, or in patients with apo AI mutations [58-63].

We hypothesize that the metabolic basis of these disorders may reside in abnormal intracellular cholesterol transfer onto HDL particles at the cell surface. Any defect involving intracellular cholesterol processing [reviewed in 65] could decrease the amount of cholesterol available for desorption at the cell surface. The mechanisms by which HDL particles take up cholesterol from the cell are not fully understood. One postulated mechanism involves the binding of HDL particles to a specific receptor, which would then promote the transfer of cholesterol from intracellular stores to the cell surface [53, 66]. Cholesterol accumulation would be prevented by decreased intracellular synthesis through the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase or the endocytosis of lipoprotein-derived cholesterol via the classical LDL receptor pathway [67]. The resultant HDL particle would be lipid-depleted and presumably catabolized at a faster rate than larger, cholesterol-rich HDL particles. Our four probands had small HDL particles (Table II). Li et al. [71] have determined that the main determinant of HDL particle size was HDL-free cholesterol. This is an important observation; if free cholesterol (and not esterified cholesterol or triglycerides) is the main determinant of HDL particle size, it is possible that decreased cellular cholesterol efflux onto nascent HDL particles lead to the formation of small particles as seen in our patients.

The recently characterized γ LpE lipoprotein particle may offer insight on alternate mechanisms of cellular cholesterol efflux [69]. If an alternate cholesterol efflux system exists, independent of apo AI, it may offer some insight why a low HDL-cholesterol, even to extreme levels, is not associated with widespread arteriosclerosis. These cholesterol efflux mechanisms are still being characterized; their metabolic, cellular and molecular characterization will yield considerable knowledge on the mechanisms of cholesterol efflux and of the cardioprotective effects of HDL particles.

Arteriosclerosis is a complex phenomenon; one must bear in mind that several other mechanisms, including the hemostatic system, endothelial cell function, cellular

signaling and immunological mechanisms, are involved [69]. Although a low HDL-cholesterol has been associated with the development of arteriosclerosis, especially coronary artery disease, it is often in the context of multiple cardiovascular risk factors. It remains to be verified whether individuals with a low HDL-cholesterol, but who are nevertheless able to promote cholesterol efflux via a HDL (or an apo AI) independent pathway, are at lower risk for CAD.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to the Nursing staff of the Lipid Clinics of the Montréal Heart Institute and Clinical Research Institute of Montréal, especially Francine Lemieux RN and Colette Rondeau RN. The technical expertise of Michel Tremblay for the IEF gels, Judith McNamara and Zhengling Li, Boston, for the HDL sizing and Paule Marchand for editorial assistance, is gratefully acknowledged.

References

1. Miller NE. Associations of high density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1987;113:589-597
2. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *New Eng J Med* 1991;325:373-381
3. Genest J Jr, McNamara JR, Salem DN, Ordovas JM, Jenner JL, Millar JS, Silberman SR, Wilson PFW, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol, apolipoproteins A-I and B, and Lipoprotein(a) in men with premature coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992;19:782-802
4. The Expert Panel. Summary of the Second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). *J Am Med Ass* 1993;269:3015-3023
5. Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long term prediction of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and "desirable" levels of plasma total cholesterol. *Circulation* 1992;86:1165-1170
6. Norum RA, Forte TM, Alaupovic P, Ginsberg HN: Clinical Syndrome and Lipid Metabolism in Hereditary Deficiency of Apolipoproteins A-I and C-III, Variant I. *Adv Exp Med Biol* 1986;201:137-149
7. Norum RA, Lakier JB, Goldstein S, Angel A, Goldberg RB, Black WD, Noffze DK, Dolphin PJ, Edelglass J, Borograd DD, Alaupovic P. Familial Deficiency of Apolipoprotein A-I and C-III and Precocious Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 1982;306:1513-1519
8. Schmitz G, Lackner K. High density lipoprotein deficiency with xanthomas: a defect in apo AI synthesis; in Crepaldi et al., *Exerpta Medica*, Amsterdam. *Atherosclerosis VIII*, 1989; pp 399-403
9. Karathanasis SK, Ferris E, Haddad IA. DNA Inversion Within the Apolipoproteins AI/CI/III/AIV - Encoding Gene Cluster of Certain Patients with Premature Atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7198-7202
10. Deeb SS, Cheung MC, Peng R, Wolf AC, Stern R, Albers JJ, Knopp RH. A Mutation in the Human Apolipoprotein A-I Gene. Dominant Effect on the Level and Characteristics of Plasma High Density Lipoproteins. *J Biol Chem* 1991;266:13654-13660
11. Lackner KJ, Dieplinger H, Nowicka G, Schmitz G. High density lipoprotein deficiency with xanthomas. A defect in reverse cholesterol transport caused by a point mutation in the apolipoprotein A-I gene. *J Clin Invest* 1993;92:2262-2273

12. Matsunaga T, Hiasa Y, Yanagi H, Maeda T, Hattori N, Yamakawa K, Yamanouchi Y, Tanaka I, Obara T, Hamaguchi H. Apolipoprotein A-I Deficiency Due to a Codon 84 Nonsense Mutation of the Apolipoprotein A-I Gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2793-2797
13. Ng NS, Leiter LA, Vezina C, Connelle PW, Hegele RA. Apolipoprotein A-I Q[-2]X causing isolated apolipoprotein AI deficiency in a family with analphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1994;93:223-229
14. Schaefer EJ, Heaton WH, Wetzel MG, Brewer HB Jr. Plasma Apolipoprotein A-I Absence Associated with a Marked Reduction of High Density Lipoproteins and Premature Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis* 1982;2:16-26
15. Schaefer EJ, Ordovas JM, Law S, Ghiselli G, Kashyap ML, Srivastava LS, Heaton WH, Albers JJ, Connor WE, Lemeshev Y, Segrest J, Brewer HB Jr. Familial Apolipoprotein A-I and C-III Deficiency, Variant II. *J Lipid Res* 1985;26:1089-1101
16. Ordovas JM, Cassidy DK, Civeira F, Bisgaier CL, Schaefer EJ. Familial Apolipoprotein A-I, C-III and A-IV Deficiency and Premature Atherosclerosis Due to Deletion of a Gene Complex on Chromosome 11. *J Biol Chem* 1989;264:16339-16342
17. Von Eckardstein A, Funke H, Walter M, Altland K, Benninghoven A, Assmann G. Structural Analysis of Human Apolipoprotein A-I Variants. *J Biol Chem* 1990;265:8610-8617
18. Weisgraber KH, Bersot TP, Mahley RW, Francheschini G, Sirtori CR. A-I Milano Apoprotein: Isolation and Characterization of a Cysteine-Containing Variant of the A-I Apoprotein from Human High Density Lipoproteins. *J Clin Invest* 1980;66:901-909
19. Roma P, Gregg RE, Meng MS, Ronan R, Zech LA, Franceschini G, Sirtori CR, Brewer HB. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-IMilano, associated with hypoalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1993;91:1445-1452
20. Rader DJ, Gregg RE, Meng MS, Schaefer JR, Zech LA, Benson MD, Brewer MB Jr. In vivo metabolism of a mutant apolipoprotein apo Allowa, associated with hypoalphalipoproteinemia and systemic amyloidosis. *J Lipid Res* 1992;33:755-763
21. Julien P, Gagne C, Ven Murty MR, Cantin B, Cadelis F, Moorjani S, Lupien P-J. Mutations of the lipoprotein lipase gene as a cause of dyslipidemias in the Quebec population. *Can J Cardiol* 1994;10:54b-60b
22. Carlson LA. Fish-Eye Disease: A New Familial Condition with Massive Corneal Opacities and Dyslipoproteinemia. *Eur J Clin Invest* 1982;12:41-53
23. Carlson LA, Holmquist L. Evidence for Deficiency of High Density Lipoprotein Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity (LCAT) in Fish-Eye Disease. *Acta Med Scand* 1985;218:189-196

24. Frohlich J, McLeod R, Pritchard PH, Fesmire J, McConathy W. Plasma lipoprotein abnormalities in heterozygous for lecithin: cholesterol-acyltransferase deficiency. *Metab Clin Exp* 1988;37:3-8
25. Funke H, Von Eckardstein A, Pritchard PH, Karas M, Albers JJ, Assmann G. A Frameshift Mutation in the Human Apolipoprotein A-I Gene Causes High Density Lipoprotein Deficiency, Partial Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase Deficiency, and Corneal Opacities. *J Clin Invest* 1991;87:371-376
26. Funke H, von Eckardstein A, Pritchard PH, Hornby AE, Wiebusch H, Motti C, Hayden MR, Dacet C, Jacotot B, Gerdes U, Faegeman O, Albers JJ, Colleoni N, Catapano A, Frohlich J, Assmann G. Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *J Clin Invest* 1993;91:677-683
27. Glomset JA, Norum KR, Gjone E. Familial Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, edited by Stanbury, J.B., Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL and Brown MS New York: McGraw-Hill, 1983, p. 643-654
28. Fredrickson DS, Altrocchi PH, Avioli LC. Tangier Disease: Combined Clinical Staff Conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1961;55:1016-1031
29. Serfaty-Lacrosniere C, Civiera F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, Barnard GF, Ordovas JM, Schaefer EJ. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994;107:85-98
30. Schaefer EJ, McNamara JR, Genest J, Ordovas JM. Genetic high density lipoprotein deficiency. In: *High Density lipoproteins, reverse cholesterol transport, and coronary heart disease*, N.E. Miller ed. Excerpta Medica, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989. (Review)
31. Genest J Jr, McNamara JR, Salem DN, Cohn SD, Millar JS, Wilson PFW, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991;67:1185-1189
32. Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, Superko R, Tyroler HA. High-Density lipoprotein Cholesterol and Coronary Heart Disease in Hypercholesterolemic Men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation* 1986;73:1217-1225
33. Lipid Research Clinics Program: manual of laboratory operations, vol. 1: lipid and lipoprotein analysis. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Publication no. 75-628 (NIH) Washington, DC, U.S. Government printing office, 1974, p1-81
34. Allain CB, Poon LS, Chan FCS, Richmond F, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475

35. Sampson EH, Demers LM, Krieg AF. Faster enzymatic procedure for serum triglycerides. *Clin Chem* 1975;21:1983-1985
36. Gidez CI, Miller GJ, Burstein M, Slage S, Eder HA. Separation and quantification of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure. *J Lipid Res* 1982;23:1206-1223
37. Shumaker VN, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 1986;128:155-170
38. Kelley JL, Kruski AW. Density gradient ultracentrifugation of serum lipoproteins in a swinging bucket rotor. *Methods Enzymol* 1986;128:170-181
39. Fievet-Desreumaux GJ, Dedender-Decoopman E, Dewally P, Sezille G, Jaillard J. Immunochemical determination of human apolipoprotein A1 by laser nephelometry. *Clin Chim Acta* 1980;107:145-148
40. Fievet-Desreumaux GJ, Dedender-Decoopman E, Fruchart JC, Dewally P, Sezille G. Immunochemical determination of human apolipoprotein B by laser nephelometry. *Clin Chim Acta* 1980;107:145-148.
41. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, Fourrier JL, Bertrand M, Koren E, Fruchart JC. Apolipoprotein A-I Containing Lipoproteins in Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* 1992;68:35-41
42. Genest J Jr, Bard J-M, Fruchart J-C, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ. Plasma apolipoproteins A-I, A-II, B, E, CIII containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;90:149-157
43. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis. *Method Enzymol* 1986;128:417-431.
44. Warnick GR, Mayfield C, Albers JJ, Hazzard WR. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type III. *Clin Chem* 1979;25:279-284
45. Kessling A, Ouellette S, Bouffard O, Chamberland A, Betard C, Selinger E, Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Davignon J. Patterns of association between genetic variability in apolipoprotein (apo) B, apo AI-CIII-AIV, and cholesterol ester transfer protein gene regions and quantitative variation in lipid and lipoprotein traits: influence of gender and exogenous hormones. *Am J Hum Genet* 1991;50:92-106
46. Shoulders CC, Narcisi TME, Jarmuz A, Brett DJ, Bayliss JD, Scott J. Characterization of genetic markers in the 5' flanking region of the apo AI gene. *Hum Genet* 1993;91:197-198

47. Civiera F, Genest J Jr, Salem DN, Herbert PN, Wilson PWF, Schaefer EJ, Ordovas JM. The MspI restriction fragment-length polymorphism 3' to the apolipoprotein A-II gene: relation with lipoprotein, apolipoproteins and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992;92:165-176
48. Wood S, Schertzer M, Hayden M, Ma Y. Support for a founder effect for two lipoprotein lipase (LPL) gene mutations in French Canadians by analysis of GT microsatellites flanking the LPL gene. *Hum Genet* 1993;91:312-316
49. Karathanasis SK, Zannis VI, Breslow JL. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:6147-6151
50. Makrides SC, Ruiz-Opazo N, Hayden M, Nussbaum AL, Breslow JL, Zannis VI. Sequence and expression of Tangier A-I gene. *Eur J Biochem* 1988;173:465-471
51. Pagani F, Sidoli A, Giudici G A, Barengi L, Vergani C, Baralle FE. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990;31:1371-1377
52. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *L Lipid Res* 1984;25:1017-1058
53. Karathanasis SK. Lipoprotein metabolism: High Density Lipoproteins. In: Lusis AJ, Rotter RS, Sparkes RS (eds): *Molecular genetics of Coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis*. Monogr Hum Genet. Basel, Kruger 1992;14:140-171
54. Marshall HW, Morrison LC, Wu LL, Anderson JL, Corneli PS, Stauffer DM, Allen A, Karagounis LA, Ward RH. Apolipoprotein polymorphisms fail to define risk of coronary artery disease. Results of a prospective, angiographically controlled study. *Circulation* 1994;89:567-577
55. Genest J Jr, McNamara JR, Ordovas JM, Martin-Munley S, Jenner JL, Millar J, Salem DN, Schaefer EJ. Effect of elective hospitalization on plasma lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I, B and Lp(a). *Am J Cardiol* 1990;65:677-680
56. Genest J Jr, Martin S, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Meyers R, Silberman SR, Wilson PWF, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992;85:2025-2033
57. Genest J Jr, Bard J-M, Fruchart J-C, Ordovas JM, Schaefer EJ. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1728-1737.
58. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Increased ApoA-I and ApoA-II Fractional Catabolic Rate in Patients with Low High Density Lipoprotein Cholesterol Levels with or Without Hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991;87:536-544.

59. Cheung MC, Mendez AJ, Wolf AC, Knopp RH. Characterization of apolipoprotein A-I and A-II-containing lipoproteins in a new case of high density lipoprotein deficiency resembling Tangier disease and their effects on intracellular cholesterol efflux. *J Clin Invest* 1993;19:522-529
60. Emmerich J, Verges B, Tauveron I, Rader D, Sammaritano-Fojo S, Schaefer J, Ayrault-Jarrier M, Thieblot P, Brewer B Jr. Familial HDL deficiency due to marked hypercatabolism of normal apo AI. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1299-1306
61. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoproteins A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1993;91:1743-1752
62. Le NA, Ginsberg HN. Heterogeneity of Apolipoprotein A-I Turnover With Reduced Concentrations of Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol. *Metabolism* 1988;37:614-617
63. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Feuerstein I, Zech L, Connor W, Brewer HB Jr. Very low high-density lipoproteins without coronary atherosclerosis. *Lancet* 1993;342:8885
64. Kastelein JJP, Hained JL, Hayden MR. The gene causing familial hypoalphalipoproteinemia is not caused by a defect in the apo AI-CIII-AIV gene cluster in a Spanish Family. *Hum Genet* 1990;84:396-400
65. Liscum L, Dahl NK. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 1992;33:1239-1254
66. Hokland B, Mendez AJ, Oram JF. Cellular localization and characterization of proteins that bind high density lipoprotein. *J Lipid Res* 1992;33:1335-1342
67. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1991;343:425-430
68. Brasaemle DL, Attie AD. Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J Lipid Res.* 1990;31:103-112
69. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assman G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with γ mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1834-1838
70. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis, a multifactorial disease. *Circulation* 1993;87:13-116
71. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer JM. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel method. *J Lipid Res* 1994;35:1698-1711
72. Schaefer EJ, Ordovas JM. Metabolism of apolipoproteins A-I, A-II and A-IV. *Methods Enzymol* 1986;129:420-443

73. Romling R, von Eckardstein A, Funke H, Motti C, Fragiaco GC, Nosedà G, Assmann G. A nonsense mutation in the apolipoprotein A-I gene is associated with high-density lipoprotein deficiency and periorbital xanthelasma. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1915-1922.

Chapitre 5: Article III

Cellular Cholesterol Transport and Efflux in Fibroblasts is Abnormal in Subjects with Familial HDL Deficiency

Michel Marcil^{*§}, Lu Yu^{*}, Larbi Krimbou^{*}, Betsie Boucher^{*}, John F. Oram^{||},
Jeffrey S. Cohn^{*} and Jacques Genest Jr.^{*‡§}

From the Cardiovascular Genetics Laboratory^{*}, Clinical Research Institute of Montreal, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7, the Cardiology Services, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôtel-Dieu Hospital[‡], Montréal, Québec, Canada, H2W 1T8, and the Montreal Heart Institute[§], Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8. And from the Department of Medicine, University of Washington^{||}, Seattle, WA 98195.

Publié: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:159-169.

Abstract

Familial HDL Deficiency (FHD) is an autosomal dominant genetic lipoprotein disorder characterized by a severe decrease in HDL-C level (<5th percentile). Unlike Tangier disease, FHD is transmitted as an autosomal dominant trait. FHD subjects have none of the clinical manifestations of Tangier disease (lymphoid tissue infiltration with cholesteryl esters, neurological manifestations). Plasma from FHD subjects contain pre- β migrating HDL but are deficient in α -migrating HDL. We hypothesized that a reduced HDL-C level in FHD is due to abnormal transport of cellular cholesterol to the plasma membrane resulting in reduced cholesterol (C) efflux onto nascent HDL particles, leading to lipid-depleted HDL particles which are rapidly catabolized. Cellular cholesterol metabolism was investigated in skin fibroblasts from FHD and control subjects. HDL₃- and apoA-I-mediated cellular C and phosphatidyl choline (PC) efflux was examined by labeling cells with ³H-cholesterol and ³H-choline respectively during growth and cholesterol loaded in growth arrest. FHD cells displayed a ~25% reduction in HDL₃-mediated cellular C efflux and a ~50-80% reduction in apoA-I-mediated C and PC efflux compared with normal cells. Cellular cholesterol ester (CE) levels were decreased when cholesterol-labeled cells were incubated with HDL₃ in normal cells, but CE mobilization was significantly reduced in FHD cells. HDL₃ binding to fibroblasts and the possible role of the HDL binding protein (HBP)/vigilin in FHD was also investigated. No differences were observed in ¹²⁵I-HDL₃ binding to LDL-loaded cells between FHD and control cells. HBP/vigilin mRNA levels and its protein expression was constitutively expressed in FHD cells and could be modulated (~2-fold increase) by elevated cellular cholesterol in normal cells. In conclusion FHD is characterized by reduced HDL₃ and apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux. It is not associated with abnormal cellular HDL₃ binding or a defect in a putative HDL binding protein.

Introduction

Coronary artery disease (CAD) is the major cause of death in our society [1] and reduced levels of HDL cholesterol (C) is a major risk factor for this disease [2]. Within a population, a decreased level of HDL-C is the best discriminator between CAD and controls [3,4, 34], and nearly half of CAD cases have a low HDL-C [5]. Our study of familial lipoprotein disorders showed a 4% prevalence of isolated familial hypoalphalipoproteinemia in CAD subjects; this prevalence was similar to that of familial hypercholesterolemia found in 3-5% of premature CAD patients [6].

The main metabolic determinants of reduced HDL-C are still not completely understood. From case-control studies, it appears that a low HDL-cholesterol is often associated with unhealthy lifestyle or other lipid abnormalities and is part of a clustering of cardiovascular risk factors (cigarette smoking, obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, elevated apo B) [7,8]. Secondary causes of low HDL-cholesterol, namely cigarette smoking, the use of thiazide diuretics, β -adrenergic blockers or anabolic steroids, hospitalization, acute stress, trauma or myocardial infarction do not, in our clinical experience, lead to severe HDL deficiency. With the exception of the drug probucol, medication does not account for severe HDL deficiency.

Known causes of severe HDL deficiency have been reviewed recently and include apoA-I gene rearrangements and nonsense mutations [9], some of the apoA-I point mutations (n=22) [10], LCAT deficiency [11], and Tangier disease [12,13]. Severe hypertriglyceridemia caused by lipoprotein lipase (LPL) gene defects, apo CII deficiency (an activator of LPL) or other (yet unknown) factors, is associated with severe reductions of HDL-cholesterol levels [13]. Tangier disease is characterized by very low HDL-cholesterol levels in homozygous subjects, cholesterol ester accumulation in lymphoid tissue, a relative increase in pro-apoA-I in plasma, a marked reduction in plasma apoA-I, and a reduced LDL-cholesterol level. Despite a profound reduction in HDL-cholesterol levels, less than 50% of subjects develop CAD before age 40 [14]. Heterozygous Tangier disease subjects have low normal HDL-C levels but are otherwise normal [13].

We have identified several cases of severe hypoalphalipoproteinemia which are not due to the aforementioned defects. We have studied three families where the low HDL

trait appears to segregate in an autosomal co-dominant mode [15]. None of the probands has fasting hypertriglyceridemia, diabetes, or clinical evidence of Tangier disease. In addition, careful examination of apoA-I does not reveal abnormalities of the gene and protein. The phenotype does not segregate with the LPL gene or LCAT activity. These cases are similar in many respects to the ones reported by Cheung et al. [16] and Rader et al. [17].

Walter *et al.* [18], Francis *et al.* [19], Rogler *et al.* [20] and Ramaley *et al.* [21] have independently shown that skin fibroblasts from subjects with Tangier disease have a marked defect in cellular cholesterol homeostasis and efflux. Biochemical abnormalities in our patients suggest a mild form of Tangier disease (although our patients have none of the clinical manifestations of Tangier disease). We have thus hypothesized that abnormal intracellular cholesterol transport resulting in a reduction in efflux of cholesterol from of our FHD patients could be the underlying physiologic abnormality; thus leading to cholesterol and neutral lipid depleted HDL particles that would be rapidly catabolized [15].

The purpose of this study, therefore, was to examine the mechanisms of cellular cholesterol efflux and intracellular cholesterol homeostasis and transport in skin fibroblasts from subjects with severe HDL deficiency and normal controls. The segregation of the low HDL trait with the HDL binding protein (HBP)/vigilin gene and the regulation of HBP/vigilin at the mRNA and protein levels was also examined.

Material and Methods

Patient Selection. Patients were selected from the Lipid Clinics of the Clinical Research Institute of Montreal and the Montreal Heart Institute. Subjects were selected if they had an HDL-cholesterol level <5th percentile for age and gender, with a plasma concentration of triglycerides <95th percentile [23] and had a first-degree relative with the same lipid abnormality. In addition, the patients did not have diabetes. The apoA-I level was determined by nephelometry and its molecular weight verified by polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PAGGE); the possibility of an abnormal form of apoA-I was ascertained by isoelectrofocusing. Upon fulfilling these criteria, the family of the proband was screened and a skin biopsy was taken in the proband and other affected kindred members for fibroblast culture. The protocol has been reviewed

and accepted by the Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal. All subjects signed separate informed consent for plasma sampling and storage, DNA isolation and storage and skin biopsies. For comparison purposes, we included experiments performed on cells from control subjects, FHD probands and two patients with Tangier disease previously reported [19].

Family Studies. Family members were contacted by a research nurse after having previously been contacted by the proband. After obtaining informed consent, blood was withdrawn in EDTA-containing tubes for plasma lipid, lipoprotein cholesterol, apo A-I and triglyceride analyses, as well as storage at -80°C. Leukocytes were isolated from the buffy coat for DNA extraction. Plasma levels of apoA-I and B are determined by nephelometry as previously described [15], and the apo E phenotype was determined by IEF. The family studies were performed in accordance with the guidelines issued by the Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal.

Lipoproteins Analysis and Characterization. Lipoproteins were isolated by sequential ultracentrifugation or by density gradient ultracentrifugation [23]. Cholesterol [24] (free and esterified), triglycerides [25], and phospholipids [26] were determined on lipoproteins and, in some cases, on a continuous spectrum of plasma lipoprotein particles in density gradient fractions. Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out on 7% straight gels or on 4-22% gradient gels [27]. HDL sizing was performed on preformed polyacrylamide gradient gels as described [28]. Two dimensional gels of plasma lipoproteins were performed; the first dimension consists of an agarose gel 0.75% plasma lipoprotein electrophoresis and the second dimension, a non-denaturing polyacrylamide 3-24% gradient gel [29]. The gel was then transferred onto a nitrocellulose membrane and immunoblotted with ¹²⁵I-labeled anti-human apoA-I antibody.

Cell Culture. Skin fibroblast cultures were established from 3.0 mm punch biopsies of the forearm of FHD patients and healthy control subjects. Primary cultures were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-BRL), supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), 0.1% non-essential amino acids and 20% newborn calf serum (NCS, Gibco-BRL) and maintained at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂) in 25 cm² flasks. After subsequent passages, cells were incubated with DMEM with 10% NCS (DMEM-NCS) in 75 cm² stock flasks for 5-12 passages.

After the cells were cultured under defined experimental conditions, trypsin (0.05%) in 0.53 mM EDTA-Na was used to separate the cells from the flask. Depending on the experiments, 5×10^4 or 5×10^5 cells were seeded in 35 or 100 mm petri dish containing respectively 2 or 10 mL of DMEM-NCS. Fibroblasts from four normal subjects, three FHD subjects (MGA, ABE, JBE) one subject with very low HDL-C level but with associated mild hypertriglyceridemia, mild hyperglycemia and elevated apo B level (GCH), and two subjects with Tangier disease (cell lines TD1 and TD2 as previously described [19]) were used for the experiments.

Cellular Cholesterol Labeling and Loading. Two cellular cholesterol labeling models were used in efflux experiments. We used ^3H -cholesterol (21.8 Ci/mmol, New England Nuclear, Dupont) (0.2 $\mu\text{Ci/mL}$) for efflux experiments where the cholesterol appears predominantly on the plasma membrane [30]. Cells were grown to confluence and ^3H -cholesterol in DMEM with 10% NCS was added for 24 hours. Experiments were carried out after extensive washes in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (PBS-BSA). Because most (>85%) of radiolabeled cholesterol was found associated with the plasma membrane when confluent cells are labeled, to introduce label in subcellular cholesterol pools we labeled the cells as described [31] with slight modification. Briefly, after the cells reached approximately 50-70% confluence (4-5 days), cholesterol labeling was performed with ^3H -cholesterol (0.2 $\mu\text{Ci/mL}$) in DMEM-NCS (during growth phase) for 3 days and loaded with non lipoprotein cholesterol (20 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours in DMEM containing 2 mg/mL BSA without serum (growth arrested phase). The cellular cholesterol pools were then allowed to equilibrate for a further 48 hours in DMEM-BSA. Efflux studies were then carried out using HDL₃ or purified apoA-I at the indicated concentrations.

In some experiments, cells were cholesterol-loaded with cold LDL isolated from normal human plasma. On day 5 after seeding, as the cells reached ~70% confluence, the medium was removed and the cell monolayer was washed 3 times with PBS-BSA then incubated in DMEM supplemented with 5% lipoprotein deficient serum (LPDS) for 48 hours to deplete intracellular cholesterol and up-regulate the LDL-receptor. Cells were then washed 3 times with PBS-BSA and the medium were replaced for: 1], DMEM + BSA (2 mg/mL) 2], DMEM + BSA (2 mg/ml) + LDL (30 μg protein/mL) 3], DMEM + BSA (2 mg/ml) + LDL (30 μg protein/mL) + an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

(ACAT) inhibitor (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sandoz compound 58035). To radiolabel cells by the lysosomal pathway, cells were incubated for 6 hours in DMEM-BSA with ^3H -cholesteryl linoleate-labeled LDL (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as previously described [19].

Preparation of Cholesterol Acceptor Particles. HDL₃ and LDL were freshly prepared from a pool of normolipidemic donors or from plasma obtained from the Canadian Red Cross. Lipoprotein were isolated by standard sequential ultracentrifugation with density (d) adjusted with KBr (HDL₃, $d=1.125\text{-}1.210$ g/mL; LDL, $d=1.019\text{-}1.063$ g/mL). The preparation was extensively dialyzed in PBS (NaCl, 138 mM; KCl, 2.7 mM; NaOH, 51.7 mM; KH₂PO₄, 0.575 mM; EDTA, 0.385 mM; pH 7.4) and stored at 4°C for up to one month. Protein concentration was determined by the method of Lowry. ApoA-I was isolated by gel permeation chromatography as described [32] after isolation from whole blood of total HDL particles by ultracentrifugation. The HDL preparation was delipidated in acetone:ethanol (1:1) and diethyl ether; HDL proteins were then evaporated to dryness under a stream of N₂ and resuspended in 50 mM glycine, 4 mM NaOH, 0.5 M NaCl and 6 M urea (pH 8.8) at the concentration of 20-30 mg/mL. Total proteins were fractionated at 4°C on two Sephacryl S-200 (Pharmacia) columns (2.6 x 100 cm) equilibrated and eluted with the same buffer (45 mL/hr). Fractions contained in the apoA-I peak were extensively dialyzed in 0.01 M NH₄HCO₃, then lyophilized and resuspended in PBS at concentration of 1 mg/mL. Protein purity on each apoA-I fraction were assayed on PAGGE and appropriate fractions pooled, dialyzed in PBS and lyophilized before being stored at -70°C.

Cell Fractionation on Sucrose Density Gradient. Cells were fractionated on a sucrose density gradient as outlined by Lange *et al.* [33]. Linear sucrose density gradients of 12 mL were prepared in 5 mM NaPO₄, pH 7.5, containing 20-54% (w:v) sucrose. Approximately 8×10^6 fibroblasts from two T-175 cm² flasks were homogenized in homogenization buffer (310 mM sucrose, 5 mM NaPO₄, pH 7.5). The homogenates were cleared of cellular debris by centrifugation at 800 x g for 5 min and then loaded onto the sucrose gradient. Ultracentrifugation was carried out at 38 000 rpm in a Beckman SW 40.1 rotor for 16 hours at 3°C. Fractionation of the density gradient was carried out by puncturing the bottom of the tube and filling the tube with a 65% (w:v) sucrose solution at a rate of 1 mL/min; the eluent was passed through a UV detector (280 nm) and collected in equal fractions (0.4-0.5 mL). We used the membrane-

associated enzyme 5' nucleotidase as a marker of plasma membranes. The method used has been previously described [33]. Briefly, aliquots of cell homogenate fraction were incubated in an assay buffer (50 mM glycine, pH 9.0; 0.4 mM MgCl₂ and 0.16 mM 5'-AMP) for 30 min at 37°C. The tubes were then chilled on ice to stop the reaction and solution was adjusted to a final concentration of 37.5 mM ZnSO₄ and Ba(OH)₂ to precipitate the unreacted substrate with 0.25 mM ZnSO₄ and saturated Ba(OH)₂. After centrifugation (10,000 x g, 10 min.), the optical density was read at 260 nm.

Cholesterol Efflux Studies. Efflux studies were carried out on ³H-cholesterol labeled cells from time 0 to 24 hours in the presence of HDL₃ (100 µg/mL protein) or purified apoA-I (10 µg/mL protein). Efflux was determined as % total cholesterol in the medium (³H in medium/³H in medium + ³H in cells after 1N NaOH hydrolysis) after the cells were incubated for specified periods of time. Each experiment was performed in triplicate and each cell line was tested at least three times. Representative results from these experiments are shown in figures 3, 4 and 5.

Phospholipid efflux. Confluent cells were cholesterol loaded for 24 hours and cholesterol pools were allowed to equilibrate for 48 hours. During the last 24 hours of this incubation, medium was replaced by DMEM containing 1 mg/mL BSA and 1 µCi/mL [³H]-choline chloride. The cells were then washed 4 times with PBS/BSA and once in DMEM before the addition of DMEM containing 1 mg/mL BSA and 10 µg/mL apoA-I. After incubation for the indicated times (0-24 hours), cells were chilled on ice, efflux medium was collected and centrifuged to precipitate cell debris. Aliquots were taken for radioactivity counting and extraction in Folch reagent (methanol:chloroform 2:1). Cell layers were rinsed twice with PBS-BSA and proteins were determined after treatment with NaOH (0.1N).

Cellular cholesterol and cholesteryl esters measurement, thin layer chromatography (TLC). Cellular cholesterol was determined after extraction in HIP (hexane:isopropanol 3:2) for 30 min. at room temperature. Lipid extracts were dried under N₂ and resuspended in chloroform, along with cholesterol standards under identical conditions. Cellular cholesterol was determined by the o-phthalaldehyde method [34]. Briefly, o-phthalaldehyde was added (0.5 mg/mL for 10 min.) and concentrated sulfuric acid added to the mix. Absorbance was read at 550 nm within the next 90 min. Cellular lipids

from an aliquot were dissolved in chloroform and separated on TLC plates using hexane:diethyl ether:acetic acid 80:20:1 as a solvent and iodine vapors to detect lipids. Free and esterified cholesterol were used as standards.

Total RNA isolation, Ribonuclease Protection Assay. After the medium was removed, total RNA was isolated from the cell culture dish with a buffered phenol-isothiocyanate reagent (Trizol) (GIBCO BRL) as suggested by the manufacturer. Total RNA was quantified by absorbance at 260 nm. An RNase protection assay [35] was used to examine transcriptional regulation of the genes of interest. Briefly, a 485 bp fragment of the HBP/vigilin gene [36] was subcloned in the pGem3-Z plasmid (pHBP485) that allows the *in vitro* synthesis of sense and anti-sense (asRNA) of predetermined size. The anti-sense probe was radiolabeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP. Total RNA isolated from cell cultures under conditions defined above was hybridized with the antisense probe. The RNA was then digested with RNases A and T1 and the mRNA-asRNA hybrids were protected from digestion. The protected fragments were then separated on a polyacrylamide gel with appropriate molecular weight standards. The gel was subsequently dried and exposed onto photographic film. The films were then scanned and quantified by optical densitometry. We used 18S ribosomal RNA as an internal standard; a 109 bp runoff transcript was derived from pT7RNA 18S template (Ambion, Austin, TX) 80 nucleotides which are complementary to human 18s ribosomal RNA.

Preparation of cRNA probe. The pHBP485 construct was linearized with the restriction enzyme *AccI* to obtain an asRNA (anti-sense RNA) fragment of 290 bp. RNA synthesis was performed using the MAXIscript RNA synthesis kit (Ambion, Austin, TX) as recommended by the manufacturer. Hybridization was set up on the same day as the asRNA probe synthesis. We used 10 μg of total RNA, precipitated with 200,000 cpm asRNA probe for HBP, 20,000 cpm for 18S in 2.5 vol/vol of ethanol. After incubation for 4 minutes at 90°C, the samples were rapidly transferred at 42°C for overnight hybridization. Digestion and Electrophoresis: RNase digestion was performed in 200 μl of digestion buffer (300 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ribonuclease A) (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), 25 U/mL RNase T1 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and incubated for 30 minutes at 37°C. The RNase digestions were terminated by addition of Dx solution (Ambion). Pellets were resuspended in 10 μl of RNA loading buffer (80% formamide). The mixture was heated

for 4 minutes at 90°C and loaded onto denaturing 6% polyacrylamide, 7 M urea sequencing gel. After electrophoresis, the gel was dried for 30 minutes (Gel dryer model 583, Bio-Rad, Mississauga, Ontario) and exposed to X-ray film (Dupont, REFLECTION) overnight. The amounts of mRNA were determined by densitometry (Is-1000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, USA). All bands were normalized to the intensity of the 18S RNA.

HBP/vigilin immunoblot analysis. Cell monolayers from 100 mm culture dishes were harvested with a rubber policeman into 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM benzamidine, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cells were pelleted by centrifugation at 800 x g for 10 min. The cell pellets were lysed in sample buffer (2% SDS, 20 % glycerol). We applied 100 µg of whole cell lysates to a 7% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The separated proteins were transferred to PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Mississauga, Ont). The immunoblot was carried on at room temperature after the membrane was blocked in the Tris buffered saline/Tween (TBS-T) buffer (20 mM Tris pH 7.6, 137 mM NaCl, and 0.2% of Tween-20) containing 5% non fat milk powder overnight at 4°C. Briefly, after washing with TBS-T buffer, the membrane was first incubated with rabbit anti-HBP/vigilin serum (directed against a synthetic 21 mer peptide RQGVLEIAEEYGGVMVSFPR, corresponding to amino acids 819-840 of human HBP/vigilin) in a 1:500 dilution [37]. The membrane was washed and incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit Ig; 1:1000 dilution (Amersham, Canada) for 1 hour at room temperature. The bands were visualized on X-ray film by the chemiluminescence (ECL detection system, Amersham, Canada). The density of the band was determined by densitometry (Is-1000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA).

¹²⁵I-HDL₃ binding studies. HDL was prepared by sequential density ultracentrifugation (d=1.125-1.210 g/mL) from normolipidemic subjects and radiolabeled with ¹²⁵I using the Iodo-Gen method (Pierce, Rockford, IL). Binding studies were performed after growing cells in DMEM with 10% NCS (50,000 cells/dish) in triplicate to 70% confluence. After washing, DMEM with 10% LPDS was added for 48 hours to deplete intracellular cholesterol. The cells were then loaded with 30 µg of LDL protein with or without of ACAT inhibitor (2 µg/ml, Sandoz 58035) for 24 hrs. The cells were washed twice with PBS containing 1 mg /ml of fatty acid free bovine serum albumin (Sigma Chemical),

followed by a 1-hour incubation in the same buffer at 37°C; after two rapid washes with the same buffer, the cells were chilled to 4°C for 15 min. The binding study was carried on 4°C, in DMEM medium containing 5 µg/ml of ¹²⁵I-HDL protein and 2 mg/ml of fatty acid free bovine serum albumin for 2 hours. After extensive washes with PBS containing 2 mg/ml of BSA and PBS alone at 4°C, the cells were dissolved in 0.1 N NaOH, at room temperature and aliquots were assayed for ¹²⁵I radioactivity and protein determination.

Results

Patients and controls. The biochemical characteristics of the four subjects (one woman and three men) with HDL deficiency and the four control subjects are shown in the Table. All patients had a marked reduction in HDL-C level (<5th percentile for age and gender), as previously defined [15]. Specifically, no mutation of the apoA-I gene was

Clinical and Biochemical Characteristics of FHD and Control Subjects

Subjects	Gender	Age,y	CAD	Smoker	HBP	Total Chol mmol/L	TG mmol/L	VLDL*, mmol/L		HDL-C mmol/L
								TG	Chol	
Controls										
JGE	M	36	N	N	N	5.80	2.00	ND	0.91	1.63
SPA	M	35	N	N	N	4.72	1.80	ND	0.82	1.13
MMA	M	32	N	N	N	4.14	0.77	ND	0.35	1.16
JGR	M	32	N	N	N	4.18	0.78	ND	0.36	1.73
FHD										
ABE	M	48	Y	Y	Y	3.68	1.48	1.32	0.46	0.18
JBE	M	39	N	N	N	3.53	2.65	2.49	1.21	0.13
GCH	M	53	Y	Y	Y	6.02	3.63	3.08	1.77	0.38
MGA	F	30	N	N	N	4.61	2.61	1.83	1.09	0.27

"Smoker" refers to cigarette only; HBP, high blood pressure; Chol, cholesterol; TG, triglycerides; and ND, not determined. *Refers to d<1.006 g/mL TGs.

identified, there was no diabetes or severe hypertriglyceridemia and there was no evidence of Tangier disease. They did not have LCAT deficiency (as described in the original report, LCAT activity was low normal). FHD patients described in this report correspond to the probands presented in the study by Marcil M et al. [15]; subject ABE corresponds to 24430-301, his brother, JBE corresponds to 24430-313; subject MGA is 24723-301 and GCH is 24842-301. This latter patient is considered not to have FHD but severe HDL deficiency associated with elevated apo B level and multiple metabolic abnormalities. The four control subjects were all of the same ethnic origin as the FHD

subjects (French Canadian) and were normolipidemic. An additional four control subjects were used in experiments performed with fibroblasts from subjects with Tangier disease as previously described [19]. Patients with FHD had HDL-C levels ranging from 0.13-0.27 mmol/L, which were <<5th percentile for age- and gender-matched subjects. Plasma apoA-I levels were approximately 20-50% of normal [15]. It should be noted that subject JBE is the younger brother of subject ABE. Complete medical examination of these FHD subjects failed to reveal corneal opacities, hepatic or splenic enlargement, orange discoloration of tonsils or evidence of peripheral neuropathy. The proband ABE presented initially with single vessel coronary disease and had to undergo by-pass surgery three years later for progressive CAD that included the left main coronary artery. Patient GCH underwent coronary by-pass surgery at age 41 years. The other two subjects were clinically free of CAD.

HDL in FHD patients. The composition of HDL particles in FHD patients was analyzed by sucrose gradient ultracentrifugation of plasma. Figure 1 shows the results of composition analysis for one patient and one control subject. The HDL fraction is characterized by a marked depletion of phospholipids, cholesterol (not shown) and cholesteryl esters and a ~50% reduction in HDL proteins. Interestingly, the triglyceride-rich lipoprotein (TRL) fraction representing intermediate-sized lipoproteins was increased in FHD subjects reflecting an increase in plasma triglycerides and suggesting that the metabolic defect in FHD alters TRL metabolism. ApoA-I-containing lipoproteins were examined by two-dimensional gel electrophoresis whereby lipoproteins were separated in the first dimension by charge and in the second dimension by size. Gels were transferred onto nylon membranes and immunoblotted with anti-apoA-I. Figure 2 shows the results from the four patients and a representative control subject. ApoA-I-containing particles in FHD patients are characterized by the presence of pre β -1 and pre β -2 particles and a marked absence of α -migrating apoA-I particles.

Cellular Cholesterol Efflux. We first examined HDL₃- and apoA-I -mediated cholesterol efflux in fibroblasts labeled with ³H-cholesterol during growth and cholesterol-loaded in growth arrest (see Material and Methods). In three of the four FHD patients tested, HDL₃-mediated efflux was significantly ($p<0.01$) decreased compared with control cells by approximately 25-30% (Figure 3). In separate sets of experiments, we measured

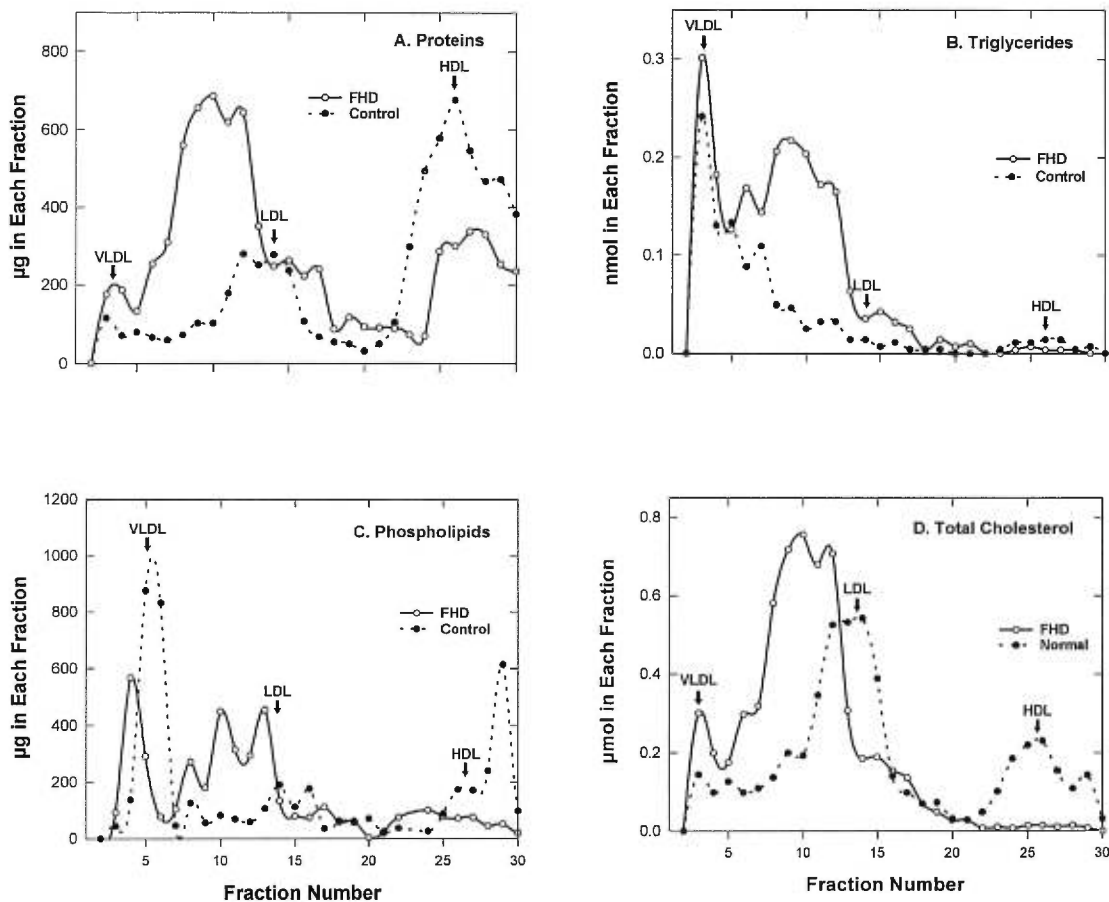


Figure 1. Separation of plasma lipoproteins by density gradient ultracentrifugation from an FHD patient and a control subject. Proteins, triglycerides, phospholipids and total cholesterol were measured in individual fractions as depicted in panels A, B, C, and D respectively.

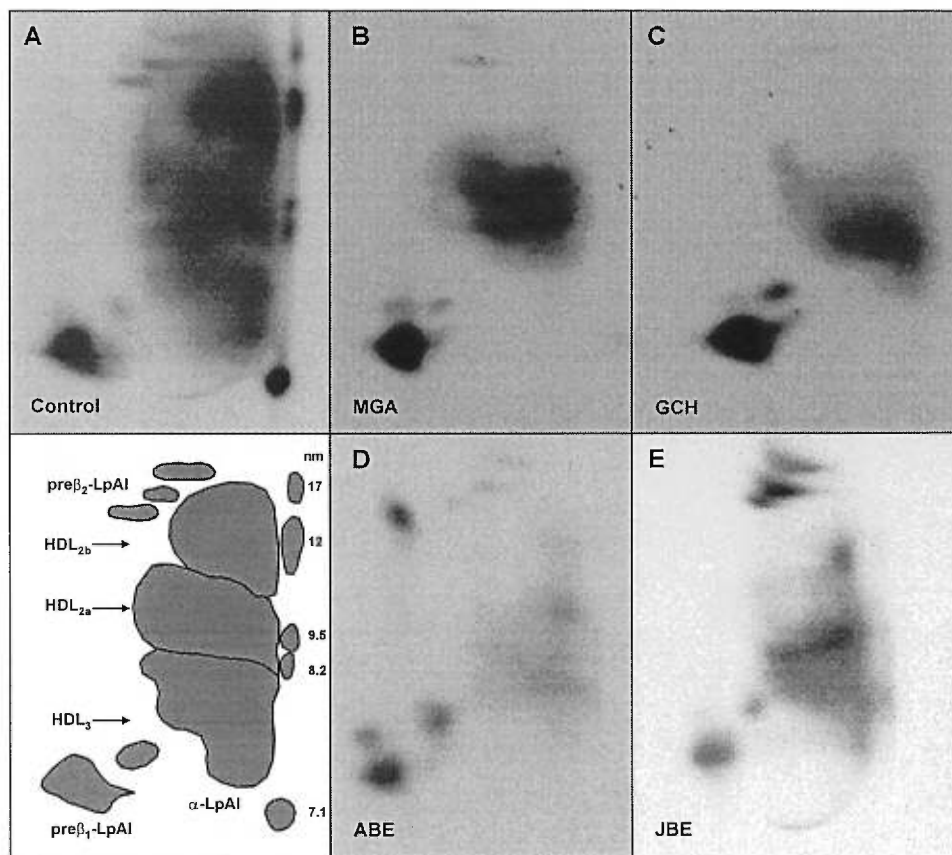


Figure 2. Two-dimensional gel electrophoretic separation of apoA-I-containing lipoproteins from a control subject and the four patients with HDL deficiency (MGA, GCH, ABE and JBE). HDL-cholesterol values for these subjects are given in the Table. The first dimension consists of an agarose gel electrophoresis of plasma lipoproteins. The second dimension is a non-denaturing polyacrylamide (2-15%) gradient gel [27] transferred onto a nitrocellulose membrane and immunodetected with a polyclonal [125 I]-apoA-I antibody. The different subpopulations of apoA-I-containing HDL are shown in the diagrammatic representation of the normal control subject. The molecular size, is shown in nm.

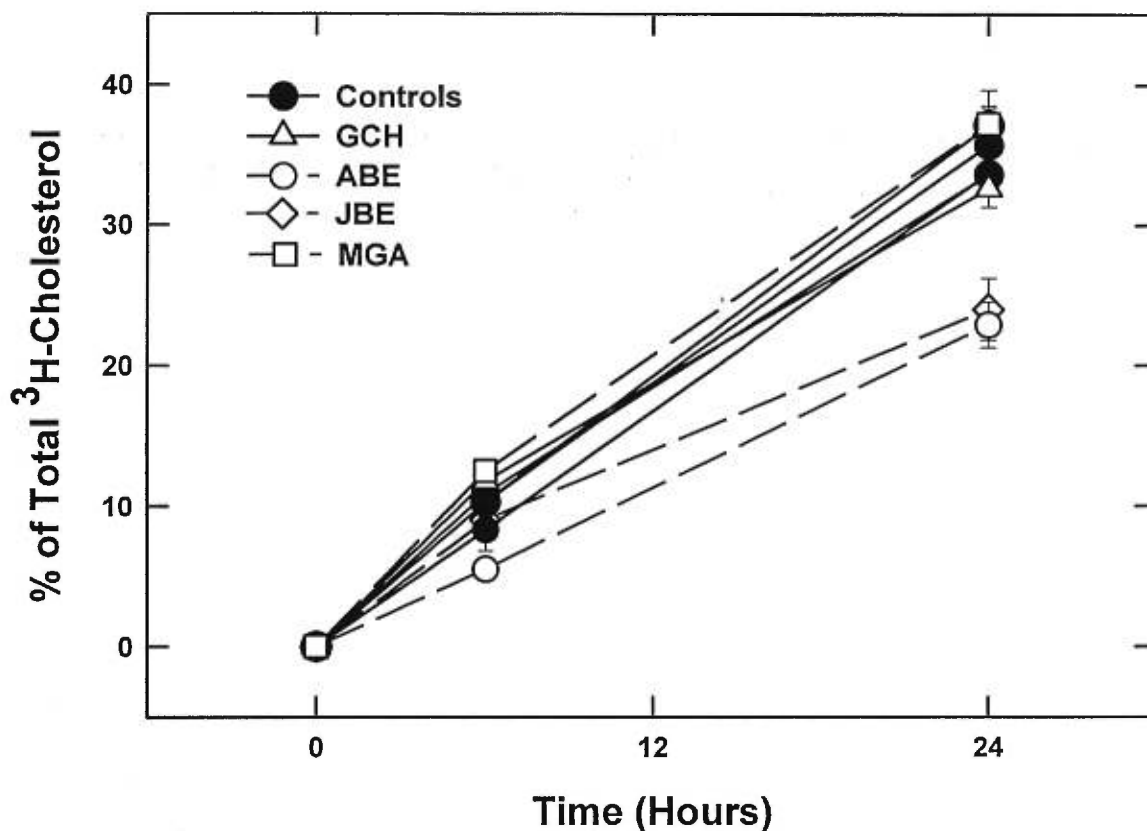


Figure 3. HDL₃ (100 µg/mL)-mediated cholesterol efflux in fibroblasts from control subjects (●) compared with that in subjects with FHD (open symbols). Cells were labeled with ³H-cholesterol (24 hours) during growth and loaded with cold cholesterol (20 µg/mL for 24 hours) during growth arrest. Cells were incubated in the presence of HDL₃ (100 µg/mL HDL₃ protein) for the indicated periods of time. The medium was collected for ³H-cholesterol determination. Results of experiments performed in triplicate are shown.

apoA-I-mediated (10 µg/mL) cholesterol efflux from FHD and normal cells that were either radiolabeled with ³H-cholesterol and loaded with cholesterol (Figure 4A) or were depleted of cholesterol and then loaded with LDL-derived ³H-cholesteryl linoleate (Figure 4B). For comparison purposes, similar experiments were performed with fibroblasts from two subjects with Tangier disease (as previously described in Francis G. *et al.* [19]). Efflux at 24 hours in the cholesterol labeled/cholesterol loaded model is markedly reduced in FHD cells with the exception of cells from subject GCH. When cholesterol depleted cells were labeled with LDL derived ³H-cholesterol, a similar defect in efflux was noted for FHD patients JBE and MGA but not for GCH. In these sets of experiments, subject ABE was not tested.

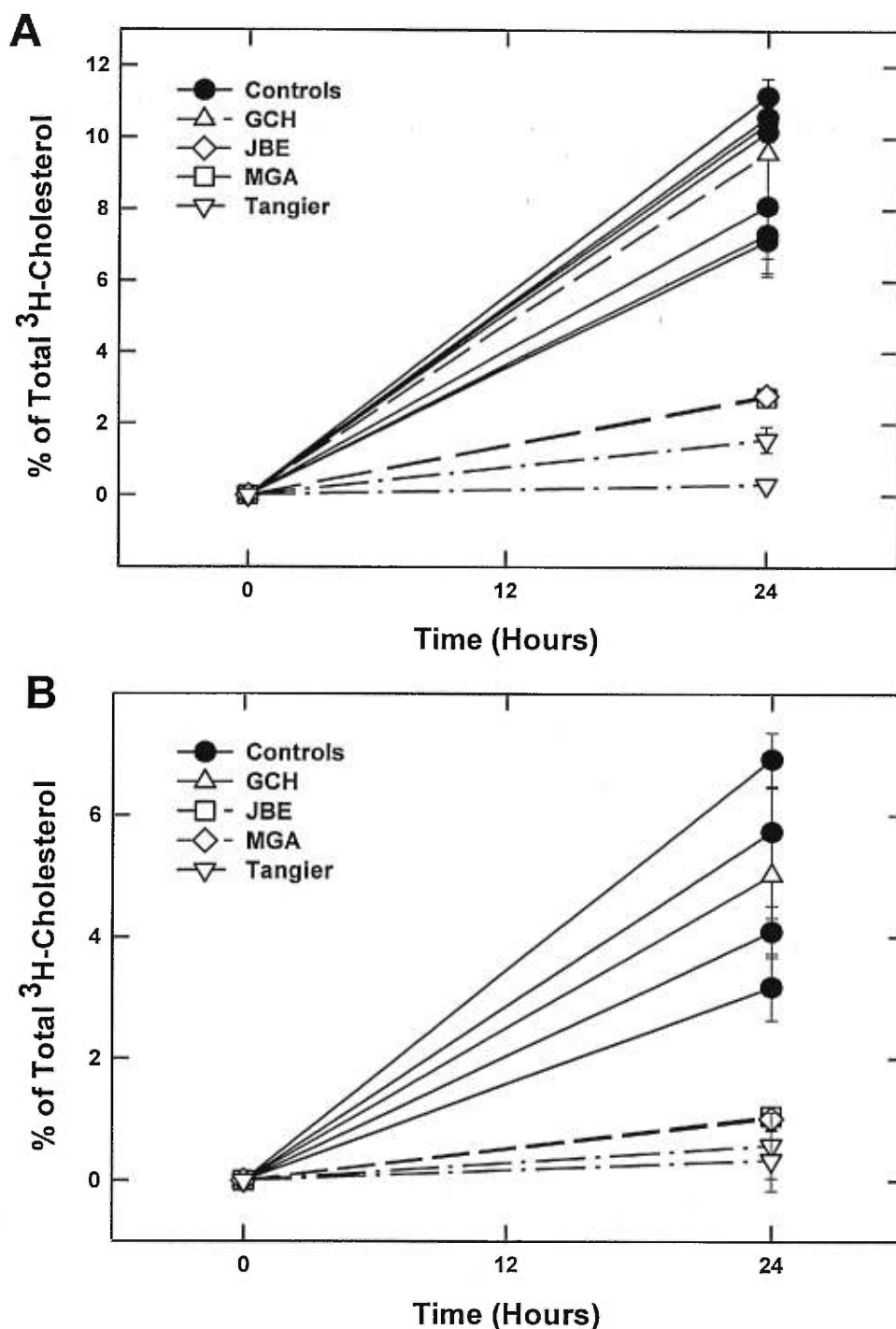


Figure 4. ApoA-I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein)-mediated cellular cholesterol efflux in individual cell lines. For comparison purposes, similar experiments were performed in cells from 2 subjects with Tangier disease as well as control subjects as previously reported [19]. A, efflux experiments were carried in conditions similar to those in Figure 3, except that cells were radiolabeled for 3 days and cholesterol loaded with cholesterol (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 hours. B, apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in fibroblasts labeled with LDL ^{14}C -cholesteryl oleate as described in Methods.

In one subject (GCH), no difference from normal was seen in either HDL₃- or apoA-I-mediated efflux (Figures 3 and 4). As previously hypothesized in the original description of FHD [15], this patient has elevated apo B, a slightly raised fasting glucose level (6.9 mmol/L), abdominal obesity and mild hypertriglyceridemia. These features are consistent with the plurimetabolic syndrome of peripheral insulin resistance, obesity and dyslipidemia [38]. Thus, the syndrome of severe hypoalphalipoproteinemia is heterogeneous and may be associated, in some instances, with increased apo B levels in plasma, as previously reported [8], and apparently normal apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux.

Passive desorption of membrane cholesterol (Figure 5). When the cells were labeled with ³H-cholesterol at confluence, the rate of HDL₃-mediated ³H-cholesterol efflux the rate of efflux over a 24-hour period was linear and there was no difference between normal and FHD cells, suggesting that plasma membrane associated cholesterol passively desorbs onto acceptor particles in a time- dependent fashion and that this process is normal in FHD cells. A significant proportion of ³H-cholesterol (>85%) was found associated with the plasma membrane fraction on sucrose gradient ultracentrifugation using exogenous cholesterol labeling at confluence (figure 5) than when the cells are ³H-cholesterol labeled in growth and cholesterol in growth arrest [19, 45] (data not shown).

Cholesteryl ester mobilization. We assessed the effects of HDL₃ on cellular cholesteryl ester mobilization; we examined ³H-cholesteryl ester content of cells labeled with ³H-cholesterol during growth and cholesterol-loaded cells in the growth-arrested state. After incubating the ³H-cholesterol labeled cells for the indicated periods of time, cellular lipids were extracted in HIP and separated by TLC; cellular proteins were then dissolved in 0.1N NaOH. In cells from control subjects, there was a marked decrease in ³H-cholesteryl esters, showing that HDL₃ has the ability to mobilize cholesteryl esters for eventual translocation to the plasma membrane and efflux. In contrast, FDH cells showed little mobilization of ³H-cholesteryl esters in response to HDL₃ (Figure 6). Subject GCH had decreased CE mobilization compared with control cells but not to the same extent as FHD subjects.

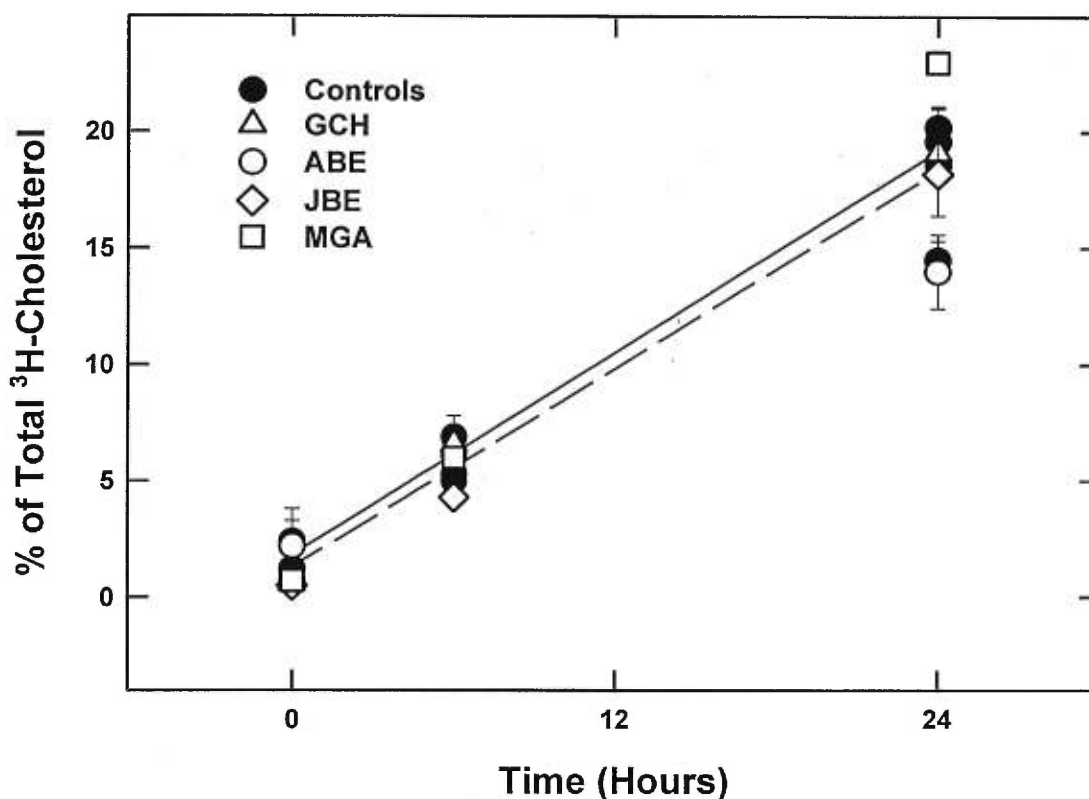


Figure 5. Cholesterol efflux of plasma membrane-associated cholesterol. Cells were labeled with ^3H -cholesterol for 24 hours at confluence. Efflux studies were carried out for 0 to 24 hours in the presence of HDL_3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein). Efflux was determined as cpm in the medium after the cells were incubated for the specified amounts of time.

We examined phospholipid (PL) efflux after radiolabeling cellular phospholipids with ^3H -choline. As shown in Figure 7, there was a marked, significant ($p < 0.01$) decrease in the rate of apoA-I stimulated phosphatidylcholine efflux in FHD cells compared with controls. Because of the variability in the phosphatidyl choline efflux, data was normalized with respect to control subjects in each experiments.

HDL₃ Binding to Fibroblasts from Normal and FHD Subjects. Previous studies of apolipoprotein-fibroblast interaction in Tangier disease has suggested that there might be an abnormality of binding of HDL apolipoproteins to the plasma membrane [19]. In the present study, we used the same binding assay described previously [19], except that ^{125}I -HDL was the ligand instead of ^{125}I -apoA-I. We chose a temperature of 4°C in order to avoid potential incorporation of the lipoprotein by receptor-mediated uptake. ^{125}I -HDL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ medium) binding activities of fibroblasts at 4°C were measured at

approximately 20-40 ng HDL₃ /mg cell protein and there were no significant differences between control and FHD cells (Figure 8).

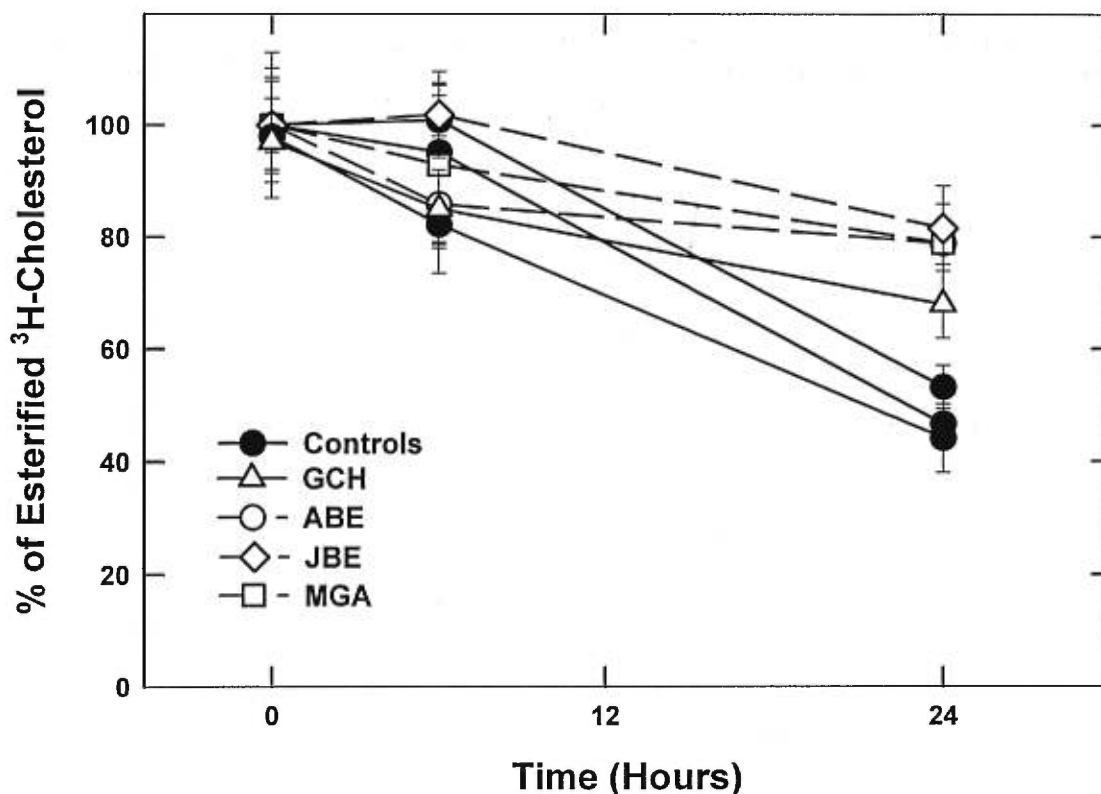


Figure 6. Intracellular cholesteryl ester pools during HDL₃-mediated cholesterol efflux in fibroblasts. Cell culture conditions were identical to those used for the experiments in Figure 3. After cells were incubated in the presence of HDL₃, cholesteryl ester stores decreased in normal cells (●), but this effect markedly reduced in subjects with FHD (open symbols). The results are expressed as percent of values at t=0 hours.

Cellular total cholesterol measurement in fibroblasts. We ascertained cellular cholesterol concentrations in control and FHD cells as well as the relative concentration of free cholesterol and cholesteryl esters. Fibroblasts from control and from FHD subjects had similar cellular cholesterol concentration at baseline, approximately 44-46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein (in the presence of normal calf serum), or approximately 80-84 μg cholesterol/mg cell protein after loading with LDL-derived cholesterol, with or without the ACAT inhibitor 58035 (Sandoz). In the presence of the ACAT inhibitor, there is no formation of cholesteryl esters in cholesterol loaded cells as assessed by TLC (data not shown). There were no significant differences in cellular cholesterol concentrations in

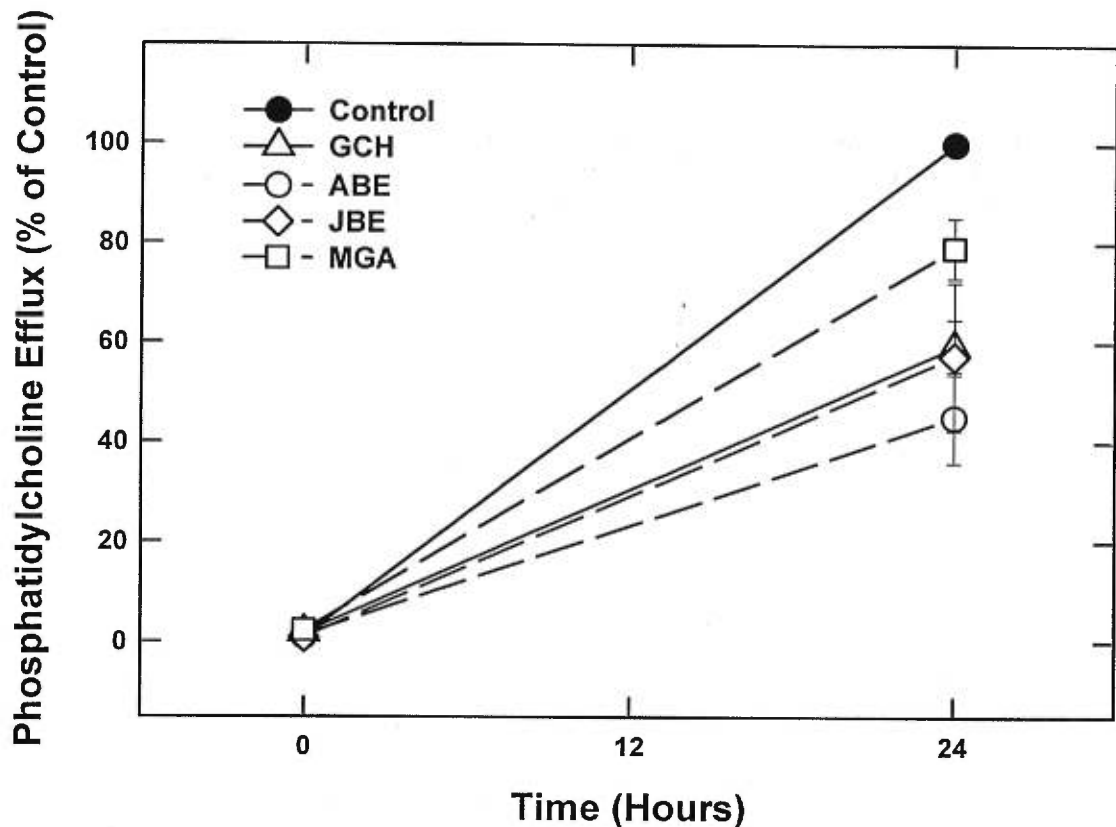


Figure 7. ApoA-I-mediated phospholipid (PL) efflux determined after incubating cholesterol-loaded fibroblasts with ^3H -choline. The efflux of phosphatidylcholine (PC) in FHD cells was $\approx 50\%$ in FHD subjects (open symbols) compared with control subjects (●). Because of interexperiment variability in phospholipid efflux, each experiment was performed with at least 1 control subject, 1 FHD subject (ABE, JBE, MGA), and 1 unrelated patient with low HDL-C (GCH). The results are expressed as % PC from control subjects at the 24 hour time point.

control cells compared with FHD cells, with or without cholesterol loading. This suggests that, compared with control cells, there is no acute accumulation of cholesterol in FHD cells. Furthermore, the proportion of free and esterified cellular cholesterol was nearly identical in FHD and control cells.

Regulation of HBP/vigilin mRNA Expression by Cholesterol Loading of Fibroblasts. HDL binding protein (HPB, also called vigilin [39]) is an ubiquitous protein that binds HDL on ligand blots and is induced by cholesterol and steroid hormones [40]. To test the possible involvement of abnormal expression of HPB/vigilin in FHD cells, we measured levels of HBP/vigilin mRNA by RNase protection assay in fibroblasts from three control and FHD subjects. As shown in Figure 9, the HBP/vigilin gene is constitutively

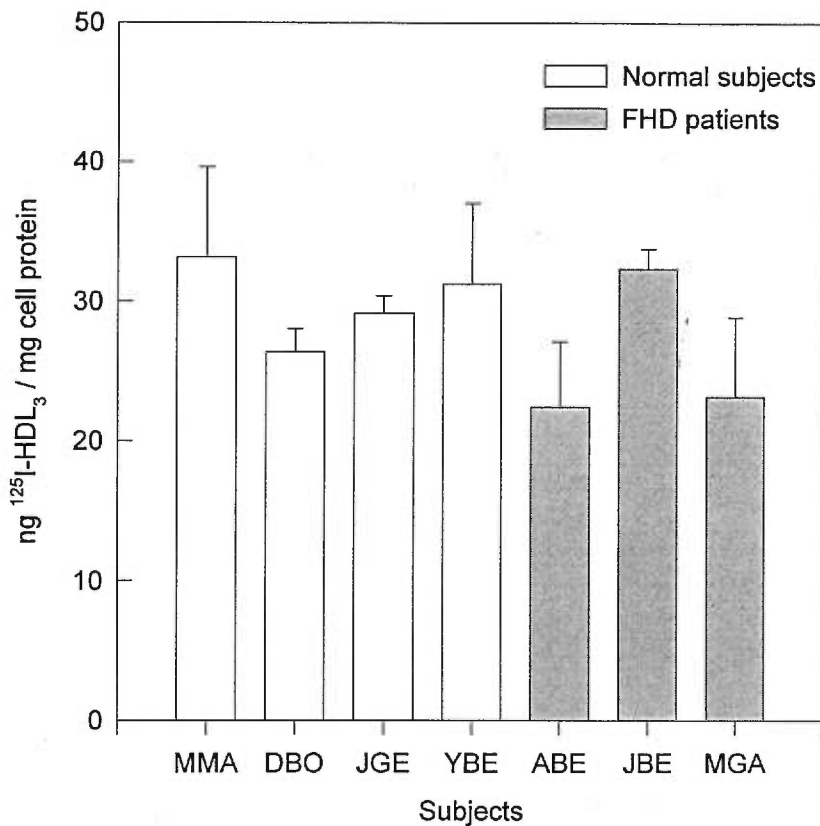


Figure 8. ¹²⁵I-HDL (5 μg/mL) binding to cholesterol loaded fibroblasts. Cells were grown in DMEM with 5% lipoprotein deficient serum for 24 h and then in the presence of LDL (30 μg/mL). Experiments were carried in triplicate at 4°C for 2 hours.

expressed in cholesterol-depleted cells in normal and FHD cells, but to a higher extent in FHD cells. When cells were incubated with LDL (30 μg/mL) for 24 to 48 hours, HBP/vigilin mRNA levels increased by 48 hours in normal cells. When an ACAT inhibitor was added to prevent re-esterification of LDL-derived cholesterol, increased mRNA levels in normal cells was observed at 24 hours. These conditions did not increase mRNA levels to the same extent in FHD cells, perhaps because of the high constitutive expression. (Figure 9). HBP/vigilin expression in fibroblasts was also examined by immunoblot analysis. Two bands were revealed on the immunoblot at 110 and 130 kDa as previously shown [40]. In control fibroblasts, expression of the 110 and 130 kDa protein bands was constitutive and did not appear to be significantly modulated by increased cellular cholesterol (even in the presence of the ACAT inhibitor). In the FHD fibroblasts the response to increased cellular cholesterol concentrations was similar to control cells and no further increase was found in the presence of ACAT inhibitor (Figure

10). Thus, in contrast to mRNA levels, we were unable to detect significant changes in protein expression with cholesterol loading.

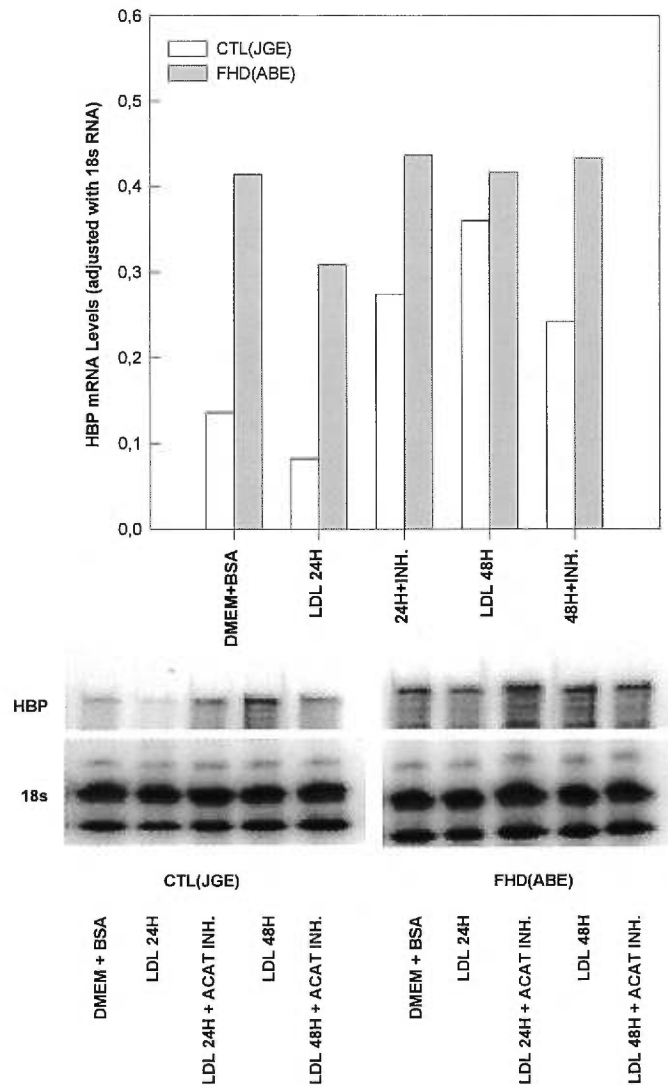


Figure 9. HBP mRNA levels determined by RNase protection assay (lower panel) and densitometric analysis of the scanned data, after adjustment for 18S RNA (upper panel). Skin fibroblasts were grown in the conditions described in the Methods: DMEM; LDL, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ medium; and LDL + ACAT INH., LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ medium + ACAT inhibitor Sandoz 58-035, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ medium. Each analysis was performed with 1 control subject (open bars) and 1 FHD subject (hatched bars). Similar results were found for subjects ABE, JBE, and MGA.

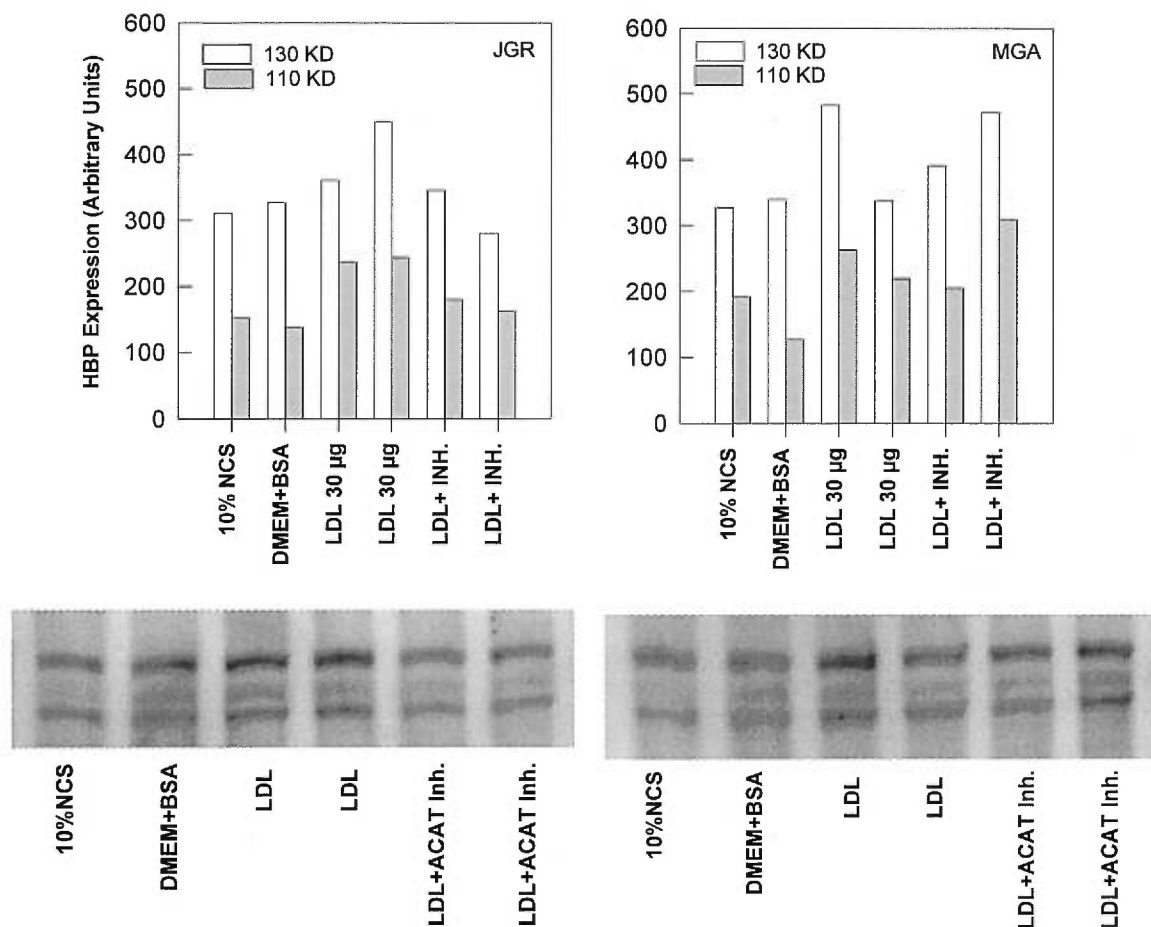


Figure 10. Immunoblot analysis of HBP in fibroblasts (lower panel) and densitometric scan of the protein bands selected by chemiluminescence (top panel). Left, control (CTL) subject; right, FHD subject. Cells were under the conditions shown in the figure: NCS; DMEM+BSA; LDL, 30 µg/mL medium; and LDL+INH, LDL 30µg/mL medium+ACAT inhibitor Sandoz 58-035, 2 µg/mL medium. Two bands of relative molecular weight 130 and 110 kDa are identified.

HBP/vigilin gene haplotype analysis. Southern blots analysis were performed after digestion of genomic DNA with the enzymes PstI, EcoRI, XmnI, SstI, XbaI and HindIII and transfer onto nylon membranes and hybridization with the HBP/vigilin cDNA. No rearrangements of the HBP/vigilin gene was identified and no restriction fragment-length polymorphisms were identified with these six enzymes (data not shown). Haplotype analysis at the 2q37 locus were performed in the three kindred. We used the D2S395 polymorphic marker obtained from the Généton map [41] that is located at 2q37, the locus of HBP [42]. Genetic variability at the D2S395 marker consists of a dinucleotide repeat with multiple alleles ranging in size from 144 to 166 bp [41]. There was no

segregation of the low HDL trait with the HBP gene locus (data not shown). We have previously reported that FHD did not segregate with apo AI, AII and lipoprotein lipase gene polymorphisms [15].

Discussion

Familial HDL Deficiency is a disorder of lipoprotein metabolism characterized by markedly decreased HDL-C levels, reduced apoA-I levels (30-50% of normal), relative increase in pro-apoA-I, a co-dominant mode of inheritance, and absence of known causes of severe HDL deficiency (LCAT deficiency, apoA-I gene defects, severe hypertriglyceridemia and Tangier disease). In the present study, we have found a decrease in HDL₃- or apoA-I-mediated cellular cholesterol efflux in fibroblasts from patients with FHD. Furthermore, compared with control cells, HDL₃-mediated cellular cholesteryl ester mobilization was abnormal in FHD cells. Although the cellular and genetic defects in FHD are unknown, the cellular phenotype of reduced cholesterol efflux closely resembles that observed in cells from patients with Tangier disease, [18-21]. In Tangier cells apoA-I-mediated cholesterol efflux is nearly abolished whereas in FHD cells, a decrease in ~60% was observed. This is consistent with our previous view that FHD and Tangier disease may be part of a novel type of lipoprotein disorders caused by abnormal intracellular cholesterol transport [15]. Using stable isotope kinetic studies, we have recently shown that in two FHD subjects, ABE and JBE, apo AI containing HDL particles are rapidly catabolized, compared with normal subjects. Pro-apoA-I, however was not catabolized faster in FHD subjects, compared with controls [43]. This datum suggests that once entering the plasma pool, apo A-I containing lipoproteins are unable to obtain cellular phospholipids and cholesterol and these particles are predominantly pre- β migrating and rapidly cleared from plasma.

The mechanisms of cellular cholesterol transport and efflux are complex and poorly understood [30, 44]. Cellular cholesterol homeostasis is achieved by four well coordinated mechanisms: a) uptake of extracellular cholesterol through receptor mediated endocytosis of LDL particles, b) de novo synthesis of cholesterol from acetyl units via the HMG CoA reductase pathway, c) cholesteryl ester formation by acyl:CoA cholesterol acyl transferase and d), cholesterol efflux mediated by HDL particles. The latter mechanism involves two principal pathways; first, free cellular cholesterol is rapidly

transported to the plasma membrane where it is available for desorption onto HDL particles, following a concentration gradient. Cholesterol movement by this mechanism is bi-directional [30]. The second pathway involves the binding (or docking) of HDL particles, through the interaction of apoA-I with a specific cell-membrane binding site, followed by the activation of protein kinase C and the active translocation of cholesterol from the cytosol to the plasma membrane [45]. This process is dependent on the cytoskeleton and the Golgi apparatus [46]. The nature of proteins involved in HDL-cell interactions have been the subject of debate. Among the candidate proteins are HBP/vigilin [37] and the scavenger receptor B1 (SR-B1) [47]. More recently, Smart et al. [48] and Fielding et al. [49] have shown the importance of caveolae and the associated protein caveolin in mediating the transport of endogenous cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. An elegant set of experiments revealed that caveolin is important in mediating the transport of intracellular cholesterol to the caveolae. Another protein, Sterol Carrier Protein x/2 (SCPx/2) has also been implicated in the initial rapid transport of cellular cholesterol to the plasma membrane [50].

The impaired HDL- and apoA-I-mediated lipid efflux in FHD fibroblasts does not appear to be related to defective HDL interaction with cell-surface-binding proteins. We found that binding of HDL₃ at 4°C to cholesterol-loaded FHD fibroblasts was not significantly different than HDL₃ binding to normal cells. It is unlikely that a defect in SR-B1 could account for the lipid transport disorder in FHD, as this receptor does not appear to play a role in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux [47]. We also show that differences in HBP/vigilin expression could not explain the impaired lipid transport in FHD cells. Basal levels of HBP/vigilin were actually higher in FHD fibroblasts than in normal cells although protein levels appear to be similar. To further test the involvement of HBP/vigilin, we examined the genetic variability at the 2q37 region that includes the HBP/vigilin gene [42, 51]. By Southern blotting analysis, we did not find genetic rearrangement and by haplotype analysis using an informative dinucleotide marker near the HBP/vigilin gene, we did not find segregation of the haplotype with the low HDL trait. On the basis of these findings, it is unlikely that the genetic defect in FHD resides in the HBP/vigilin gene. The actual function of HBP/vigilin is unknown. This protein contains repeated KH domains found in nucleic acid binding proteins [52, 53], and HBP/vigilin is induced by cholesterol [37] and sterol hormones [39, 54] and was shown to be highest

in lipid-laden macrophages and smooth muscle cells of human atherosclerotic lesions [55]. These results suggest that, although HBP/vigilin is unlikely to function as an HDL receptor, it does play some role in sterol metabolism. The current study shows that HBP/vigilin mRNA levels increased in normal fibroblasts when cells are loaded with LDL-derived cholesterol, but this did not translate in increased protein expression. In contrast to normal cells, cholesterol loading of FHD fibroblast did not increase HBP/vigilin mRNA levels, perhaps because baseline levels were already higher than normal. The high constitutive levels of HBP/vigilin mRNA in FHD fibroblasts may reflect impaired cholesterol transport in these cells. This could lead to accumulation of cholesterol within intracellular pools that regulate HBP/vigilin expression, even in the absence of exogenous cholesterol.

Taken together, these data suggest that FHD is caused by a defect in cellular cholesterol mobilization and transport to the plasma membrane. The defect is not associated with decreased cellular binding of HDL particles and is unlikely to be related to a genetic defect or a functional disorder of HBP/vigilin. It is likely that the defect in FHD cells resides in a cascade of HDL-mediated cellular cholesterol transport to the plasma membrane and that this defect is distal to cell-surface HDL binding proteins. A more thorough characterization of cholesterol efflux mechanisms may be useful not solely in understanding basic cellular mechanisms but also in the hope of modulating cholesterol efflux for therapeutic purposes.

Acknowledgments

The authors wish to express their thanks to Francine Lemieux and Colette Rondeau, RN for their patient care, to Nancy Doyle for lipoprotein isolation, and to Paule Marchand for her editorial assistance. The collaboration of Dr. Gosselin (Montreal Heart Institute) and Dr. Laganière for patient referral is greatly appreciated. Supported by an Operating Grant from the Medical Research Council of Canada (MT-12884) and the Heart and Stroke Foundation of Canada and a Scholarship from the Medical Research Council of Canada (JG Jr). Also supported by grants HL 55362 and HL 50367 from the National Institutes of Health (JFO).

References

1. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349:1269-1276.
2. American Heart Association. *Heart and Stroke facts: 1995 statistical supplement*. AHA publication. 1995.
3. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *New Eng J Med*. 1991;325:373-381.
4. Genest J Jr, McNamara JR, Salem DN, Ordovas JM, Jenner JL, Millar JS, Silberman SR, Wilson PF, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol, apolipoproteins A-I and B, and Lipoprotein(a) in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:782-802.
5. Genest J Jr, McNamara JR, Salem DN, Cohn SD, Millar JS, Wilson PF, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1991;67:1185-1189.
6. Genest J Jr, Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Meyers RH, Silberman SR, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 1992;85:2025-2033.
7. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984;25:1017-1058.
8. Genest J Jr, Bard J-M, Fruchart J-C, Ordovas JM, Schaefer EJ. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler and Thromb*. 1993;13:1728-1737.
9. Takata K, Saku K, Ohta T, Takata M, Bai H, Jimi S, Liu R, Sato H, Kajiuama G, Arakawa K. A new case of apoA-I deficiency showing codon 8 nonsense mutation of the apoA-I gene without evidence of coronary artery disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1866-1874.
10. von Eckardstein A, Funke H, Walter M, Altland K, Benninghoven A, Assmann G. Structural analysis of human apolipoprotein A-I variants. *J Biol Chem*. 1990;265:8610-8617.
11. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res*. 1997;38:191-205.

12. Breslow JL. Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1995;2031-2052.
13. Assmann G, von Eckardstein A, Brewer HB Jr. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1995;2053-2072.
14. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP Jr, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1994;107:85-98.
15. Marcil M, Krimbou L, Boucher B, Solymoss BC, Davignon J, Frohlich J, Genest J Jr. Severe Familial HDL deficiency in French Canadian kindred: biochemical and molecular characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1015-1024.
16. Cheung MC, Mendez AJ, Wolf AC, Knopp RH. Characterization of apolipoprotein A-I and A-II-containing lipoproteins in a new case of high density lipoprotein deficiency resembling Tangier disease and their effects on intracellular cholesterol efflux. *J Clin Invest*. 1993;19:522-529.
17. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Feuerstein I, Zech L, Connor W, Brewer HB Jr. Very low high density lipoproteins without coronary atherosclerosis. *Lancet*. 1993;342:8885.
18. Walter M, Gerdes U, Seedorf U, Assmann G. The high density lipoprotein- and apolipoprotein A-I-induced mobilization of cellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease subjects. *Biochem Biophys Resch Comm*. 1994;205:850-6
19. Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein AI in Tangier disease. *J Clin Invest*. 1995;96:78-87.
20. Rogler G, Trümbach B, Klima B, Lackner KJ, Schmitz G. HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:693-690.
21. Remaley AT, Schumacher JA, Farsi JA, Nazih BD, Brewer HB Jr. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effects of brefeldin on lipid efflux. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1813-1821
22. Lipid Research Clinics Program. *Manual of Laboratory Operations, Vol. 1: Lipid and Lipoprotein Analysis*. Washington, DC: US Dept of Health, Education, and Welfare; 1974;1-81; publication NIH 75-628.

23. Kelly JL, Kruski AW. Density gradient ultracentrifugation of serum lipoproteins in a swinging bucket rotor. *Methods Enzymol.* 1986;128:170-181.
24. Allain CB, Poon LS, Chan FC, Richmond F, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20:470-475.
25. Sampson EH, Demers LM, Krieg AF. Faster enzymatic procedure for serum triglycerides. *Clin Chem.* 1975;21:1983-1985.
26. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1958;234:466-468.
27. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Method Enzymol.* 1986;128:417-431.
28. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res.* 1994;35:1698-1711.
29. Krimbou L, Tremblay M, Davignon J, Cohn JS. Characterization of human plasma apolipoprotein E-containing lipoproteins in the high density lipoprotein size range: focus on pre- β_1 -LpE, pre- β_2 -LpE, and α -LpE. *J Lipid Res.* 1997;38:35-48.
30. Liscum L, Underwood KW. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem.* 1995;270:15443-15446.
31. Mendez AJ. Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. *J Biol Chem.* 1995;270:5891-5900
32. Brewer HB Jr, Ronan R, Meng M, Bishop C. Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Method Enzymol.* 1986;128:223-246.
33. Lange Y, Swaisgood MH, Ramos B, Steck TL. Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1989;264:3786-3793.
34. Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J Lipid Res.* 1973;14:364-366
35. Yu L, Qiu S, Genest J Jr. Abnormal regulation of low-density-lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in heterozygous familial hypercholesterolemia due to the "French Canadian mutation". *Atherosclerosis.* 1996;124:103-117.
36. Hokland B, Mendez AJ, Oram JF. Cellular localization and characterization of proteins that bind high density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1992;33:1335-1342.

37. Oram JF, Mendez AJ, Slotte JP, Johnson TF. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:403-414.
38. Weber M, McNicoll S, Lussier-Cacan S, Marcil M, Connelly P, Rondeau C, Latour Y, Connelly P, Davignon J, Genest J Jr. Plasma lipoproteins, apolipoprotein B, apolipoprotein E phenotypes and metabolic factors in premature CAD in French Canadians. *Can J Cardiol.* 1997;13:253-260.
39. Dodson RE, Shapiro DJ. Vigilin, an ubiquitous protein with 14 KH domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'untranslated region-binding protein. *J Biol Chem.* 1997;272:12249-12252.
40. McKnight GL, Reasoner J, Gilbert T, Sundquist KO, Hokland B, McKernan PA, Champagne J, Johnson CJ, Bailey MC, Holly R. Cloning and expression of a cellular HDL binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem.* 1992;267:12131-12141.
41. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Généthon human genetic linkage map. *Nat Genet.* 1994;7:246-339.
42. Xia Y-R, Klisak I, Sparkes RS, Oram JF, Lusis AJ. Localization of the gene for HDL binding protein (HDLBP) to human chromosome 2q37. *Genomics.* 1993;16:524-525.
43. Batal R, Tremblay M, Krimbou L, Mamer O, Davignon J, Genest J Jr. Cohn JS. Familial deficiency characterized by hypercatabolism of mature apo AI but not proapoAI. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:655-664
44. Coxey RA, Pentchev PG, Campell G, Blanchette-Mackie EJ. Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res.* 1993;34:1165-1176.
45. Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem.* 1991;266:10104-10111.
46. Mendez AJ, Uint L. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus. *J Lipid Res.* 1996;37:2510-2524.
47. Ji Y, Jian B, Wang N, De la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor B1 promotes HDL lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 1997;272:20982-20985.

48. Smart EJ, Ying Y-S, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 1996;271:29427-29435.
49. Fielding PE, Fielding CJ. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry.* 1995;34:14288-14292.
50. Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, Nervi F. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1995;270:18723-18726.
51. Plenz G, Kugler S, Schnittger S, Rieder H, Fonatsch C, Muller PK. The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression patterns. *Hum Genet.* 1994;93:575-582.
52. Burd CG, Dreyfus G. Conserved structure and diversity of RNA-binding proteins. *Science.* 1994;265:615-621
53. Kruse C, Grunweller A, Notbom H, Kugler S, Purschke WG, Muller PK. Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *J Biochem.* 1996;320:247-252.
54. Chen Z, Menon KM. Expression of high density lipoprotein binding protein messenger RNA in the rat ovary and its regulation by gonadotropin. *Endocrinology.* 1994;134:2360-2366.
55. Chiu DS, Oram JF, LeBoeuf RC, Alpers CE, O'Brien KD. High density lipoprotein binding protein (HBP)/vigilin is expressed in human atherosclerotic lesions and co-localizes with apolipoprotein E. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2350-2358.

Chapitre 6: Études complémentaires non publiées

6.1 Effet d'une activation pharmacologique de la protéine kinase C sur l'efflux du cholestérol intracellulaire dans les fibroblastes de sujets avec déficience familiale en HDL

Il a été démontré dans des fibroblastes en culture que la présence de HDL₃ induit la translocation du cholestérol cellulaire à la membrane plasmique par l'activation de la protéine kinase C [146]. Également, en présence d'un activateur de la protéine kinase C, le 1,2-dioctanoylglycérol (DOG), perméable à la membrane cellulaire, la translocation du cholestérol intracellulaire à la membrane plasmique et l'efflux du cholestérol étaient stimulés [146].

Cette étude avait pour but de vérifier si une stimulation de la PKC pouvait corriger la réduction de l'efflux du cholestérol intracellulaire observée dans les cellules de sujet présentant la déficience familiale en HDL. L'efflux du cholestérol cellulaire dans les fibroblastes chargés en cholestérol d'un sujet normal et affecté a été examiné après une stimulation de 24 h par des HDL₃ en présence d'une concentration croissante (0-250 µM) de DOG.

La figure 6.1 démontre un efflux de cholestérol cellulaire diminué chez le sujet affecté (FHD) comparativement au sujet normal en absence de DOG. L'efflux de cholestérol augmente significativement en présence de DOG tant dans les cellules affectées que normales avec un efflux optimal atteint par une concentration de 100 µM de DOG. Cette augmentation atteint 15 % dans les cellules normales et 40% dans les cellules affectées. Un effet d'inhibition partielle apparaît à une concentration de 200 µM. Ces données supportent les observations démontrant une stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire par l'activation de la PKC. Le défaut de mobilisation du cholestérol intracellulaire chez le sujet affecté peut donc être rétabli et comparable au sujet normal par une activation exogène de la PKC, suggérant que le défaut moléculaire de la déficience familiale en HDL serait attribuable à un effecteur défectueux en amont de la PKC dans la transduction de signaux déclenchée par les HDL.

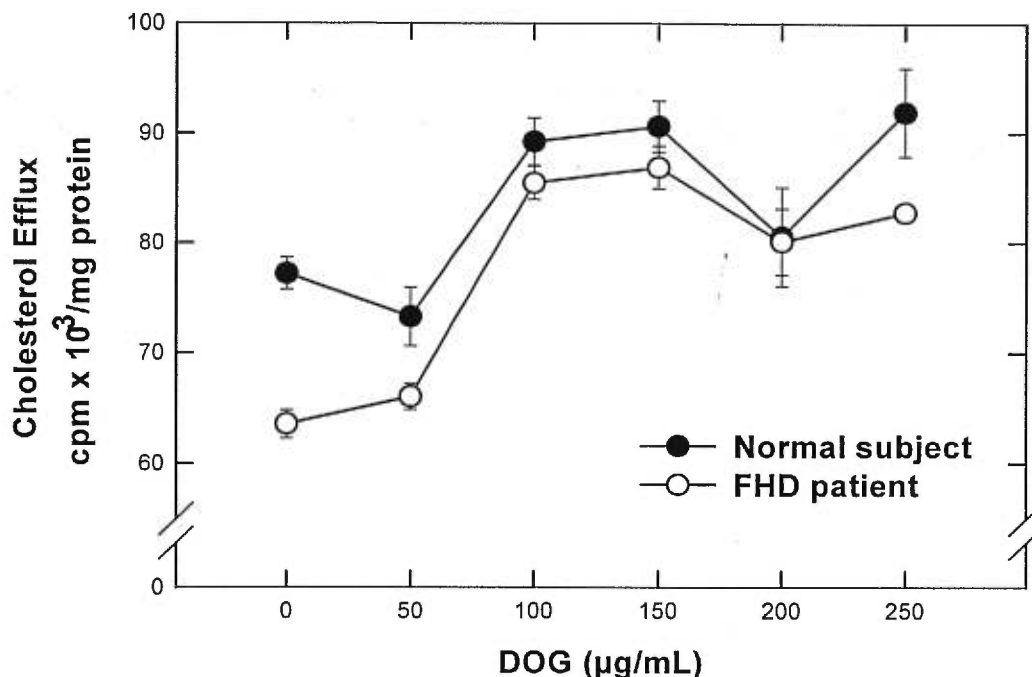


Figure 6.1. Efflux de cholestérol cellulaire provoqué par des HDL₃ en présence de 1,2-dioctanoylglycérol dans des fibroblastes de sujets FHD et normal. Les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 35 mm, portées à mi-confluence dans des conditions standards de culture, puis radiomarquées jusqu'à confluence avec du ³H-cholestérol dans un milieu contenant 10% de sérum. Les cellules étaient ensuite chargées en cholestérol non-lipoprotéinique (20 µg/mL) en croissance arrêtée pendant 24 heures dans un milieu DMEM contenant 2 mg/mL de BSA. Avant l'efflux, les cellules étaient incubées pendant 48 heures dans un milieu DMEM contenant 1 mg/mL BSA afin de permettre l'équilibre des pools de cholestérol cellulaire. L'efflux de cholestérol était provoqué par incubation des cellules durant 24 heures dans un milieu DMEM-BSA contenant 500 µg/mL de HDL₃ et la concentration indiquée de DOG (0-250 µM). Au temps 24 heures, les pétris de cellules étaient déposés sur glace puis le milieu retiré. Après centrifugation, un aliquot du milieu était prélevé pour radio-comptage du ³H. La couche cellulaire était rincée plusieurs fois avec PBS puis dissoute dans une solution NaOH 1N pour la mesure des protéines cellulaires. Le cholestérol radiomarqué et efflué dans le milieu est exprimé en cpm par mg de protéines cellulaires. Chacun des points correspond à la moyenne (± écart type) des résultats obtenus dans trois pétris de cellules traitées dans les mêmes conditions.

6.2 Effet de l'inhibition de la synthèse protéique sur l'efflux du cholestérol intracellulaire

Afin de vérifier si la mobilisation du cholestérol intracellulaire provoqué par des HDL nécessite une synthèse *de novo* de protéines, l'efflux de cholestérol cellulaire dans les fibroblastes d'un sujet normal a été examiné en présence de puromycine, un inhibiteur de la synthèse de protéines.

La figure 6.2 démontre dans des fibroblastes normaux chargés en cholestérol une diminution de plus de 30% de l'efflux du cholestérol intracellulaire provoqué par des HDL₃ en présence de 2.5-7.5 µg/mL de puromycine. La translocation intracellulaire et l'efflux du cholestérol cellulaire apparaissent donc dépendants d'une synthèse *de novo* de protéines suggérant la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus au cours d'une stimulation des cellules par des HDL₃. Cette observation justifie des études d'analyse d'expression des protéines cellulaires ou d'ARNm au cours de la stimulation des cellules par des HDL₃ visant à identifier une ou des protéines impliquées dans le processus de translocation et d'efflux du cholestérol intracellulaire.

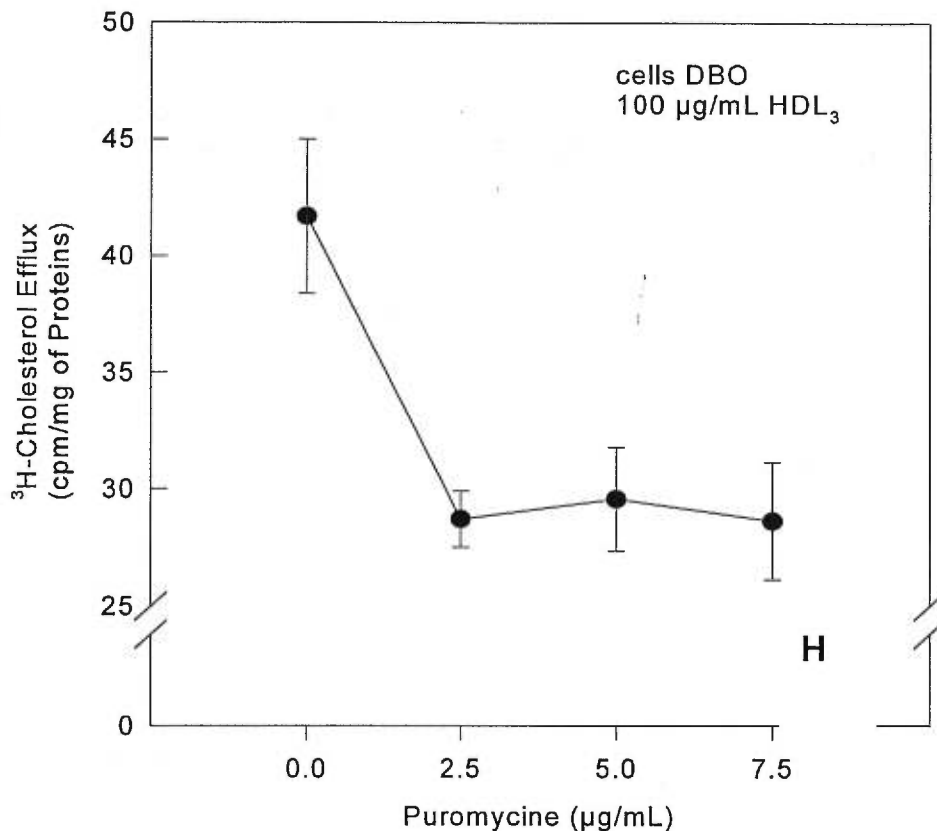


Figure 6.2. Efflux de cholestérol cellulaire provoqué par des HDL₃ en absence et en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique dans des fibroblastes d'un sujet normal. Les cellules ont été marquées et chargées en cholestérol comme décrit à la figure 3. Après la période d'équilibre des pools de cholestérol, les cellules étaient pré-incubées pendant 1 heure dans un milieu DMEM contenant 1 mg/mL BSA et la concentration indiquée de puromycine (0-7.5 µg/mL). L'efflux de cholestérol était stimulé par l'addition dans le même milieu de 100 µg/mL de HDL₃ et mesuré après 6 heures d'incubation des cellules dans ces conditions. Au temps 6 heures, les pétris de cellules étaient déposés sur glace puis le milieu retiré. Après centrifugation, un aliquot du milieu était prélevé pour radiocomptage du ³H. La couche cellulaire était rincée plusieurs fois avec PBS puis dissoute dans une solution NaOH 1N pour la mesure des protéines cellulaires. Le cholestérol radiomarqué et efflué dans le milieu est exprimé en cpm par mg de protéines cellulaires. Chacun des points correspond à la moyenne (± écart type) des résultats obtenus dans trois pétris de cellules traitées dans les mêmes conditions.

Chapitre 7: Discussion générale

7.1 Variabilité des niveaux de cholestérol-HDL

Deux formes d'hypoalphalipoprotéinémie génétiquement déterminées ont été étudiées. Les deux dyslipidémies associent un bas niveau de cholestérol-HDL à une expression métabolique et cellulaire caractéristique qui démontrent des bases étiologiques distinctes. Ces différences mettent en évidence l'hétérogénéité des causes de l'hypoalphalipoprotéinémie responsable des niveaux variables de cholestérol-HDL retrouvés dans la population générale. Seulement une faible portion de cette variabilité peut être expliquée par des facteurs génétiques connus [28,195,238]. Étant donné la forte hétérogénéité des particules HDL plasmatiques, leur participation et leur interdépendance étroite au métabolisme des autres lipoprotéines ainsi que leur rôle clé dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire, le courant de retour du cholestérol au foie par la voie des HDL est un phénomène complexe qui implique de nombreux mécanismes physiologiques non entièrement résolus. L'altération d'un ou plus d'un de ces mécanismes, cellulaires ou extracellulaires, par un défaut génétique peut conduire à l'expression d'une hypoalphalipoprotéinémie et influencer le développement de l'athérosclérose coronarienne ou celui d'autres pathologies.

Dans l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée, la diminution des niveaux de cholestérol-HDL accompagne une augmentation plasmatique de triglycérides et d'apoB avec présence de particules LDL denses, attribuable à une hyperproduction hépatique de VLDL et d'apoB [28,75,219]. L'état d'hypoalphalipoprotéinémie qui en résulte est secondaire et reflète la présence d'autres troubles métaboliques des lipoprotéines. Par exemple, une augmentation plasmatique des triglycérides est cause commune de l'abaissement des niveaux de cholestérol-HDL, le plus souvent associé à une diminution de la taille des particules HDL et à un accroissement du taux de catabolisme fractionnel de l'apoA-I [72]. Ce phénomène métabolique est explicable par la présence plus abondante de VLDL-triglycérides dans le plasma qui favorise les échanges d'esters de cholestérol et de triglycérides entre HDL et VLDL [28]. L'action subséquente de la lipase hépatique sur les HDL enrichies en triglycérides entraîne la réduction de la taille des particules, alors plus rapidement catabolisées, tandis que les VLDL enrichies en esters de cholestérol favorisent la production de particules LDL. Une hypoalphalipoprotéinémie

peut également être renforcée par une lipolyse inefficace des triglycérides des VLDL et chylomicrons, provoquant une hypertriglycéridémie et réduisant la libération plasmatique d'apoA-I et de phospholipides nécessaires à la production de particules HDL naissantes [181].

Une forme sévère d'hypoalphalipoprotéïnémie familiale est retrouvée chez des sujets ne présentant pas d'autres troubles des lipoprotéines ou troubles métaboliques connus comme phénomène causal: absence d'hypertriglycéridémie sévère ou d'hyperapoB, absence de déficience enzymatique de la LCAT ou de la lipoprotéine lipase et absence de diabète (Chapitre 4). On retrouve chez ces sujets des particules HDL de taille réduite, appauvries en lipides (Chapitre 4,5) et un hypercatabolisme de l'apoA-I [202], plaidant en faveur d'un catabolisme accru des particules HDL plutôt qu'une réduction de leur synthèse. Une anomalie du métabolisme intracellulaire du cholestérol est essentiellement retrouvée chez ces individus (Chapitre 5). L'anomalie se caractérise par un défaut du transport intracellulaire du cholestérol, du cytosol à la membrane plasmique, et une réduction de l'efflux des phospholipides et cholestérol cellulaires vers des accepteurs, comparable qualitativement à celui observé dans la maladie de Tangier [164,165,243] mais quantitativement de moindre intensité: l'efflux de cholestérol cellulaire provoqué par l'apoA-I ou par des HDL₃ dans des fibroblastes est réduit de 40 à 60% par rapport à des niveaux normaux alors qu'il est trouvé inférieur à 10% dans les cellules de Tangier.

7.2 Hyperlipoprotéïnémie familiale combinée

Une hypoalphalipoprotéïnémie familiale demeure un désordre commun des lipides plus souvent associé à l'hypertriglycéridémie notamment retrouvée dans l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée. Cette dernière est l'une des dyslipidémies les plus fréquemment rencontrées dans la maladie coronarienne précoce ($\approx 10\%$) [29] avec une prévalence de 0.5 à 2% dans la population [247]. Dans cette forme de dyslipidémie, une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol-HDL est une conséquence métabolique d'une augmentation du nombre de particules contenant l'apoB due à une hyperproduction hépatique de particules VLDL [75,246]. Les bases moléculaires du défaut demeurent actuellement inconnues. Des études génétiques indiquent que le

défaut pourrait être soit monogénique dominant ou être l'effet combiné de multiples gènes [227].

7.2.1 Aspect métabolique

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le défaut métabolique de l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée. Ainsi, en démontrant l'existence d'un marqueur génétique au locus du complexe génique apoA-I–C-III–A-IV, Wojciechowski et ses collaborateurs [69] suggèrent que l'apoA-IV facilite le transfert de l'apoC-II aux chylomicrons; considérant l'apoC-II comme un cofacteur essentiel à l'activation de la lipoprotéine lipase pour la lipolyse des particules riches en triglycérides, un défaut génique de l'apoA-IV pourrait provoquer l'état d'hypertriglycéridémie typiquement rencontré dans cette dyslipidémie. De plus, l'apoC-III, inhibant la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique de même que la captation des IDL et des résidus de chylomicrons par le foie, pourrait affecter les niveaux de triglycérides et de cholestérol plasmatiques par un défaut génique causant sa surexpression.

7.2.2 Aspect génétique

S'appuyant sur l'expression variable du phénotype de l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée, Kwiterovich [245] propose la participation de plusieurs locus. Deux principales classes de gènes (X et Y) y seraient impliquées. Les gènes de classe X sont ceux appartenant à un groupe de gènes dont une mutation entraînerait une augmentation de synthèse de l'apoB dans le foie. Le gène de l'apoB, les éléments protéiques de liaison *trans* à l'ADN pour le gène de l'apoB et les gènes impliqués dans les événements post-traductionnels de l'apoB au niveau hépatique figurent parmi ces gènes. Les gènes de classe Y sont ceux dont des mutations provoqueraient une augmentation des niveaux plasmatiques de triglycérides. Ces gènes pourraient inclure le gène de la lipoprotéine lipase, le complexe génique apoA-I–C-III–A-IV, le gène du récepteur à l'insuline et le gène de susceptibilité à l'athérosclérose. N'importe quelle combinaison de deux mutations de gènes de classe X et Y produirait une pleine expression du phénotype.

7.2.3 Aspect moléculaire

Pour investiguer les bases moléculaires de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée, l'approche gène candidat fut utilisée. La variabilité génétique sur le complexe génique apoA-I–C-III–A-IV et les mutations de la lipoprotéine lipase ont été examinées dans des familles canadiennes française exprimant un phénotype dyslipidémique compatible à l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée (Chapitre 3). La population québécoise de souche française apparaît particulièrement touchée par des dyslipidémies familiales issues de gènes fondateurs et s'avère donc une population stratégique pour l'étude de mutations géniques causant des dyslipidémies. Dans l'échantillon étudié, aucune association n'a pu être établie entre les fragments de restrictions polymorphiques XmnI et SstI sur le complexe génique apoA-I–C-III–A-IV et le phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée. Étant donné la très faible probabilité de recombinaison allélique au voisinage d'une mutation potentielle, l'implication véritable de ce locus dans la dyslipidémie aurait nécessairement démontré une coségrégation de l'haplotype avec la présence du phénotype dyslipidémique dans les familles étudiées. Les observations de Wojciechowski [69] et Hayden [229] deviennent ainsi inconsistantes avec celles obtenues dans la population étudiée et lèvent donc le doute sur le rôle physiologique du locus apoA-I–C-III–A-IV dans la cause moléculaire de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée.

Une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase fut démontrée dans un tiers des cas d'hyperlipoprotéinémie familiale combinée [225], suggérant que des mutations fonctionnelles du gène de la lipoprotéine lipase puissent être associées au phénotype de cette dyslipidémie. Dans l'échantillon étudié, aucune des mutations fonctionnelles de la lipoprotéine lipase fréquemment retrouvées dans la population canadienne française ($LPL_{Gly188Glu}$, $LPL_{Pro207Leu}$, $LPL_{Asp250Asn}$) n'a pu être associée au phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée. La dyslipidémie étant relativement commune dans la population canadienne française et les mutations examinées comptant pour 97% des cas de déficiences familiales en lipoprotéine lipase au Québec auraient fort probablement démontré une relation avec le phénotype de la dyslipidémie dans cette population si un défaut génétique fonctionnel de la lipoprotéine lipase au site catalytique était impliqué comme cause moléculaire de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée. Une étude précédente [227] n'avait pu également établir un lien entre la dyslipidémie

dans des familles canadiennes françaises et ces mutations fréquentes de la lipoprotéine lipase ou des mutations silencieuses examinées par séquençage direct du gène. Ces observations suggèrent que des mutations fonctionnelles du gène de la lipoprotéine lipase ne soient pas associées au phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée dans une fraction des cas tel que rapporté précédemment [225].

L'une des principales difficultés de l'étude de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée réside à une identification non ambiguë des cas, dû à la forte variabilité du phénotype. La définition du phénotype s'est appuyée sur une norme arbitraire basée sur la distribution normale des valeurs de lipides dans la population. Arbitrairement, les valeurs situées dans les 5% supérieures ou inférieures d'une distribution normale définissent habituellement une anomalie [91]. Le phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée a été attribué en considérant anormales des valeurs de LDL-cholestérol et triglycérides dans les 10% supérieures de la distribution normale de ces valeurs de lipides au sein de la population (selon les données fournies dans réf. 118). Cette mesure contribue à dichotomiser des variables biologiques continues entraînant le risque de considérer comme anormales des valeurs normales et comme normales des valeurs anormales. De plus, le phénotype de l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée, caractérisé par une augmentation anormale des valeurs de triglycérides ou de cholestérol-LDL ou des deux à la fois, chevauchent l'expression d'autres dyslipidémies rendant ainsi sa définition incertaine.

7.2.4 Aspect cellulaire

Des études tentant de définir un phénotype cellulaire dans l'hyperlipoprotéinémie familiale combinée ont examiné l'effet des protéines BP (*basic protein*) sur le métabolisme cellulaire des lipides. Il a été démontré que les protéines BP I, BP II et BP III stimulent la formation d'esters de lipides dans des fibroblastes normaux [248]. Dans les fibroblastes de sujets hyperapoB la synthèse de triglycérides stimulée par BP I est diminuée de 50% alors que la formation d'esters de cholestérol stimulée par BP II apparaît six fois supérieures [249]. Il est suggéré que le défaut cellulaire observé avec BP I soit responsable d'une captation postprandiale déficiente d'acides gras libres pour la formation de triglycérides dans les adipocytes, alors que le défaut cellulaire avec BP II stimule la formation d'une plus grande quantité d'esters de cholestérol au niveau

hépatique entraînant une surproduction d'apoB et VLDL [250]. Ces défauts cellulaires ont été observés tant dans les fibroblastes de sujets avec hyperapoB qu'avec hyperlipidémie familiale combinée [250].

Il est rapporté que la liaison spécifique de l'*acylation-stimulatory protein* (ASP) aux fibroblastes de sujets hyperapoB est diminuée d'environ 50%. L'ASP, décrite par Cianflone et ses collaborateurs [251], apparaît identique à la protéine BP I [248]. Ces observations démontrent que seulement la moitié des sites de liaison pour l'ASP (ou BP I) sont exprimés dans les fibroblastes de sujets hyperapoB. De plus, cette diminution de liaison de l'ASP à la surface cellulaire apparaissait proportionnelle à la diminution de formation des triglycérides dans ces cellules [252]. Un défaut de liaison de l'ASP était retrouvé chez 50% des sujets avec hyperapoB. D'autres défauts, telle une déficience de la lipoprotéine lipase, pouvaient représenter les autres causes de l'hyperapoB. Ces données suggèrent que des mutations au locus génique d'un récepteur putatif des protéines BP puissent expliquer au niveau moléculaire une portion des cas d'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée.

Nous avons démontré (Chapitre 5) qu'une déficience en HDL due à une hyperapoB ou hyperlipoprotéïnémie familiale combinée n'est pas associée à un défaut cellulaire d'efflux de cholestérol. Bien que présentant une hypoalphalipoprotéïnémie marquée, le sujet GCH démontre un efflux de cholestérol cellulaire provoqué par des HDL₃ ou l'apoA-I comparable aux sujets normaux (Fig. 3,4). Chez ce sujet l'hypoalphalipoprotéïnémie est accompagnée d'une élévation plasmatique de l'apoB et d'une augmentation modérée du cholestérol-LDL (Chapitre 4; Table 2, sujet 24842-301). Cette expression dyslipidémique suggère un phénotype d'hyperapoB où, de façon caractéristique, une hypoalphalipoprotéïnémie secondaire, même sévère, apparaît non associée à un défaut de transport et d'efflux du cholestérol cellulaire tel qu'il est observé chez les sujets présentant une déficience familiale primaire en HDL (Chapitre 5).

7.3 Déficience familiale en HDL

Une hypoalphalipoprotéïnémie familiale sans autres anomalies des lipoprotéines a été retrouvée chez 4% des sujets présentant une maladie coronarienne précoce [29]. À la lumière des connaissances actuelles, ce désordre peut être associé à des facteurs métaboliques (diabète), environnementaux (tabagisme, agents pharmacologiques), à de

rare défauts du complexe génique apoA-I–C-III–A-IV, à une déficience de l'enzyme LCAT, à la maladie de Tangier ou une hypoalphalipoprotéinémie familiale de cause inconnue. La déficience familiale en HDL fut ainsi nommée pour représenter une forme sévère d'hypoalphalipoprotéinémie familiale primaire en l'absence des signes cliniques de la maladie de Tangier et dont une caractérisation exhaustive n'a révélé aucune cause connue à ce jour d'hypoalphalipoprotéinémie sévère (Chapitre 4). Selon son expression biochimique, le défaut génétique apparaît transmis selon un mode autosomique codominant où sont retrouvées dans une même famille des valeurs de cholestérol-HDL extrêmement abaissées (< 5^e percentile), normales ou intermédiaires (< 10^e percentile). Au plan biochimique et cellulaire, l'anomalie s'apparente à la maladie de Tangier mais s'en différencie au plan clinique et génétique. Des niveaux fortement abaissés de cholestérol-HDL et d'apoA-I associés à un défaut de transport intracellulaire et d'efflux du cholestérol cellulaire sont retrouvés dans les deux syndromes mais seule la maladie de Tangier est associée à des symptômes cliniques pathognomoniques du défaut cellulaire, traduisant une accumulation d'esters de cholestérol notamment dans le tissu réticulo-endothélial et les cellules de Schwann.

Au niveau génétique, le phénotype clinique de la maladie de Tangier est transmis selon un mode autosomique récessif alors que le phénotype biochimique est transmis selon un mode autosomique codominant [80]. Au niveau hétérozygote, la maladie de Tangier se caractérise biochimiquement par des niveaux de cholestérol-HDL et d'apoA-I diminués de moitié par rapport aux valeurs normales et cliniquement par l'absence de manifestation symptomatique. Au plan cellulaire, l'efflux de cholestérol dans les cellules de sujets hétérozygotes apparaît diminué de moitié par rapport aux niveaux normaux [G. Eberhart et M. Freeman, données non publiées, dans 257]. L'ensemble de ces observations tend à soulever l'hypothèse que la déficience familiale en HDL, décrite au Chapitre 4 et 5, serait l'expression d'une forme hétérozygote de la maladie de Tangier. Toutefois, aucune donnée moléculaire publiée à ce jour n'a pu vérifier l'hypothèse d'une similarité entre les deux syndromes décrits.

7.3.1 Défaut homéostatique du cholestérol cellulaire

Les symptômes physiques de la maladie de Tangier, conséquents à l'accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules du tissu réticulo-endothélial et d'autres types cellulaires, et le rôle prépondérant des HDL à décharger le cholestérol cellulaire, ont motivé les investigations sur l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Plusieurs données suggèrent que la maladie de Tangier résulte d'un déséquilibre homéostatique du cholestérol cellulaire. Certaines cellules dont les macrophages, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes sont sujettes à une accumulation de cholestérol intracellulaire dû à la présence de récepteurs qui permet la captation de cholestérol exogène et qui sont non régulés par les concentrations de cholestérol intracellulaire. Ces cellules, à risque de devenir des cellules spumeuses, doivent se doter de mécanismes qui leur permettent d'évacuer efficacement une surcharge de cholestérol exogène par l'exportation de stérols dans le compartiment extracellulaire. Dans ce processus les HDL ont l'habileté de moduler les niveaux de cholestérol intracellulaire en provoquant l'efflux de cholestérol cellulaire [124,255-256]. Toutefois, ces mécanismes demeurent encore controversés et difficiles à résoudre dû à l'hétérogénéité des processus selon les types cellulaires étudiés et les différents compartiments subcellulaires examinés.

L'homéostasie du cholestérol cellulaire est hautement régulée par des mécanismes d'influx, d'efflux, de synthèse *de novo* et stockage sous forme estérifié, de même que, dans certaines cellules spécialisées, par sa sécrétion dans des lipoprotéines ou par sa conversion en acide biliaire, en hormones stéroïdes ou vitamine D [80]. Le cholestérol provenant de sa synthèse endogène est sécrété de la cellule par un transport actif du cytosol vers la membrane impliquant des structures vésiculaires non-golgiennes. Ce processus, stimulé par la présence de HDL, nécessite la liaison des HDL ou de l'apoA-I à la surface cellulaire et la transduction de signaux dans laquelle une production de diacylglycérol active la protéine kinase C et déclenche des réactions de phosphorylation. Le cholestérol de source exogène, traité d'abord dans le lysosome, est soit transporté directement vers la membrane, soit estérifié par l'enzyme ACAT et dirigé vers le cycle cytoplasmique du cholestérol estérifié. Le transport du cholestérol lysosomal impliquerait des protéines de transfert spécifiques, dont la *sterol carrier protein 2* (SCP2), et l'incorporation du cholestérol dans des corps lamellaires riches en

phosphatidylcholine qui ultimement fusionneraient avec la membrane plasmique. Ce processus est indépendant de la liaison des HDL à la surface cellulaire. Le cholestérol estérifié stocké dans des gouttelettes lipidiques est hydrolysé par l'enzyme NCEH stimulée par une augmentation des niveaux d'AMPc cellulaire et l'activation de protéine kinase. Le cholestérol hydrolysé est retiré de la cellule soit par son transport direct à la membrane plasmique puis son efflux vers les HDL, soit par la voie de rétroendocytose des particules HDL. Cette voie, essentiellement retrouvée au niveau des macrophages, implique la formation de corps lamellaires constitués de phosphatidylcholine et de sphingomyéline provenant des membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

L'accumulation d'esters de cholestérol retrouvée dans les macrophages des sujets avec maladie de Tangier suggère un déséquilibre entre les processus d'influx et d'efflux du cholestérol cellulaire où un influx de cholestérol semble en excès. Plusieurs études ayant examiné l'homéostasie du cholestérol cellulaire dans les macrophages ou les fibroblastes en culture de sujets de Tangier ont identifié certaines anomalies du métabolisme intracellulaire du cholestérol. Notamment, dans les macrophages de Tangier, une synthèse accrue de triglycérides, de phospholipides et d'esters de cholestérol et un hypercatabolisme des phospholipides sont retrouvés. Également, en présence de HDL, une dégradation lysosomiale des particules HDL plutôt qu'une rétroendocytose est observée avec activation de l'ACAT plutôt qu'une répression. De plus, dans ces cellules, la synthèse de phospholipides n'apparaît pas sur-régulée par la liaison de HDL₃ ou sous-régulée par l'internalisation de LDL acétylées comme il est normalement observé. Ces anomalies du métabolisme intracellulaire des lipides coïncident avec des changements morphologiques importants des lysosomes et appareil de Golgi [80]. Dans les macrophages et fibroblastes des sujets de Tangier, l'appareil de Golgi apparaît dilaté et hyperplasique, reflétant vraisemblablement une synthèse accrue des enzymes lysosomiales, dû au catabolisme bloqué du cholestérol ou une synthèse accrue de phospholipides et sphingomyélines.

Une altération des fonctions de l'appareil de Golgi associée au défaut de mobilisation et d'efflux du cholestérol dans les cellules de Tangier concorde avec les observations de Mendez et ses collaborateurs [158,257] ayant démontré que les processus de translocations et d'efflux du cholestérol intracellulaire provoqué par l'apoA-I ou des HDL nécessitent une fonction et une structure intacte de l'appareil de

Golgi. Ils démontrèrent dans des fibroblastes normaux que l'efflux de cholestérol et de phospholipides cellulaires était fortement affecté en présence de bréfeldine A et monensin qui perturbent la structure et la fonction du Golgi.

Il fut proposé que l'ensemble des anomalies biochimiques et morphologiques observées dans les cellules de Tangier soit associé à un défaut des fonctions de l'appareil de Golgi et des lysosomes affectant la translocation des lipides cellulaires [192]. Plus spécifiquement, la maladie serait associée à une déficience à libérer les lipides des structures *trans*-golgiennes aux structures *post*-golgiennes. Il demeure toutefois incertain si ce défaut est primaire ou secondaire à d'autres troubles cellulaires notamment de communication entre la membrane cellulaire et un système d'enzymes intracellulaires ou de translocation des lipides entre des organelles autre que les structures golgiennes.

7.3.2 Implication de la voie de transduction de signaux

Plus récemment, le défaut de mobilisation du cholestérol intracellulaire dans des fibroblastes de Tangier a été trouvé associé à une anomalie de régulation des phospholipases C et D spécifiques à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine [149]. Il a été démontré dans des cellules en culture chargées en cholestérol que les mécanismes provoquant la mobilisation du cholestérol cellulaire implique une hydrolyse de la phosphatidylcholine activée par la présence de HDL₃ [256]. En présence d'apoA-I ou de HDL₃ une diminution importante de la production d'acide phosphatidique par l'action de la phospholipase D et une augmentation significative de diacylglycérol par l'action de la phospholipase C étaient observées dans les cellules de Tangier comparativement aux fibroblastes de sujets normaux exposés aux mêmes conditions. La mobilisation et l'efflux de cholestérol cellulaire étaient normalisés dans les cellules de Tangier en augmentant les niveaux d'acide phosphatidique cellulaire par l'action d'un inhibiteur de la phosphohydrolase. Également, l'anomalie de production d'acide phosphatidique et de diacylglycérol observée dans les cellules de Tangier était recrée dans des cellules normales en présence de la toxine de *pertussis* qui bloque l'activation de la phospholipase D régulée par une protéine-G sensible à la toxine et, à l'inverse, accroît l'activation de la phospholipase C. Les phospholipases C et D étant stimulées par l'activation de la protéine kinase C (PKC), ces données suggèrent ainsi que le défaut

moléculaire de la maladie de Tangier pourrait résider au niveau d'un effecteur en amont de la PKC, responsable de la régulation des phospholipases spécifiques à la phosphatidylcholine et dépendantes de la protéine-G.

Nous avons démontré que le défaut de mobilisation et d'efflux du cholestérol intracellulaire observé dans la déficience familiale en HDL pouvait être corrigé par une stimulation exogène de la PKC (Chapitre 6). Ces résultats concordent avec ceux de Rogler et ses collaborateurs [164] qui démontrèrent une normalisation de l'efflux de cholestérol nouvellement synthétisé dans les fibroblastes d'un sujet de Tangier incubés en présence de 1,2 dioctanoylglycérol. Ces données supportent l'hypothèse que la déficience familiale en HDL (que nous avons décrite) et la maladie de Tangier sont dues à l'altération d'une même voie métabolique responsable du transport intracellulaire du cholestérol à la membrane plasmique. Un défaut moléculaire d'un effecteur situé en amont de la PKC dans une cascade de signaux déclenchée par les HDL pourrait être responsable du désordre. Aucune donnée cependant ne peut confirmer que l'effecteur en cause dans cette cascade est le même dans les deux formes de déficience en HDL.

Parmi d'autres évidences d'une altération de la voie de transduction de signaux dans les cellules de Tangier, Drobnik et ses collaborateurs [148] ont démontré une activation fortement réduite de la phospholipase C spécifique à la phosphatidylinositol dans les fibroblastes de Tangier stimulés par des HDL₃ ou des LDL comparativement à des fibroblastes normaux. Cette déficience résultait en une accumulation réduite d'inositol phosphate et une formation moindre du produit 1,2-diacylglycérol dans les fibroblastes de Tangier. De plus, la production diminuée de 1,2-diacylglycérol s'accompagnait d'un défaut de mobilisation du calcium intracellulaire et d'une translocation réduite de la PKC à la membrane plasmique. L'ensemble de ces données suggère fortement un rôle physiologique de signaux déclenchés par les HDL dans la régulation des mécanismes actifs responsables de la translocation du cholestérol intracellulaire à la membrane plasmique. L'altération de ces signaux par un défaut moléculaire conduirait aux anomalies du métabolisme intracellulaire du cholestérol rencontrées dans la maladie de Tangier et dans la déficience familiale en HDL.

Bien que la voie de la protéine kinase C apparaisse clairement impliquée dans les processus de signaux cellulaires stimulant la translocation et l'efflux du cholestérol intracellulaire, la voie d'une autre protéine kinase dépendante de l'AMPc (protéine kinase A) pourrait également être impliquée dans la modulation du transport

intracellulaire de stérols. Hokland et ses collaborateurs [258] ont démontré qu'une augmentation des niveaux cellulaires d'AMPc dans des fibroblastes chargés en cholestérol provoquait une stimulation de la translocation à la membrane plasmique et de l'efflux de stérols nouvellement synthétisés. Les niveaux cellulaires d'AMPc étaient augmentés par l'addition d'un activateur de l'adénylylcyclase, la forskoline, d'inhibiteurs de la phosphodiesterase, la théophylline et le 3-isobutyl-1-méthylxanthine ou d'analogues de l'AMPc. L'élévation des niveaux d'AMPc dans les cellules en présence de HDL₃ augmentait les proportions de stérols nouvellement synthétisés au niveau de la membrane plasmique et l'efflux de plusieurs stérols synthétisés dont le cholestérol. La phosphorylation de protéines cellulaires spécifiques apparaît donc un élément clé dans les processus de signaux modulant le transport de stérols entre les différents pools cellulaires et impliquerait la voie d'au moins deux protéines kinases distinctes. L'implication de la voie de la protéine kinase A n'a toutefois fait l'objet d'aucune investigation dans le défaut cellulaire de la maladie de Tangier ou dans la déficience familiale en HDL et son rôle ne peut être précisé ici.

7.3.3 Récepteur à HDL

Bien que la structure d'un site de liaison des HDL à la surface cellulaire et la structure d'un ligand particulier soient encore inconnues, plusieurs caractéristiques de la liaison des HDL à la surface des cellules supportent le concept de l'existence d'un récepteur spécifique à HDL: liaison des HDL à la surface cellulaire avec un K_d de 2 à 100 μg protéines/mL [241,262-270,272]; inhibition de cette liaison par une protéolyse des protéines HDL [143]; augmentation de la liaison par une élévation des niveaux de cholestérol intracellulaire [272]; régulation de la liaison par des facteurs de croissance [273,274]. Un clone d'ADNc codant pour un récepteur candidat à HDL, la *HDL-binding protein* (HBP), fut isolé et séquencé [141,142]. Tel que rapporté, l'ADNc de la HBP encode une protéine de 110 kDa homologue à la structure primaire d'apolipoprotéines hydrosolubles et, singulièrement, ne contenant pas de domaine transmembranaire. Nous avons examiné l'expression de cette protéine et sa régulation au niveau de l'ARNm en modulant les niveaux de cholestérol intracellulaire dans des fibroblastes de sujets normaux et de sujets avec déficience familiale en HDL (Chapitre 5). Nous avons trouvé que la protéine cellulaire était normalement exprimée et constitutivement

synthétisée dans les fibroblastes de sujets avec déficience familiale en HDL. Par contre, dans les cellules normales la synthèse de la protéine apparaissait hautement régulée par la modulation des niveaux intracellulaires de cholestérol. La protéine étant ainsi normalement régulée par le cholestérol intracellulaire, sa synthèse constitutive retrouvée dans la déficience familiale en HDL suggère une réponse cellulaire provoquée par des mécanismes défectueux à libérer efficacement les pools de cholestérol intracellulaire plutôt qu'un défaut de sur-régulation de la protéine. Cette hypothèse est supportée par les études de liaison des HDL aux fibroblastes de sujets affectés et normaux. La liaison des HDL aux cellules de sujets affectés était comparable aux fibroblastes de sujets normaux dans des conditions où les niveaux de cholestérol intracellulaires étaient augmentés par l'internalisation de LDL (Chapitre 5). Des études similaires de liaison des HDL sont rapportées avec des fibroblastes de sujets de Tangier. L'étude de Rogler et ses collaborateurs [163] ne démontrait aucune anomalie de liaison des HDL aux cellules de Tangier alors que dans l'étude de Francis et ses collaborateurs [165] une liaison anormale de l'apoA-I aux sites de liaisons de la surface cellulaire était observée.

Bien que la HBP lie les HDL avec une haute affinité sur *ligand blots* et que sa synthèse soit régulée par les niveaux de cholestérol intracellulaire dans les fibroblastes, la protéine a été récemment identifiée comme étant la vigiline, une protéine exprimée dans une large variété de cellules et tissus, partiellement localisée dans la membrane plasmique et trouvée associée à l'ARNt et l'ARNm cytoplasmique [271]. Ses propriétés ont conduit à l'hypothèse que la HBP/vigiline serait impliquée dans la modulation de la synthèse de protéines, dû à ses interactions directes avec l'ARN, et dans le métabolisme cellulaire de stérols; il demeure toutefois peu probable qu'elle soit un récepteur à HDL [271].

7.3.4 Lipoprotéines

Un profil du contenu en lipides et protéines des différentes fractions lipoprotéiniques du plasma est démontré chez un propositus présentant une déficience familiale sévère en HDL (HDL-cholestérol, 0.18 mmol/L) et, pour fin de comparaison, chez un sujet normal (Chapitre 5). La fraction HDL chez le propositus apparaît presque entièrement dépourvue de cholestérol, bien que les protéines et phospholipides y soient

réduits seulement de moitié. Cette composition particulière de la fraction HDL suggère la présence de particules HDL relativement riches en protéines et phospholipides, mais très appauvries en cholestérol et donc de taille fortement réduite. Chez ce propositus, le diamètre moyen des particules HDL plasmatiques a été estimé à 8.3 nm selon la méthode de Stoke (Chapitre 4).

Une autre observation frappante est la fraction anormalement abondante de particules de densité intermédiaire (fraction entre VLDL et LDL) dans le plasma du propositus, caractérisée par une très forte augmentation des protéines et triglycérides comparativement au sujet normal. La présence anormalement élevée de particules riches en triglycérides suggère chez le propositus une altération marquée de la lipolyse de ces particules. Cette observation rejoint les anomalies lipidiques retrouvées dans la maladie de Tangier où apparaît une élévation caractéristique des niveaux de triglycérides et une augmentation des particules résiduelles de chylomicrons et particules VLDL riches en triglycérides [192]. Il est rapporté que les VLDL chez les sujets de Tangier sont hautement anormales par leur mobilité réduite à l'électrophorèse, leur concentration relativement élevée en apoA-II et C [259] et leur réactivité réduite à la lipoprotéine lipase [260]. Au cours du métabolisme normal des lipides, les apolipoprotéines A-II et C sont transférées des particules riches en triglycérides aux particules HDL [91], où l'apoA-II confère aux particules HDL matures une réactivité à la lipase hépatique pour leur lipolyse au niveau du foie. Toutefois, une déficience en HDL entraîne nécessairement la réduction de ces transferts et une accumulation d'apoA-II et C au niveau des particules riches en triglycérides. Les particules contenant l'apoA-II et B étant de mauvais substrats pour la lipoprotéine lipase [261], la réactivité lipolytique de ces particules se trouve donc diminuée. Chez le propositus, un enrichissement en apoA-II dans la fraction des particules de densité intermédiaires pourrait expliquer une plus faible réactivité de ces particules à la lipoprotéine lipase causant leur élévation anormale dans le plasma.

Une partie importante des triglycérides contenus dans les lipoprotéines riches en triglycérides est normalement échangée par la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) pour des esters de cholestérol provenant des HDL. Ces échanges contribuent efficacement au catabolisme des particules riches en triglycérides et à la formation des particules LDL riches en esters de cholestérol. Toutefois, un efflux déficient du cholestérol cellulaire compromet la maturation des HDL en particules riches

en esters de cholestérol, par l'action de la LCAT, et donc d'éventuels transferts de cholestérol aux particules riches en triglycérides et de triglycérides aux particules HDL. Dans la déficience sévère en HDL, l'appauvrissement de cette importante source de cholestérol estérifié provenant des HDL matures entraîne l'accumulation des particules riches en triglycérides et réduit par le fait même la formation de particules LDL. Chez les propositus avec déficience en HDL et, de façon plus marquée, chez les sujets présentant la maladie de Tangier des niveaux abaissés de cholestérol-LDL sont retrouvées. Ce phénomène pourrait représenter un processus antiathérogénique et contribuer à expliquer l'association relativement faible de maladie coronarienne précoce avec la maladie de Tangier ou la déficience familiale en HDL.

Les sous-fractions de particules HDL plasmatiques ont été examinées dans le plasma de 3 sujets avec une déficience familiale sévère en HDL, de 1 sujet avec déficience en HDL due à une hyperapoB et de 1 sujet normal (Chapitre 5). Les lipoprotéines ont été séparées par électrophorèse à partir du plasma total sur gel bidimensionnel (agarose et gradient de polyacrylamide non dénaturant) de façon à différencier les sous-classes de lipoprotéines selon leur charge et leur taille. Les particules HDL renfermant l'apoA-I ont été spécifiquement révélées par immunodétection en utilisant un anticorps anti-apoA-I humain radiomarqué. Dans le plasma du sujet normal, deux sous-classes de HDL à mobilité pré β sont révélées, les particules pré β_1 et pré β_2 . Les autres particules détectées ont une mobilité α et distinguent selon leur taille croissante les HDL₃, les HDL_{2a} et les HDL_{2b}. Dans le plasma des sujets avec déficience familiale sévère en HDL et celui du sujet avec hyperapoB et déficience secondaire en HDL, une nette réduction des particules α -LpA-I est observée bien que les particules pré β_1 -LpAI soient présentes. Selon un modèle généralement accepté, les particules pré β_1 -LpAI pauvres en lipides sont les acceptrices initiales du cholestérol et des phospholipides de la membrane cellulaire [124]. Au cours du processus d'acquisition de lipides, les particules pré β_1 se transforment en particules discoïdes pré β_2 formées d'une double couche de phospholipides. Sous l'action de la LCAT associée surtout aux pré β_3 [275], le cholestérol est estérifié et dirigé au centre de la particule lui conférant une forme sphérique et sa migration α caractéristique. Des particules α , le cholestérol est ensuite rapidement transféré à d'autres lipoprotéines. La forte réduction des particules α -LpAI observée chez les sujets déficients en HDL est

compatible à un catabolisme accéléré de particules HDL α de taille réduite, tel qu'il est rapporté par Breslow [136]. Chez les sujets avec déficience familiale sévère en HDL et défaut d'efflux du cholestérol cellulaire, une réduction de la taille des HDL est attribuable à une maturation inefficace des HDL en particules de plus grande taille, due à une disponibilité réduite du cholestérol cellulaire pour sa désorption membranaire. La présence marquante de HDL_{2a} chez ces sujets proviendrait vraisemblablement de la formation de HDL par le processus lipolytique normal des VLDL et chylomicrons et estérification du cholestérol par la LCAT. Chez le sujet hyperapoB avec déficience en HDL mais efflux normal du cholestérol cellulaire, une augmentation des triglycérides plasmatiques est également associée à une réduction de la taille des particules HDL et une augmentation du taux de catabolisme fractionnel des HDL tel que démontré par Breslow [136]. Ainsi, une altération du processus de maturation des HDL et un hypercatabolisme de particules HDL (tel que démontré par Batal et ses collaborateurs [202] chez ces sujets avec déficience familiale sévère en HDL) ne sont pas là l'expression étiologique d'une hypoalphalipoprotéïnémie sévère mais plutôt le reflet d'un dérangement non spécifique du métabolisme normal des HDL.

7.3.5 Efflux du cholestérol cellulaire

En utilisant une méthode de radiomarquage du cholestérol qui enrichi les pools de cholestérol intracellulaire (marquage des cellules durant leur croissance), nous avons démontré un efflux de cholestérol et phospholipides cellulaires anormalement diminué chez les sujets présentant une déficience familiale sévère en HDL (Chapitre 5). Cette anomalie était associée à une mobilisation nettement réduite du pool de cholestérol estérifié au cours de la stimulation de l'efflux. L'ensemble de ces observations nous suggère une anomalie de l'efflux du cholestérol cellulaire due à un défaut de mobilisation et translocation du cholestérol intracellulaire à la membrane plasmique pour l'efflux. Ce défaut est semblable à celui rapporté dans la maladie de Tangier [163-165]. L'efflux du cholestérol cellulaire a été examiné en utilisant soit des HDL₃, soit de l'apoA-I purifiée comme accepteurs extracellulaire de cholestérol. Les différences d'efflux de cholestérol entre les cellules normales et les cellules de sujets affectés paraissent moins marquées en présence de HDL₃ qu'en présence d'apoA-I purifiée. Les cellules d'un sujet affecté démontrent même un efflux de cholestérol normal lorsque les cellules

sont exposées à des HDL₃ alors que l'efflux apparaît nettement abaissé en présence d'apoA-I (Fig. 3 et 4, Chapitre 5). Cette mesure imprécise de l'efflux du cholestérol cellulaire est en partie attribuable à la composition moléculaire de l'accepteur de cholestérol choisi et des conditions expérimentales.

Plusieurs études ont démontré que les HDL stimulent l'efflux de cholestérol selon deux mécanismes: une diffusion aqueuse et la liaison d'apolipoprotéines à la surface cellulaire [280]. Selon le modèle de diffusion aqueuse, les phospholipides à la surface des particules HDL réabsorbent le cholestérol qui désorbe spontanément de la membrane plasmique et diffuse à travers la couche aqueuse entourant la cellule [255,279]. Le mécanisme opérerait dans les deux directions, permettant un échange de molécules de cholestérol entre les deux surfaces. Ainsi, pour qu'il y ait efflux net de cholestérol, un gradient physico-chimique doit s'établir entre la surface cellulaire et la particule HDL de façon à ce que plus de molécules de cholestérol soient transférés vers les HDL que dans la direction opposée. En présence d'une large quantité de cholestérol membranaire, tel le modèle utilisé de fibroblastes chargés en cholestérol, la capacité des HDL à absorber le cholestérol est limitée et saturable particulièrement en absence de LCAT dans le milieu expérimental. La saturation des HDL conduit alors à un transfert de cholestérol des HDL vers la membrane cellulaire. Le modèle de liaison d'apolipoprotéine propose que le cholestérol cellulaire soit retiré par l'interaction des apolipoprotéines-HDL à des sites de liaison ou récepteurs de la surface cellulaire [280]. L'apoA-I stimulerait la mobilisation des pools de cholestérol intracellulaire accessible à l'estérification par l'ACAT en plus de retirer directement de la membrane plasmique des molécules de cholestérol et phospholipides. Ce processus permettrait de retirer le cholestérol cellulaire en excès qui autrement serait stocké dans la cellule sous forme d'esters de cholestérol.

Au cours des études d'efflux, les particules HDL₃ utilisées comme acceptrices de cholestérol pourrait avoir une capacité moindre que l'apoA-I purifiée à provoquer un efflux net de cholestérol intracellulaire. La composition des HDL₃, initialement riche en phospholipides et cholestérol, entraîne au cours de l'efflux une diminution rapide du gradient de cholestérol entre la membrane cellulaire et la particule HDL, ce qui favorise un retour de cholestérol des HDL vers la membrane plasmique. De plus, l'acquisition de cholestérol dans la particule pourrait rendre de moins en moins accessible certains épitopes responsables de l'interaction des apolipoprotéines-HDL avec la surface

cellulaire. Cette condition réduirait la stimulation du transfert de cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique. L'apoA-I purifiée, dépourvue de lipides, pourrait être plus efficace à retirer directement des phospholipides et du cholestérol de la membrane plasmique en maintenant un gradient favorable tout en stimulant de façon soutenue la mobilisation du cholestérol intracellulaire par sa liaison à la surface cellulaire.

Il faut bien considérer que les analyses d'efflux de cholestérol cellulaire demeurent des évaluations hautement imprécises des mécanismes de mobilisation intracellulaire du cholestérol étant donné la forte proportion de cholestérol membranaire qui est mesurée et qui interfère directement avec la fraction de cholestérol spécifiquement acheminée du milieu intracellulaire à la membrane. Dans un modèle visant la détection d'un trouble du transport intracellulaire du cholestérol ou l'investigation des mécanismes physiologiques qui y sont impliqués, des méthodes basées sur l'analyse concrète du cholestérol intracellulaire au cours de la stimulation des cellules par des HDL ou de l'apoA-I devraient plutôt être employées. Ainsi, la fraction du cholestérol intracellulaire susceptible d'être transportée à la membrane plasmique pourrait être directement examinée par différentes méthodes au cours d'une stimulation de l'efflux: en évaluant le cholestérol cytosolique qui demeure disponible à l'estérification par l'ACAT [158,165]; en mesurant le cholestérol cellulaire réfractaire à l'oxydation dans des conditions où seul le cholestérol membranaire peut être oxydé [143,151,276-278]; en radiomarquant le cholestérol cellulaire par la voie physiologique de dégradation lysosomiale de particules LDL [138,276-278]; ou simplement en considérant la fraction non mobilisée du pool de cholestérol estérifié (Chapitre 5). Les seules mesures d'efflux du cholestérol cellulaire demeurent des approches élémentaires dans l'évaluation des anomalies du transport intracellulaire du cholestérol et devraient certainement être reconsidérées comme outil de méthode diagnostique fiable où une déficience en HDL est associée à un trouble du transport du cholestérol à la membrane plasmique ou pour étudier la régulation physiologique des mécanismes impliqués.

7.3.6 Présence de maladie coronarienne

Malgré une déficience sévère en HDL de cause génétique, le défaut n'apparaît pas associé à une histoire familiale de maladie coronarienne précoce dans aucune des trois

familles examinées. Bien que le propositus de la famille 24430 présente une maladie coronarienne sévère, la maladie ne ségrègue pas dans la famille où d'autres sujets présentent des niveaux fortement abaissés de cholestérol-HDL. Étonnamment, ce fait est en accord avec des observations précédemment rapportées où une athérosclérose prématurée n'est pas présente chez des sujets homozygotes pour une déficience en apoA-I, en LCAT, pour la maladie *Fish Eye*, la maladie de Tangier ou d'autres formes non définies de déficience en HDL [239]. L'histoire familiale chez ces sujets ne semble pas non plus démontrer une prévalence accrue de maladie coronarienne, même si les sujets hétérozygotes pour des défauts du gène de l'apoA-I, de la LCAT ou pour la maladie de Tangier présentent des niveaux de cholestérol-HDL inférieurs au 10^e percentile [239]. Aux côtés de ces constatations, plusieurs études ont démontré qu'un niveau abaissé de cholestérol-HDL représente le meilleur marqueur de maladie coronarienne. D'autres études ont démontré qu'une athérosclérose pouvait être prévenue chez des souris transgéniques surexprimant le gène humain de l'apoA-I [281]. Ces données nous amènent donc à questionner le rôle véritablement anti-athérogène des HDL.

Connaissant la fonction des HDL à diriger le flux de cholestérol des cellules périphériques vers le foie, une absence ou une forte réduction des HDL devrait inévitablement entraîner l'accumulation de cholestérol dans plusieurs cellules, favoriser la transformation des macrophages et cellules musculaires lisses en cellules spumeuses et induire une athérosclérose. Or, dans plusieurs cas de déficience sévères en HDL, un enrichissement en cholestérol intracellulaire et des cellules spumeuses sont retrouvés, mais seulement dans quelques tissus et différemment distribués selon la forme de la déficience en cause [192]. La couche cornéenne demeure le seul tissu où une accumulation de cholestérol est présente dans plus d'une forme de déficience en HDL (déficience en apoA-I, déficience en LCAT et maladie de Tangier, quoique non retrouvée dans la déficience familiale en HDL). Toutefois, cette accumulation varie d'une forme à l'autre passant d'un arc cornéen à l'opacification totale [282].

Dans quelques rares cas de déficiences en apoA-I où la protéine n'est pas synthétisée, une xanthomatose est présente et trouvée associée à une athérosclérose prématurée [183,187,283-286]. Dans la maladie de Tangier, des cellules spumeuses sont typiquement retrouvées dans les tissus du système réticulo-endothélial causant une hépatosplénomégalie et une anomalie caractéristique des amygdales mais non

inévitablement une athérosclérose. Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes indépendants de régulation d'influx et d'efflux du cholestérol entre les différents types cellulaires. Ainsi, des formes déficientes de particules HDL spécifiques pourraient être essentielles à maintenir un métabolisme adéquat du cholestérol dans les tissus où s'accumulent des cellules spumeuses mais non indispensables dans d'autres tissus. L'absence de particules pré β -LpA-I dans certaines déficiences en apoA-I entraîne la formation de xanthes associée à une athérosclérose précoce. Par ailleurs, l'absence de particules α -LpA-I retrouvée dans la maladie de Tangier [109] est associée à la présence de cellules spumeuses mais non nécessairement à une maladie coronarienne précoce. Dans ce défaut, le déficit en particules α apparaît causé par une anomalie d'efflux du cholestérol cellulaire et l'hypercatabolisme de particules HDL appauvries en cholestérol. Dans la déficience familiale en HDL, un défaut d'efflux du cholestérol cellulaire et la forte réduction de particules α -LpA-I associée à un hypercatabolisme de l'apoA-I n'apparaissent pas non plus reliés à une maladie coronarienne précoce. Dans ce contexte, il est postulé que seules les formes asynthétiques de déficience en apoA-I et non les formes hypercataboliques entraînent une athérosclérose prématurée. Dans les formes hypercataboliques, une faible quantité d'apoA-I normalement synthétisée pourrait être suffisante à provoquer l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages [239,286]. Une autre sous-classe de HDL récemment identifiée, les particules γ -LpE, auraient aussi la propriété de capter le cholestérol cellulaire [206,287] et ainsi offrir une voie alternative à celle des HDL. Ces particules, trouvées intactes dans le plasma des sujets de Tangier [192] et ceux avec déficience familiale en HDL (Krimbou, L., données non présentées), pourraient suppléer l'apoA-I et exercer un rôle important dans la désorption du cholestérol cellulaire. La présence de ces particules pourrait ainsi contribuer à réduire le risque d'athérosclérose malgré une altération sévère du métabolisme des HDL.

Il est à considérer, selon l'étiologie de la déficience en HDL, que des lipoprotéines anormales peuvent être produites ou s'accumuler et influencer de façon variable le risque d'athérosclérose: production de LDL atypiques dans la déficience en LCAT, présence de chylomicrons résiduelles athérogènes dans la maladie de Tangier et certaines formes de déficiences en apoA-I, formation de LDL oxydées dans la déficience en HDL due à une protection réduite par les HDL [192].

Le risque non particulièrement élevé de maladie coronarienne précoce rencontré dans diverses formes primaires de déficience en HDL demeure néanmoins paradoxal devant les données épidémiologiques ayant documenté une relation inverse entre le risque coronarien et les niveaux de cholestérol-HDL. L'ensemble de ces données soulève l'hypothèse qu'une réduction seule des HDL plasmatiques n'est pas une condition généralement associée à une augmentation substantielle du risque de maladie coronarienne précoce. Aussi, en considérant qu'une large proportion des particules HDL plasmatiques provient de la lipolyse des particules riches en triglycérides, il devient plausible que la réduction des niveaux de cholestérol-HDL associée à une augmentation du risque d'athérosclérose coronarienne reflète plutôt un désordre athérogène du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides ou des lipides postprandiaux. Ce risque serait dramatiquement accru en présence d'autres facteurs ou troubles métaboliques athérogènes souvent génétiquement déterminés.

Conclusion

La caractérisation de deux formes d'hypoalphalipoprotéïnémie de cause génétique a mis en évidence l'importante hétérogénéité des désordres affectant le métabolisme des HDL tant du point de vue de leur étiologie que leur contribution au risque d'athérosclérose coronarienne. L'investigation des causes métaboliques et moléculaires de ces désordres est complexifiée par l'étroite interaction des HDL avec la voie métabolique des autres lipoprotéines et des interactions cellulaires dont plusieurs des mécanismes sont encore mal compris ou inconnus.

L'étude au niveau moléculaire de l'hyperlipoprotéïnémie familiale combinée où se trouve exprimée une hypoalphalipoprotéïnémie nous permet de conclure que ce défaut n'est pas attribuable au complexe génique apoA-I-C-III-A-IV, ni au gène de la lipoprotéine lipase dans la population canadienne française. L'expression de cette dyslipidémie familiale est fortement hétérogène, apparaît plutôt polygénique et mal défini du point de vue de son expression phénotypique. La cause de cette forme d'hypoalphalipoprotéïnémie pourrait donc provenir de défauts moléculaires affectant la voie métabolique d'autres lipoprotéines.

La déficience familiale en HDL représente une forme isolée d'hypoalphalipoprotéïnémie sévère de cause génétique qui se distingue au plan clinique de la maladie de Tangier. Le défaut apparaît associé à une altération des mécanismes de transport intracellulaire du cholestérol à la membrane plasmique qui entraîne un efflux déficient du cholestérol et phospholipides cellulaires. L'hypoalphalipoprotéïnémie qui en résulte est causée par un défaut de maturation des particules HDL appauvries en lipides cellulaires et au catabolisme accéléré de ces particules. L'investigation de la synthèse protéique et de la voie de transduction de signaux qui active la protéine kinase C suggère que le défaut cellulaire puisse se situer dans une cascade de réactions en amont de la PKC, dépendante d'une synthèse *de novo* de protéines, et donc affecter un processus actif. Le défaut cellulaire s'apparente à celui trouvé dans la maladie de Tangier mais est exprimé à un degré moindre. Bien que les cas de déficiences familiales sévères en HDL et la maladie de Tangier soient considérés dans la littérature comme des désordres distincts, ces observations suggèrent que la déficience familiale en HDL puisse être une forme hétérozygote de la maladie de Tangier ou impliquer un

défaut moléculaire différent affectant la même voie métabolique de translocation du cholestérol cellulaire à la membrane plasmique.

L'identification d'un défaut de transport et d'efflux de cholestérol cellulaire dans une nouvelle forme de déficience familiale sévère en HDL, cliniquement différente de la maladie de Tangier, soulève la possibilité que d'autres cas inexplicables de niveaux abaissés de cholestérol-HDL rencontrés en clinique puissent aussi être associés à un défaut d'efflux de cholestérol cellulaire. Ces défauts pourraient contribuer à la variabilité des niveaux de cholestérol-HDL dans la population en général dont les causes métaboliques et génétiques demeurent inconnues. L'identification du défaut moléculaire de cette forme de déficience en HDL permettra d'élucider une étape clé dans le métabolisme des HDL et laissera entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement des dyslipidémies chez les sujets à risque de développer une maladie coronarienne.

L'investigation de ces deux formes d'hypoalphalipoprotéïnémie génétiques nous permet de constater que les dyslipidémies familiales sont l'expression d'une multitude de défauts métaboliques pouvant siéger tant au niveau plasmatique qu'au niveau cellulaire et affecter soit directement, soit indirectement la production, la transformation ou la dégradation des lipoprotéines, modifiant ainsi leur équilibre dynamique. Ces anomalies affectent bon nombre de mécanismes biochimiques et cellulaires dont la plupart encore mal connus rendent difficiles leur caractérisation au point de vue clinique. Afin de mieux rationaliser la détection et le traitement de ces anomalies et ainsi diminuer leur impact sur le développement de la maladie athéroscléreuse, il importe de mieux comprendre la biochimie et la physiologie cellulaire visant à dégager les mécanismes sous-jacents impliqués dans ces désordres métaboliques. L'approche génétique, moléculaire et biochimique constitue un outil très efficace à ces fins.

Addenda: Causes moléculaires de la déficience familiale en HDL et de la maladie de Tangier

Afin d'identifier le gène responsable de la déficience familiale en HDL associée à un défaut de mobilisation et d'efflux du cholestérol cellulaire, les deux familles canadiennes françaises caractérisées au Chapitre 4 (identifiées 24430 et 24723) et démontrant le défaut cellulaire caractérisé au Chapitre 5 ont été soumises à une analyse de linkage. La localisation primaire d'une région génomique qui ségrègue avec le phénotype d'un cholestérol-HDL < 10^e percentile a été effectué dans les deux familles par génotypage de 345 microsatellites dans l'ADN de chacun des membres des familles examinées. Un indice maximum de *LOD score* (5.19) a été obtenu sur le chromosome 9q31.1 à une fraction de recombinaison de 0.0 au niveau du marqueur génétique D9S1784 (carte génétique Généthon [288]). Nous avons examiné la région par haplotypes de plus de 15 marqueurs couvrant une distance de 35 cM autour du marqueur D9S1784 dans les deux familles. Un des deux allèles démontrait une coségrégation parfaite avec la présence d'un niveau abaissé de cholestérol-HDL dans les deux familles, suggérant un défaut hétérozygote compatible avec l'expression dominant du phénotype. Six différentes recombinaisons méiotiques ont été décelées dans les deux familles réduisant la région contenant le gène recherché à 4.4 cM.

Parallèlement, une famille de Tangier a été examinée dans la même région génomique. Un linkage a été observé avec les même marqueurs que ceux identifiés dans la déficience familiale en HDL, suggérant que les gènes responsables de ces anomalies sont situés dans la même région génomique. L'haplotype couvrant la même distance que celle analysée dans la déficience familiale en HDL a été examinée dans la famille de Tangier. Le propositus, issu d'un mariage consanguin, démontrait deux allèles homozygotes sur une large région de plus de 10 cM dont la partie centromérique empiétait de seulement 1.1 cM sur la région déjà réduite à 4.4 cM par des recombinaisons méiotiques dans la déficience familiale en HDL. L'homozygocité des allèles observée chez le propositus de Tangier était compatible avec le caractère récessif du syndrome associé aux manifestations cliniques caractéristiques de la maladie de Tangier. Les recombinaisons méiotiques observées dans la déficience familiale en HDL et l'homozygocité des allèles rencontrée chez le propositus de Tangier

indiquait une région génomique minimale d'environ 1.5 cM où pouvait résider le gène responsable de ces anomalies.

Parmi les gènes localisés dans la région 9q31 (Genome Database) se trouve le gène de l'*ATP-binding cassette 1* (ABC1) membre de la superfamille des transporteurs membranaires *ATP-binding cassette* dont la structure est caractéristique aux transporteurs à la membrane plasmique retrouvés dans les cellules des mammifères (OMIM #600046) [292]. Une dysfonction potentielle de cette protéine paraissait compatible avec le défaut cellulaire caractérisé et justifiait l'investigation de ce gène.

Une carte physique de la région d'intérêt a été établie par des contigs de YAC couvrant environ 10 cM. Un fragment à l'extrémité 3' UTR du gène de l'ABC1 a été amplifié par PCR et localisé sur un clone de YAC contenant le marqueur D9S306 situé dans la région minimale de 1.5 cM. Cette donnée confirmait l'intérêt à examiner la séquence du gène.

L'ARNm des fibroblastes en culture provenant des propositus des deux familles présentant la déficience familiale en HDL, du propositus avec la maladie de Tangier et de sujets normaux a été extrait et utilisé par RT-PCR et analyses de séquence du gène de l'ABC1. Quatre clones de contigs de BAC renfermant les extrémités 5' et 3' de l'ARNm de l'ABC1 ont été sélectionnés et séquencés. Les sites d'épissage du gène ont été repérés par comparaison à la séquence génomique du gène de l'ABC1 chez la souris. Quarante-neuf exons ont été identifiés et amplifiés par des amorces dessinées de part et d'autre de chacun des exons.

Le séquençage de chaque exon amplifié a révélé une délétion hétérozygote de 3 nucléotides 2017-2019 sur l'exon 14, chez le propositus de la famille 24723. Cette délétion supprime le résidu leucine 631 dans le premier domaine transmembranaire de la protéine. Une substitution nucléotidique hétérozygote C→T à la position 6370 de l'exon 48 est apparu chez le propositus de la famille 24430 transformant le résidu arginine 2084 en un codon STOP (TGA). Cette mutation entraîne le retrait de 118 acides aminés dans la protéine. Une autre substitution nucléotidique homozygote A→G a été identifié sur l'exon 13 chez le propositus de la famille de Tangier, remplaçant le résidu arginine 537 par un résidu glutamine. Cette mutation se situait dans la région proximale du premier domaine transmembranaire de la protéine.

Les exons 14, 48 et 13 peuvent être amplifiés à une température de 55°C par les amorces suivantes: 5'CTT-TCT-GCG-GGT-GAT-GAG-CCG-GTC-AAT et 5'CCT-TAG-CCC-GTG-TTG-AGC-TA (exon 14); 5'GAT-CAG-GAA-TTC-AAG-CAC-CAA et 5'GGG-TTC-CCA-GGG-TTC-AGT-AT (exon 48); 5'CAT-GCA-CAT-GCA-CAC-ACA-TA et 5'AAA-GGG-GCT-TGG-TAA-GGG-TA (exon 13). L'analyse de ces exons avec les enzymes de restriction *Eco*RI (mutation sur l'exon 14), *Rsa*I (mutation sur l'exon 48) et *Acl*I (mutation sur l'exon 13) révèle la présence des mutations qui coségrèguent parfaitement avec le phénotype d'un cholestérol-HDL abaissé dans les 3 familles examinées.

La déficience familiale en HDL et la maladie de Tangier, jusqu'à maintenant considérées comme des désordres distincts, sont dues à des mutations du même gène [289,290]. La déficience familiale en HDL devient ainsi l'expression hétérozygote de la maladie de Tangier d'expression récessive dont les manifestations cliniques témoignent d'une altération plus sévère des fonctions de cette protéine. L'*ATP-binding cassette 1*, nouvellement renommée *cholesterol efflux regulatory protein* (CERP) (OMIM #600046), s'avère une protéine clé dans les processus de transport intracellulaire du cholestérol à la membrane plasmique. Les *ATP-binding cassette* forment une superfamille de protéines qui hydrolysent l'ATP fournissant l'énergie nécessaire aux mécanismes actifs de transport de plusieurs substrats à la membrane plasmique incluant des ions, des acides aminés, des peptides, des sucres, des vitamines et des hormones stéroïdes [291]. La déficience familiale en HDL et la maladie de Tangier rejoignent ainsi les autres pathologies causées par des défauts d'un membre des *ATP-binding cassette* dont la fibrose kystique [293], l'adrénoleucodystrophie [294], le syndrome de Zellweger [295], la cholestase familiale intrahépatique progressive [296] et diverses pathologies de l'œil telle la maladie de Stargardt [297], la rétinite pigmentée autosomique récessive [298] et la dystrophie des cônes et bâtonnets [299].

Bibliographie

1. **Stamler, J., Wenworth, D., Neaton, J.D. for the MRFIT Research Group**, Is relationship between cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded?: Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *J Am Med Assoc* 1986; 256:2823-2828.
2. **Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W.F., Abbott, R.D., Kalousdian, S., Kannel, W.B.**, Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The Framingham Heart Study. *J Am Med Assoc* 1986; 256:2835-2838.
3. **Anderson, K.M., Castelli, W.P., Levy, D.**, Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham Study. *J Am Med Assoc* 1987; 257:2176-2180.
4. **Keys, A.**, *Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1980.
5. **Frick, M.H., Dahlen, G., Berg, K., Valle, M., Hekali, P.**, Serum lipids in angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Chest* 1978; 73:62-65.
6. **Whayne, T.F., Alaupovic, P., Curry, M.D., Lee, E.T., Anderson, P.S., Schetchter, E.**, Plasma apolipoprotein B and VLDL-, LDL- and HDL-cholesterol as risk factors in the development of coronary artery disease in male patients examined by angiography. *Atherosclerosis* 1981; 39:410-424.
7. **Dahlen, G.H., Guyton, J.R., Attar, M., Farmer, J.A., Kautz, J.A., Gotto, A.M. Jr**, Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986; 74:758-765.
8. **Noma, A., Yokosuka, T., Kitamura, K.**, Plasma lipids and apolipoproteins as discriminators for presence and severity of angiographically defined coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1983; 49:1-7.
9. **Høstmark, A.T., Osland, A., Simonsen, S., Levorstad, K.**, Lipoprotein-related coronary risk factors in patients with angiographically defined coronary artery disease: relation to number of stenosed arteries. *J Intern Med* 1990; 228:317-321.
10. **Breslow J.L.** Genetics of lipoprotein disorders. *Circulation* 1993; 87(suppl. III):III-16-III-21.
11. **Kannel, W.B., Castelli, W.P., Gordon, T., McNamara, P.M.**, Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1971; 74:1-12.
12. **Ross, R.**, The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* 1986; 314:488-510

13. **Lipid Research Clinics Program**, The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial: I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *J Am Med Assoc* 1984; 251:351-364.
14. **Miller, G.J., Miller, N.E.**, Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1975; 1:16-19.
15. **Pearson, T.A., Bulkley, B.H., Achuff, S.C., Kwiterovich, P.O., Gordis, L.**, The association of low levels of HDL cholesterol and arteriographically defined coronary artery disease. *Am J Epidemiol* 1979; 109:285-295.
16. **Abbott, R.D., Wilson, P.W.F., Kannel, W.B., Castelli, W.P.**, High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction: the Framingham Study. *Arteriosclerosis* 1988; 8:207-211.
17. **Gordon, D.J., Probstfield, J.L., Garrison, R.J., Neaton, J.D., Castelli, W.P., Knoke, J.D., Jacobs, D.R. Jr., Bangdiwala, S., Tyroler, H.A.**, High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79:8-15.
18. **Marcil, M.**, Contribution relative des lipides, lipoprotéines et apolipoprotéines sériques au risque d'athérosclérose des artères coronaires et des pontages aorto-coronariens veineux. *Mémoire de maîtrise*. Département de pathologie, Faculté des études supérieures, Université de Montréal, 1992.
19. **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults**, Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adults treatment panel II). *J Am Med Assoc* 1993; 269:3015-3023.
20. **Criqui, M.H., Heiss, G., Cohn, R., Cowan, L.D., Suchindran, C.M., Bangdiwala, S., Kritchevsky, S., Jacobs, D.R. Jr., O'Grady, H.K., Davis, C.E.**, Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1220-1225.
21. **Tenkanen, L., Pietila, K., Manninen, V., Manttari, M.**, The triglyceride issue revisited. Findings from the Helsinki Heart Study. *Arch Intern Med* 1994; 154:2714-2720.
22. **Miller, N.E.**, HDL vs. triglycerides: which is important in cardiovascular disease? In: F.P. Woodford, J. Davignon & A. Sniderman, éd. *Atherosclerosis X*. Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1995; pp.743-748.
23. **Consensus Development Conference Statement of the National Institute of Health**, Triglycerides, high density lipoprotein, and coronary heart disease. In: G. Assmann, éd. *Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease: Primary Prevention, Diagnosis and Therapy Guidelines for General Practice*. 2., enl. ed. MMV Medizin Verlag GmbH München, Munich, 1993; pp. 141-160.

24. **Simpson, H.C.R., Mann, J.I., Meade, T.W., Chakrabarti, R., Stirling, Y., Woolf, L.,** Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. *Lancet* 1983; 1:786-790.
25. **Mitropoulos, K.A.,** Hypercoagulability and Factor VII in hypertriglyceridemia. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14:246-252.
26. **Owen, J., Grossman, B.A., Palmer, R.H.,** Hyperlipidemia and in vivo hemostatic system activation. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14:241-245.
27. **Carvalho de Sousa, J., Bruckert, E., Giral, P., Soria, C., Truffert, J., Mirshahi, M.C., de Gennes, J.L., Caen, J.P.,** Plasma factor VII, triglyceride concentration and fibrin degradation products in primary hyperlipidemia: a clinical and laboratory study. *Haemostasis* 1989; 19:83-90.
28. **Breslow, J.L., Dammerman, M.,** Genetic determinants of myocardial infarction. In: J.B. Longenecker, D. Kritchevsky & M.K. Drezner, éd. *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer*. Plenum Press, New York, 1995; pp. 65-77.
29. **Genest, J.J. Jr, Martin-Munley, S.S., McNamara, J.R., Ordovas, J.M., Jenner, J., Myers, R.H., Silberman, S.R., Wilson, P.W.F., Salem, D.N., Schaefer, E.J.,** Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85:2025-2033.
30. **Romm, P.A., Green, C.E., Reagan, K., Rackley, C.E.,** Relation of serum lipoprotein cholesterol levels to presence and severity of angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67:479-483.
31. **Mahley, R.W., Rall, S.C. Jr.,** Type III hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle, éd. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. I, 6^e éd. McGraw-Hill, New York, USA, 1989; pp. 1195-1213.
32. **Berg, K.,** Lp(a) lipoprotein: An important genetic risk factor for atherosclerosis. In: A.J. Lusis, J.I. Rotter & R.S. Sparkes, éd. *Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. Candidate Genes and Processes in Atherosclerosis*. Monogr. Hum Genet. Vol. 14. Karger, Basel, 1992; pp. 189-207.
33. **Murai, A., Miyahara, T., Fujimoto, N., Matsuda, M., Kameyama, M.,** Lp(a) as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. *Atherosclerosis* 1986; 86:199-204.
34. **Armstrong, V.W., Cremer, P., Eberle, E., Manke, A., Schulze, F., Wieland, H., Kreuzer, H., Seidel, D.,** The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis: dependence on serum LDL levels. *Atherosclerosis* 1986; 62:249-257.
35. **Rosengren, A., Wilhelmsen, L., Eriksson, E., Risberg, B., Wedel, H.,** Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *BMJ* 1990; 301:1248-1251.

36. Dahlen, G.H., Guyton, J.R., Attar, M., Farmer, J.A., Kautz, J.A., Gotto, A.M., Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids and other lipoproteins with coronary artery disease documented by coronary angiography. *Circulation* 1986; 74:758-765.
37. Budde, T., Fechrup, C., Bösenberg, E., Vielhauer, C., Enbergs, A., Schulte, H., Assmann, G., Breithardt, G., Plasma Lp(a) levels correlate with number, severity, and length-extension of coronary lesions in male patients undergoing coronary arteriography for clinically suspected coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1730-1736.
38. Jauhiainen, M., Koskinen, P., Ehnholm, C., Frick, M.H., Manttari, M., Manninen, V., Huttunen, J.K., Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991; 89:59-67.
39. Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Stampfer, M.J., A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *J Am Med Assoc* 1993; 270:2195-2199.
40. Boerwinkle, E., Leffert, C.C., Lin, J., Lackner, C., Chiesa, G., Hobbs, H.H., Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest* 1992; 90:52-60.
41. Solymoss, B.C., Marcil, M., Chaour, M., Gilfix, B.M., Poitras, A.-M., Campeau, L., Fasting hyperinsulinism, insulin resistance syndrome, and coronary artery disease in men and women. *Am J Cardiol* 1995; 76:1152-1156.
42. Weber, M., McNicoll, S., Marcil, M., Connelly, P., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., Latour, Y., Genest J. Jr, Metabolic factors clustering, lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, lipoprotein (a) and apolipoprotein E phenotypes in premature coronary artery disease in French Canadians. *Can J Cardiol* 1997; 13:253-260.
43. Sing, C.F., Orr, J.D., Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan: IV. Separation of polygene from common environmental effects. *Am J Hum Genet* 1978; 30:491-504.
44. Sosenko, J.M., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Miettinen, O.S., Familial aggregation of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and total triglyceride levels in plasma. *Am J Epidemiol* 1980; 112:656-660.
45. Namboodiri, K.K., Green, P.P., Kaplan, E.B., Morrison, J.A., Chase, G.A., Elston, R.C., Owen, A.R.G., Rifkind, B.M., Glueck, C.J., Tyroler, H.A., The Collaborative Lipid Research Clinics Program Family Study: IV. Familial associations of plasma lipid and lipoproteins. *Am J Epidemiol* 1984; 119:975-996.

46. **Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease**, Prevention of coronary heart disease. Scientific background and new clinical guidelines. In: G. Assmann, éd. *Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease: Primary Prevention, Diagnosis and Therapy Guidelines for General Practice*. 2., enl. ed. MMV Medizin Verlag GmbH München, Munich, 1993; pp. 69-139.
47. **Goldstein, J.L., Hazzard, W.R., Schrott, H.G., Bierman, E.L., Motulsky, A.G., Levinsky, M.J., Campbell, E.D.**, Hyperlipidemia in coronary heart disease: I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1973; 52:1533-1543.
48. **Goldstein, J.L., Schrott, H.G., Hazzard, W.R., Bierman, E.L., Motulsky, A.G., Campbell, E.D., Levinski, M.J.**, Hyperlipidemia in coronary heart disease: II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52:1544-1568.
49. **Nikkila, E.A., Aro, A.**, Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet* 1973; 1:954-958.
50. **Rose, H.G., Kranz, P., Weinstock, M., Juliano, J., Haft, J.I.**, Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: Evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med* 1973; 54:148-160.
51. **Vergani, C., Bettale, G.**, Familial hypo-alpha-lipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 1981; 114:45-52.
52. **Genest J.J. Jr, Martin-Munley, S.S., McNamara, J.R., Ordovas, J.M., Jenner, J., Myers, R.H., Silberman, S.R., Wilson, P.W.F., Salem, D.N., Schaefer, E.J.**, Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85:2025-2033.
53. **Soria, L.F., Ludwig, E.H., Clarke, H.R.G., Vega, G.L., Grundy, S.M., McCarthy, B.J.**, Association between a specific apolipoprotein B-100 mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:587-591.
54. **Rall, S.C. Jr., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Mahley, R.H.**, Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:4696-4700.
55. **Sniderman, A.D., Shapiro, S., Marpole, D., Skinner, B., Teng, B., Kwiterovich, P.O. Jr.**, Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (β) lipoproteins]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:604-608.
56. **Brown, M.S., Goldstein, J.L.**, The hyperlipoproteinemias and other disorders of lipid metabolism. In: A.J. Lusis, J.I. Rotter & R.S. Sparkes, éd. *Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. Candidate Genes and Processes in Atherosclerosis*. Monogr. Hum Genet. Vol. 14. Karger, Basel, 1992.

57. **Genest, J., Jr.**, *Guide du médecin pour le traitement des dyslipoprotéinémies*. STA Communications, Montréal, Québec, 1990.
58. **Reaven, G.M.**, The Banting Lecture. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-1607.
59. **Benlian, P., DeGennes, J.L., Foubert, L., Gagné, S.E., Hayden, M.R.**, Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 1996; 335:848-858.
60. **Breslow, J.L.**, Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8314-8318.
61. **Price, W.H., Kitchin, A.H., Burgon, P.R.S., Morris, S.W., Wenham, P.R., Donald, P.M.**, DNA restriction fragment length polymorphisms as markers of familial coronary heart disease. *Lancet* 1989; i:1407-1411.
62. **Genest, J., Bard, J.-M., Fruchart, J.-C., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J.**, Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1728-1737.
63. **Williams, R.R., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Stults, B.M., Wu, L.L., Hasstedt, S.J., Barlow, G.K., Stephenson, S.H., Lalouel, J.M., Kuida, H.**, Familial dyslipidemic hypertension: evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 12% of patients with essential hypertension. *J Am Med Assoc* 1988; 259:3579-3586.
64. **Genest, J., Marcil, M.**, Genetics, lipoproteins disorders and premature coronary artery. In: B. Jacotot, D. Mathé & J.-C. Fruchart éd. *Atherosclerosis XI*. Elsevier Science, Singapore, 1998; pp. 1045-1053.
65. **Teng, B., Thompson, G.R., Sniderman, A.D., Forte, T.M., Krauss, R.M., Kwiterovich, P.O., Jr.**, Composition and distribution of low density lipoprotein fraction in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia and familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:6662-6666.
66. **Teng, B., Sniderman, A.D., Soutar, A.K., Thompson, G.R.**, Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1986; 77:663-672.
67. **Cianflone, K.M., Maslowska, M.H., Sniderman, A.D.**, Impaired response of fibroblasts from patients with hyperapobetalipoproteinemia to acylation-stimulating protein. *J Clin Invest* 1990; 85:722-730.
68. **Babirak, S.P., Iverius, P.-H., Fujimoto, W.Y., Brunzell, J.D.**, Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; 9; 326-334.
69. **Wojciechowski, A.P., Farrall, M., Cullen, P., Wilson, T.M.E., Bayliss, J.D., Farren, B., Griffin, B.A., Caslake, M.J., Packard, C.J., Shepherd, J., Thakker, R., Scott, J.**, Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 1991; 349:161-164.

70. Nishina, P.M., Johnson, J.P., Naggert, J.K., Krauss, R.M., Linkage of atherogenic lipoprotein phenotype to the low density lipoprotein receptor locus on the short arm of chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:708-712.
71. Reynisdottir, S., Eriksson, M., Angelin, B., Arner, P., Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1995; 95:2161-2169.
72. Breslow, J.L., Lipoprotein transport gene abnormalities underlying coronary heart disease susceptibility. *Annu Rev Med* 1991; 42:357-371.
73. Zannis, V.I., Kardassis, D., Zanni, E.E., Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. In: H. Harris & K. Hirschhorn éd. *Advances in Human Genetics*, Vol. 21. Plenum Press, New York, 1993; pp. 145-319.
74. Kwiterovich, P.O. Jr., Coresh, J., Smith, H.H., Bachorik, P.S., Derby, C.A., Pearson, T.A., A comparison of the plasma levels of apolipoproteins B and A-1 and other risk factors men and women with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1992; 69:1015-1021.
75. Sniderman, A., Brown, B.G., Stewart, B.F., Cianflone, K., From familial combined hyperlipidemia to hyperapoB: unravelling the overproduction of hepatic apolipoprotein B. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3:137-142.
76. Genest J. Jr, McNamara, J.R., Ordovas, J.M., Jenner, J.L., Silberman, S.R., Anderson, K.M., Wilson, P.W.F., Salem, D.S., Schaefer, E.J., Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I, B, and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:792-802.
77. Brinton, E.A., Eisenberg, S., Breslow, J.L., Increased apoA-I and apoA-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 87:536-544.
78. Emmerich, J., Vergès, B., Tauveron, I., Rader, D., Santamarina-Fojo, S., Schaefer, J., Ayrault-Jarrier, M., Thiéblot, P., Brewer, B. Jr., Familial HDL deficiency due to marked hypercatabolism of normal apo A1. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1299-1306.
79. Horowitz, B.S., Goldberg, I.J., Merab, J., Vianni, T.M., Ramakrishnan, R., Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoproteins A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1993; 91:1743-1752.
80. Assmann, G., von Eckardstein, A., Brewer, H.B., Jr., Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle, éd. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7^e éd. McGraw-Hill, New York, USA, 1995; pp. 2053-2072.

81. Ng, N.S., Leiter, L.A., Vezina, C., Connelly, P.W., Hegele, R.A., Apolipoprotein A-I Q[-2]X causing isolated apolipoprotein A-I deficiency in a family with anaphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1994; 93:223-229.
82. Ordovas, J.M., Cassidy, D.K., Civeira, R., Bisgaier, C.L., Schaefer, E.J., Familial apolipoprotein A-I, C-III and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem* 1989; 264:16339-16342.
83. Takata, K., Saku, K., Ohta, T., Takata, M., Bai, H., Jimi, S., Liu, R., Sato, H., Kajiyama, G., Arakawa, K., A new case of apoA-I deficiency showing codon 8 nonsense mutation of the apoA-I gene without evidence of coronary heart disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1866-1874.
84. Carlson, L.A., Holmquist, L., Evidence for deficiency of high density lipoprotein lecithin:cholesterol acyltransferase activity (α -LCAT) in Fish-Eye disease. *Acta Med Scand* 1985; 218:189-196.
85. Frohlich, J., McLeod, R., Pritchard, P.H., Fesmire, J., McConathy, W., Plasma lipoprotein abnormalities in heterozygous for lecithin:cholesterol-actyltransferase deficiency. *Metab Clin Exp* 1988; 37:3-8.
86. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P.H., Hornby, A.E., Wiebusch, H., Motti, C., Hayden, M.R., Dacet C., Jacotot, B., Gerdes U., Faegeman, O., Albers, J.J., Colleoni, N., Catapano, A., Frohlich, J., Assmann, G., Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin:cholesterol actyltransferase (LCAT) deficiency. *J Clin Invest* 1993; 91:677-683.
87. Serfaty-Lacrosniere, C., Civiera, F., Lanzberg, A., Isaia, P., Berg, J., Janus, E.D., Smith, M.P. Jr., Pritchard, P.H., Frohlich, J., Lees, R.S., Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atheroscler* 1994; 107:85-98.
88. Ma, Y., Henderson, H.E., ven Murthy, M.R., Roederer, G., Monsalve, M.V., Clarke, L.A., Normand, T., Julien, P., Gagné, C., Lambert, M., *et al*, A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *New Engl J Med* 1991; 324:1761-1766.
89. Ma, Y., Wilson, B.I., Bijvoet, S., Henderson, H.E., Cramb, E., Roederer, G., ven Murthy, M.R., Julien, P., Bakker, H.D., Kastelein, J.J., A missense mutation (Asp²⁵⁰→Asn) in exon 6 of the human lipoprotein lipase gene causes chylomicronemia in patients of different ancestries. *Genomics* 1992; 13:649-653..
90. Hegele, R.A., Tu, L., McGuire, G.F., Connely, P.W., Molecular basis and allele specific screening of Apo CII St Michaels. *Clin Biochem* 1992; 25:309-312.
91. Havel, R.J., Kane, J.P., Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle, éd. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7^e éd. McGraw-Hill, New York, USA, 1995; pp. 1841-1851.

92. **Dammerman, M., Breslow, J.L.**, Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation* 1995; 91:505-511.
93. **Marcil, M., Genest, J.**, Molecular genetics of lipoprotein disorders and premature coronary artery disease. In: M.-M. Galteau, P. Delwaide, G. Siest & J. Henny, éd. *Biologie prospective. Comptes rendus du 9^e Colloque de Pont-à-Mousson*. John Libbey Eurotext, Paris, 1997; pp. 123-128.
94. **Schaefer, E.J.**, Clinical, biochemical, and genetic features in familial disorders of high density lipoprotein deficiency. *Arteriosclerosis* 1984; 4:303-322.
95. **Eisenberg, S.**, High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984; 25:1017-1058.
96. **Tuajuanda, C., Jordan-Starck, J.-S., White, D.P., Aronow, B.J., Harmony, J.A.K.**, Apolipoprotein J: a membrane policeman? *Curr Opin Lipidol* 1992; 3:75-85.
97. **Kounnas, M.Z., Loukinova, E.B., Stefansson, S., Harmony, J.A.K., Brewer, B.H., Strickland, K.D., Argraves, W.S.**, Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *J Biol Chem* 1995; 270:13070-13075.
98. **Serrato, M., Marian, A.J.**, A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96:3005-3008.
99. **Takahashi, Y., Chiba, H., Matsuno, K., Akita, H., Hui, S.P., Nagasaka, H., Nakamura, H., Kobayashi, K., Tandon, N.N., Jamieson, G.A.**, Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 222:453-459.
100. **Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., Krieger, M.**, Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271:518-521.
101. **Smith, A.B., Hajduck, S.L.**, Identification of haptoglobin as a natural inhibitor of trypanocidal activity in human serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10262-10266.
102. **Smith, A.B., Esko, J.D., Hajduk, S.L.**, Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. *Science* 1995; 268:284-286.
103. **Cockerill, G.W., Rye, K.-A., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Barter, P.J.**, HDL inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecular. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1987-1994.
104. **Vinals, M., Martinez-Gonzalez, J., Badimon, J.J., Badimon, L.**, HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3481-3488.

105. Schaefer, E.J., Lamon-Fava, S., Ordovas, J.M., Cohn, S.D., Schaefer, M.M., Castelli, W.P., Wilson, P.W.G., Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994; 35:871-882.
106. Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., Dawber, T.R., High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62:707-714.
107. Gordon, T., Kannel, W.B., Castelli, W.P., Dawber, T.R., Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham Study. *Arch Intern Med* 1981; 141:1128-1131.
108. Bass, K.M., Newschaffer, C.J., Klag, M.J., Bush, T.L., Plasma lipoprotein levels as predictors of cardiovascular death in women. *Arch Intern Med* 1993; 153:2209-2216.
109. Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A., Huang, Y., High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atheroscler* 1996; 124:S11-S20.
110. Stokes, J. 3^d, Kannel, W.B., Wolf, P.A., Copples, A., D'Agostino, R.B., The relative importance of selected risk factors for various manifestations of cardiovascular disease among men and women from 35 to 64 years old: 30 years follow-up in the Framingham Study. *Circulation* 1987; 75:65-73.
111. Kannel, W.B., High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1983; 52:98-128.
112. Goldbourt, U., Medalie, J.H., High density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease - the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Am J Epidemiol* 1979; 109:296-308.
113. Barter, P.J., Rye, K.-A., High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atheroscler* 1995; 121:1-12.
114. Gaziano, J.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Breslow, J.L., Fasting triglycerides, high density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96:2520-2525.
115. Assmann, G., The role of triglycerides in coronary artery disease: lessons from the Prospective Cardiovascular Study in Münster. *Am J Cardiol* 1992; 79:10H-13H.
116. Laakso, M., Lehto, S., Penttilä, I., Pyörälä, K., Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 1993; 88:1421-1430.

117. **Stampfer, M.J., Sacks, F.M., Salvini, S., Willett, W.C., Hennekens, C.H.**, A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *New Eng J Med* 1991; 325:373-381.
118. **Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, D.C.**, The Lipid Research Clinics Population Studies Data Book, vol. 1. The prevalence study. *NIH publication 80-1527*, 1980; pp. 28-81.
119. **National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute**, Cholesterol lowering in the patient with coronary artery disease. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel 2. *NIH Publication 97-3794*, 1997.
120. **Austin, M.A.**, Genetic epidemiology of LDL subclass phenotypes. *Ann Med* 1992; 24:472-481.
121. **Frohlich, J., Fodor, G., McPherson, R., Genest, J., Langer, N.**, For the Health Canada Working Party on the diagnosis and treatment of hypercholesterolemia and other dyslipidemias. Rationale for and outline of new Canadian guidelines. (Submitted 1998)
122. **Genest, J. Jr, McNamara, J.R., Salem, D.N., Cohn, S.D., Millar, J.S., Wilson, P.F.W., Schaefer, E.J.**, Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67:1185-1189.
123. **Karathanasis, S.K.**, Lipoprotein metabolism: high density lipoproteins. In: A.J. Lusis, R.S. Rotter & R.S. Sparkes, éd. *Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. Candidate Genes and Processes in Atherosclerosis*. Monogr. Hum Genet. Vol. 14. Karger, Basel, 1992; pp. 140-171.
124. **Fielding, C.J., Fielding, P.E.**, Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36:211-228.
125. **Li, Z., McNamara, J.R., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J.**, Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res* 1994; 35:1698-1711.
126. **Shumaker, V.N., Puppione, D.L.**, Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 1986; 128:155-170.
127. **Puchois, P., Kandoussi, A., Feivet, P., Fourier, J.L., Bertrand, M., Koren, E., Fruchart, J.C.**, Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atheroscler* 1991; 68:35-41.
128. **Genest, J. Jr, Bard, J.M., Fruchart, J.-C., Ordovas, J.M., Wilson, P.W.F., Schaefer, E.J.**, Plasma apolipoproteins A-I, A-II, B, E and CIII containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atheroscler* 1991; 90:149-157.
129. **Kawano, M., Miida, T., Fielding, C.J., Fielding, P.E.**, Quantitation of pre- β -HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochem* 1993; 32:5025-5028.

130. Brinton, E.A., Eisenberg, S., Breslow, J.L., Increased apoA-I and apoA-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 87:536-544.
131. Emmerich, J., Vergès, B., Tauveron, I., Rader, D., Santamarina-Fojo, S., Schaefer, J., Ayrault-Jarrier, M., Thiéblot, P., Brewer, B. Jr., Familial HDL deficiency due to marked hypercatabolism of normal apo AI. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1299-1306.
132. Le, A.N., Ginsberg, H.N., Heterogeneity of apolipoprotein A-I turnover with reduced concentrations of plasma high density lipoprotein cholesterol. *Metabolism* 1988; 37:614-617.
133. Rader, D.J., Gregg, R.E., Meng, M.S., Schaefer, J.R., Zech, L.A., Benson, M.D., Brewer, H.B. Jr., In vivo metabolism of a mutant apolipoprotein apo AI_{Iowa}, associated with hypoalphalipoproteinemia and systemic amyloidosis. *J Lipid Res* 1992; 33:755-763.
134. Rader, D.J., Ikewaki, K., Duverger, N., Feuerstein, I., Zech, L., Connor, W., Brewer, H.B. Jr., Very low high-density lipoproteins without coronary atherosclerosis. *Lancet* 1993; 342:1455-1458.
135. Schaefer, E.J., Ordovas J.M., Metabolism of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Methods Enzymol* 1986; 129:420-443.
136. Breslow, J.L., Lipoprotein transport abnormalities underlying heart disease susceptibility. *Ann Rev Med* 1991; 42:357-371.
137. Roma, P., Gregg, R.E., Meng, M.S., Ronan, R., Zech, L.A., Franceschini, G., Sirtori, C.R., Brewer, H.B., In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-I_{Milano}, associated with hypoalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1993; 91:1445-1452.
138. Johnson, J.J., Chacko, G.K., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., The efflux of lysosomal cholesterol from cells. *J Biol Chem* 1990; 265:5546-5553.
139. de la Llera Moya, M., Atger, V., Paul, J.L., Fournier, N., Moatti, N., Giral, P., Friday, K.E., Rothblat, G., A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1056-1065.
140. Davidson, W.S., Gillotte, K.L., Lund-Katz, S., Johnson, W.J., Rothblat, G.H., Phillips, M.C., The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem* 1995; 270:5882-5890.
141. McKnight, G.L., Reasoner, J., Gilbert, T., Sundquist, K.O., Hokland, B., McKernan, P.A., Champagne, J., Johnson, C.J., Bailey, M.C., Holly, R., Cloning and expression of a cellular HDL binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem* 1992; 267:12131-12141.

142. **Hokland, B., Mendez, A., Oram, J.F.**, Cellular localization and characterization of proteins that bind high density lipoprotein. *J Lip Res* 1992; 33:1335-1342.
143. **Oram, J.F., Mendez, A.J., Slotte, J.P., Johnson, T.F.**, High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:403-414.
144. **Kruse, C., Grunweller, A., Notbohm, H., Kugler, S., Purschke, W.G., Muller, P.K.**, Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem J* 1996; 320:247-252.
145. **Plenz, G., Kugler S., Schnittger S., Rieder, H., Fonatsch, C., Muller, P.K.**, The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression patterns. *Hum. Genet* 1994; 93:575-582.
146. **Mendez, A.J., Oram, J.F., Bierman, E.L.**, Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J Biol Chem* 1991; 266:10104-10111.
147. **Deeg, M.A., Garver, W.S., Bierman, E.L., Oram, J.F.**, HDL stimulates phosphorylation of 18 and 80 kDa proteins in cholesterol-loaded human skin fibroblasts. *Circulation* 1993; 88:résumé 1215.
148. **Drobnik, W., Möllers, C., Resink, T., Schmitz, G.**, Activation of phosphatidyl-specific phospholipase C in response to HDL₃ and LDL is markedly reduced in cultured fibroblasts from patients. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1369-1377.
149. **Walter, M., Reinecke, H., Gerdes, U., Nofer, J.-R., Höbbel, G., Seedorf, U., Assmann, G.**, Defective regulation of phosphatidyl-choline-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. *J Clin Invest* 1996; 98:2315-2323.
150. **Deeg, M.A., Bowen, R.F., Oram, J.F., Bierman, E.L.**, High density lipoproteins stimulate mitogen-activated protein kinases in human skin fibroblasts. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1667-1674.
151. **Lange, Y.**, Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res* 1991; 32:329-339.
152. **Goldstein, J.L., Brown, M.S.**, Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-430.
153. **Lange, Y., Matthies, H.J.G.**, Transfer of cholesterol from its site of synthesis to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1984; 259:14624-14630.
154. **Lange, Y., Steck, J.L.**, Cholesterol-rich intracellular membranes: a precursor to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1985; 260:15592-15596.

155. Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B., Steck, T.L., Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1989; 264:3786-3793.
156. Liscum, L., Underwood, K.W., Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 1995; 270:15443-15446.
157. Coxey, R.A., Pentchev, P.G., Campell, G., Blanchette-Mackie, E.J., Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res* 1993; 34:1165-1176.
158. Mendez, A.J., Monensin and Brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. *J Biol Chem* 1995; 270:5891-5900.
159. Johnson, W.J., Fisher, R.T., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Efflux of newly synthesized cholesterol and biosynthetic sterol intermediates from cells. *J Biol Chem* 1995; 270:25037-25046.
160. Fielding, P.E., Fielding, C.J., Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 1995; 34:14288-14292.
161. Smart, E.J., Ying, Y.-S., Donzell W.C., Anderson, R.G., A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; 271:29427-29435.
162. Lisanti, M.P., Tang, Z., Scherer, P.E., Kubler, E., Koleske, A.J., Sargiacomo M., Caveolae, transmembrane signaling and cellular transformation. *Mol Memb Biol* 1995; 12:121-124.
163. Walter, M., Gerdes, U., Seedorf, U., Assmann, G., The apolipoprotein AI-induced mobilization of cellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:850-856.
164. Rogler, G., Trumbach, B., Klima, B., Lackner, K.J., Schmitz, G., HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:683-690.
165. Francis, G.A., Knopp, R.H., Oram, J.F., Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier disease. *J Clin Invest* 1995; 96:78-87.
166. Hajjar, D.P., Haberland, M.E., Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 1997; 272:22975-22978.
167. Yoshikawa, M., Sakuma, N., Hibino, T., Sato, T., Fujinami, T., HDL₃ exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL₂. *Clin Biochem* 1997; 30:221-225.

168. **Banka, C.L.**, High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:139-142.
169. **Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., Navab, M.**, Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891.
170. **Raeven, E., Tsai, L., Azhar, S.**, Cholesterol uptake by the selective pathway of ovarian granulosa cells: early intracellular events. *J Lipid Res* 1995; 36:1602-1617.
171. **Wurfel, M.M., Kunitake, S.T., Lichenstein, H., Kane, J.P., Wright, S.D.**, Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; 180:1025-1035.
172. **Hager, K.M., Hajduk, S.L.**, Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* 1997; 385:823-826.
173. **Raper, J., Nussenzweig, V., Tomlinson, S.**, The main lytic factor of *Trypanosoma brucei brucei* in normal human serum is not high density lipoprotein. *J Exp Med* 1996; 183:1023-1029.
174. **Yuan, Y., Jackson, S.P., Newnham, H.H., Mitchell, C.A., Salem, H.H.**, An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A2. *Blood* 1995; 86:4166-4174
175. **Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Muta, E., Yamamoto, T., Nishida, H., Sakuma, S., Fujita, T.**, High density lipoprotein inhibits platelet 12-lipoxygenase activity. *Res Comm Mol Pathol & Pharmacol* 1994; 85:355-358.
176. **Hopkins, P.N., Hunt, S.C., Wu, L.L., Williams, G.H., Williams, R.R.**, Hypertension, dyslipidemia and insulin resistance: links in a chain or spokes on a wheel. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:241-253.
177. **Mahaney, M.C., Blangero, J., Rainwater, D.L., Comuzzie, A.G., van de Berg, J.L., Stern, M.P., MacCluer, J.W., Hixson, J.E.**, A major locus influencing plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in the San Antonio Family Heart Study. Segregation and linkage analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1730-1739.
178. **Hegele, R.A., Brunt, J.H., Connelly, P.W.**, Multiple genetic determinants of variation of plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:861-871.
179. **Williams, R.R., Hunt, S.C., Hopkins, P.N., Wu, L.L., Hasstedt, S.J., Berry, T.D., Barlow, G.K., Stults, B.M., Schumacher, M.C., Ludwig, E.H., et al.** Genetic basis of familial dyslipidemia and hypertension: 15-year results from Utah. *Amer J Hypertens* 1993; 6:319S-327S.

180. Heiba, I.M., De Meester, C.A., Xia, Y.R., Diep, A., George, V.T., Amos, C.I., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S., Elston, R.C., Lusic, A.J., Genetic contributions to quantitative lipoprotein traits associated with coronary artery disease: analysis of a large pedigree from the Bogalusa Heart Study. *Am J Med Genet* 1993; 47:875-883.
181. Breslow, J.L., Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle, éd. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7^e éd. McGraw-Hill, New York, USA, 1995; pp. 2031-2052.
182. Ng, N.S., Leiter, L.A., Vezina, C., Connelly, P.W., Hegele, R.A., Apolipoprotein A-I Q[-2]X causing isolated apolipoprotein AI deficiency in a family with analphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1994; 93:223-229.
183. Ordovas, J.M., Cassidy, D.K., Civeira, F., Bisgaier, C.L., Schaefer, E.J., Familial apolipoprotein A-I, C-III and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem* 1989; 264:16339-16342.
184. Moriyama, K., Sasaki, J., Takada, Y., Matsunaga, A., Fukui, J., Albers, J.J., Arakawa, K., A cysteine containing truncated apo AI variant associated with HDL deficiency. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1416-1423.
185. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P.H., Karas, M., Albers, J.J., Assmann, G., A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin:cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J Clin Invest* 1991; 87:371-376.
186. Romling, R., von Eckardstein A., Funke, H., Motti, C., Fragiaco, G.C., Nosedà, G., Assmann G., A nonsense mutation in the apolipoprotein A-I gene is associated with high-density lipoprotein deficiency and periorbital xanthelasmas. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1915-1922
187. Deeb, S.S., Cheung, M.C., Peng, R., Wolf, A.C., Stern, R., Albers, J.J., Knopp, R.H., A mutation in the human apolipoprotein A-I gene. Dominant effect on the level and characteristics of plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1991; 266:13654-13660.
188. Miccoli, R., Bertolotto, A., Navalesi, R., Odoguardi, L., Boni, A., Wessling, J., Funke, H., Wiebusch, H., von Eckardstein, A., Assmann, G., Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. *Circulation* 1996; 94:1622-1628.
189. Funke, H., von Eckardstein, A., Pritchard, P.H., Hornby, A.E., Wiebusch, H., Motti, C., Hayden, M.R., Dacet, C., Jacotot, B., Gerdes, U., Faegeman, O., Albers, J.J., Colleoni, N., Catapano, A., Frohlich, J., Assmann, G., Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *J Clin Invest* 1993; 91:677-683.

190. **Kuivenhoven, J.A., Pritchard, H., Hill, J., Frohlich, J., Assmann, G., Kastelein, J.**, The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J. Lipid Res* 1997; 38:191-205.
191. **Serfaty-Lacrosniere, C., Civiera, F., Lanzberg, A., Isaia, P., Berg, J., Janus, E.D., Smith, M.P. Jr., Pritchard, P.H., Frohlich, J., Lees, R.S.**, Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atheroscler* 1994; 107:85-98
192. **Assmann, G., von Eckardstein, A., Brewer, H.B. Jr.**, Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly & D. Valle, éd. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7^e éd. McGraw-Hill, New York, USA, 1995; pp. 2053-2072.
193. **Ma, Y., Henderson, H.E., Murthy, V., Roederer, G., Monsalve, M.V., Clarke, L.A., Normand, T., Julien, P., Gagné, C., Lambert, M.**, A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 1991; 324:1761-1766.
194. **Hirano, K., Yamashita, S., Nakajima, N., Arai, T., Maruyama, T., Yoshida, Y., Ishigami, M., Sakai, N., Kameda-Takemura, K., Matsuzuwa, Y.**, Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1053-1059
195. **Calabresi, L., Franceschini, G.**, High density lipoprotein and coronary heart disease: insights from mutations leading to low high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:219-224.
196. **Vigushin, D.M., Gough, J., Allan, D., Algaunal, A., Penne, B., Pettigrew, N.M.**, Familial nephropathy amyloidosis. *Quarterly J Med*. 1994; 87:149-154.
197. **Soutar, A.K.**, Systemic amyloidosis Arg 26 apo AI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7389-7393.
198. **Miccoli, R., Zhu, Y., Daum, U., Wessling, J., Huang, Y., Navalesi, R., Assmann, G., von Eckardstein, A.**, A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I(L141R)_{Pisa}, interferes with the formation of α -high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre β_1 -HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. *J Lipid Res* 1997; 38:1242-1253.
199. **von Eckardstein, A., Funke, H., Henke, A., Altland, K., Benninghoven, A., Assmann, G.**, Apolipoprotein A-I variants. Naturally occurring substitutions of proline residues affect plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J Clin Invest* 1989; 84:1722-1730.
200. **Remaley, A.T., Schumacher, J.A., Farsi, J.A., Nazih, B.D., Brewer, H.B. Jr.**, Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effects of brefeldin on lipid efflux. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1813-1821.

201. **Marcil, M., Boucher, B., Frohlich, J., Davignon, J., Solymoss, B.C., Genest, J. Jr,** Severe Familial HDL deficiency in French Canadian kindred: biochemical and molecular characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:1015-1024.
202. **Batal, R., Tremblay, M., Krimbou, L., Mamer, O., Davignon, J., Genest, J. Jr, Cohn, J.S.,** Familial deficiency characterized by hypercatabolism of mature apoA-I but not proapoA-I. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:655-666.
203. **Frederickson, D.S., Altrocchi, P.H., Avioli, L.V., Goodman, D.W.S., Goodman, H.C.,** Tangier disease: combined clinical staff conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1961; 55:1016-1031.
204. **Cheung, M.C., Mendez, A.J., Wolf, A.C., Knopp, R.H.,** Characterization of apolipoprotein A-I and A-II-containing lipoproteins in a new case of high density lipoprotein deficiency resembling Tangier disease and their effects on intracellular cholesterol efflux. *J Clin Invest* 1993; 19:522-529.
205. **Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannu, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T.Y., Liscum, L., Table, D.A.,** Neimann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 277:228-231.
206. **Huang, Y., von Eckardstein, A., Wu, S., Maeda, N., Assmann, G.,** A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with γ mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1834-1838.
207. **Krimbou, L., Tremblay, M., Davignon, J., Cohn, J.,** Characterization of human plasma apolipoprotein E-containing lipoproteins in the HDL size range: focus on pre- β_1 -LpE, pre- β_2 -LpE and α -LpE. *J Lipid Res* 1997; 38:35-48.
208. **von Eckardstein, A., Huang, Y., Wu, S., Funke, H., Nosedá, G., Assmann, G.,** Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:691-703.
209. **Schaefer, E.J., Levy, R.I.,** Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *New Eng J Med* 1985; 312:1300-1310.
210. **Landschultz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., Hobbs, H.H.,** Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 1996; 98:984-995.
211. **Rigotti, A., Acton, S.L., Krieger, M.,** The class B scavenger receptors SR-BI and CD-36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995; 270:16221-16224.

212. Bruckert, E., von Eckardstein, A., Funke, H., Beucler, I., Wiebusch, H., Turpin, G., Assmann, G., The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-I_{Milano}. *Atherosclerosis* 1997; 128:121-128.
213. Zannis, V.I., Lees, A.M., Lees, R.S., Breslow, J.L., Abnormal apolipoprotein A-I isoprotein composition in patients with Tangier disease. *J Biol Chem* 1982; 257:4978-4986.
214. Brewer, H.B. Jr., Fairwell, T., Meng, M.S., Kay, L., Ronan, R., Human proapoA-I_{Tangier}: isolation of proapoA-I_{Tangier} and amino acid sequence of the propeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113:934-940.
215. Bojanovski, D., Gregg, R.E., Brewer, H.B. Jr., Tangier disease: In vitro conversion of proapoA-I_{Tangier} to mature apoA-I_{Tangier}. *J Biol Chem* 1984; 259:6049-6051.
216. Schaefer, E.J., Blum, C.B., Levy, R.I., Jenkins, L.L., Alaupovic, P., Foster, D.M., Brewer, H.B. Jr., Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. *N Engl J Med* 1978; 299:905-910.
217. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. John Hopkins University Baltimore, MD. MIM: #144250:1994. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
218. Goldstein, J.L., Schrott, H.G., Hazzard, W.R., Bierman, E.L., Motulsky, A.G., Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52:1544-1568.
219. Brunzell, J.D., Albers, J.J., Chait, A., Grundy, S.M., Groszek, E., McDonald, G.B., Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983; 24:147-155.
220. Rauh, G., Schuster, H., Muller, B., Schewe, S., Keller, C., Wolfram, G., Zollner, N., Genetic evidence from 7 families that apolipoprotein B gene is not involved in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1990; 83:81-87.
221. Cortner, J.A., Coates, P.M., Bennett, M.J., Cryer, D.R., Le, N.-A., Familial combined hyperlipidemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very low density apolipoprotein B by the liver. *J Inherited Metab Dis* 1991; 14:915-922.
222. Venkatesan, S., Cullen, P., Pacy, P., Halliday, D., Scott, J., Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent bases for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1110-1118.

223. Jarvik, G.P., Brunzell, J.D., Austin, M.A., Krauss, R.M., Motulsky, A.G., Wijsman, E., Genetic predictors of FCHL in four large pedigrees: Influence of apoB level major locus predicted genotype and LDL subclass phenotype. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1687-1694.
224. Bredie, S.J.H., Kiemeneij, L.A., de Haan, A.F.J., Demacker, P.N.M., Stalenhoef, A.F.H., Inherited susceptibility determines the distribution of dense low-density lipoprotein subfraction profiles in familial combined hyperlipidemia. *Am J Hum Genet* 1996; 58:812-822.
225. Babirak, S.P., Brown, B.G., Brunzell, J.D., Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:1176-1183.
226. Nevin, D.N., Brunzell, J.D., Deeb, S.S., The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:869-873.
227. Gagné, É., Genest, J., Zhang, L.H., Clarke, L.A., Hayden, M.R., Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1250-1257.
228. Allayee, H., Aouizerat, B.E., Cantor, R.M., Dallinga-Thie, G.M., Krauss, R.M., Lanning, C.D., Rotter, J.I., Lusic, A.J., de Bruin, T.W.A., Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype. *Am J Hum Gen* 1998; 63 :577-585.
229. Hayden, M.R., Kirk, H., Clark, C., Frohlich, J., Rabkin, S., McLeod, R., Hewitt, J., DNA polymorphisms in and around the apoAI-CIII genes and genetic hyperlipidemias. *Am J Hum Genet* 1987; 40:421-430.
230. Galton, D.J., Molecular genetics of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 1988; 18:219-225.
231. Ordovas, J.M., Civeira, F., Genest, J.R., Craig, S., Robbins, A.H., Meade, T., Pocovi, M., Frossard, P.M., Masharani, U., Wilson, P.W.F., Salem, D.N., Ward, R.H., Schaefer, E.J., Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991; 87:75-86.
232. Paulweber, B., Friedl, W., Krempler, F., Humphries, S.E., Sandhofer, F., Genetic variation in the apolipoprotein A-I C-III A-IV gene cluster and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1988; 73:125-133.
233. Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., Gerdes, L.U., Faergeman, O., Humphries, S.E., Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993; 100:157-169.

234. **Wijsman, E.M., Motulsky, A.G., Guo, S.W., Yang, M., Austin, M.A., Brunzell, J.D., Deeb, S.,** Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apo AI-CIII-AIV gene complex. *Circulation* 1992; 86:1-420.
235. **Dallinga-Thie, G.M., Bu, X.D., van Linde-Sibenius Trip, M., Rotter, J.I., Lusic, A.J., de Bruin, T.W.A.,** Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: Effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res* 1996; 37:136-147.
236. **Dallinga-Thie, G.M., van Linde-Sibenius Trip, M., Rotter, J.I., Cantor, R.M., Bu, X.-D., Lusic, A.J., de Bruin, T.W.A.,** Complex genetic contribution of the apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1997; 99:953-961.
237. **Franceschini, G.,** Apolipoprotein function in health and disease. Insights from natural mutations. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:733-746.
238. **Funke, H.,** Genetic determinants of high density lipoprotein levels. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:189-196.
239. **Assmann, G., von Eckardstein, A., Funke, H.,** High density lipoproteins, reverse transport of cholesterol, and coronary artery disease. Insights from mutations. *Circulation* 1993; 87(suppl. III):III-28-III-34.
240. **Karathanasis, S.K., Ferris, E., Haddad, I.A.,** DNA inversion with the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7198-7202.
241. **Schmitz, G., Robenek, H., Lohmann, U., Assmann, G.,** Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: Biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis, and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J* 1985; 4:613-622.
242. **Alam, R., Yatsu, F.M., Tsui, L., Alam, S.,** Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: Possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1004:292-299.
243. **Schmitz, G., Assmann, G., Robenek, H., Brennhause, B.,** Tangier disease: A disorder of intracellular membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6305-6309.
244. **Frederickson, D.S., Altrocchi, P.H., Avioli, L.V., Goodman, D.W.S., Goodman, H.C.,** Tangier disease: combined clinical staff conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1961; 55:1016-1031.
245. **Kwiterovich, P.O. Jr,** Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4:133-143.

246. Venkatesan, S., Cullen, P., Pacy, P., Halliday, D., Scott, J., Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1110-1118.
247. Grundy, S.M., Chait, A., Brunzell, J.D., Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* 1987; 7:203-207.
248. Kwiterovich, P.O. Jr, Motevalli, M., Miller, M., Acylation-stimulatory activity in hyperapobetalipoproteinemic fibroblasts: enhanced cholesterol esterification with another serum basic protein, BPII. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:8980-8984.
249. Kwiterovich, P.O. Jr, Motevalli, M., Miller, M., Abnormal stimulation of cholesteryl ester mass in hyperapoB fibroblasts by basic protein II [abstract]. *Circulation* 1992; 86:I-1.
250. Kwiterovich, P.O. Jr, Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4:133-143.
251. Cianflone, K.M., Sniderman, A.D., Walsh, M.J., Vu, H.T., Gagnon, J., Rodriguez, M.A., Purification and characterization of acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 1989; 264:426-430.
252. Cianflone, K.M., Maslowska, M.H., Sniderman, A.D., Impaired response of fibroblasts from patients with hyperapobetalipoproteinemia to acylation-stimulating protein. *J Clin Invest* 1990, 85:772-730.
253. Eberhart, G.P., Mendez, A.J., Freeman, M.W., Decreased cholesterol efflux from fibroblasts of a patient without Tangier disease, but with markedly reduced high density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:836-846.
254. Oram, J., Cholesterol trafficking in cells. *Curr Opin Lipidol* 1990; 1:416-421.
255. Johnson, W.J., Mahlberg, F.H., Rothblat, G.H., Phillips, M.C., Cholesterol transport between cells and high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1085:273-298.
256. Walter, M., Reinecke, H., Nofer, J.-R., Seedorf, U., Assmann, G., HDL₃ stimulates multiple signaling pathways in human skin fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1975-1986.
257. Mendez, A.J., Uint, L., Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus. *J Lipid Res* 1996; 37:2510-2524.
258. Hokland, B.M., Slotte, J.P., Bierman, E.L., Oram, J.F., Cyclic AMP stimulates efflux of intracellular sterol from cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 1993; 268:25343-25349.

259. Heinen, R.S., Herbert, P., Fredrickson, D.S., Forte, T., Lindgren, F.T., Properties of the plasma very low and low density lipoproteins in Tangier disease. *J Clin Invest* 1978; 61:120.
260. Wang, C.-S., Alaupovic, P., Gregg, R.E., Brewer, H.B. Jr, Studies on the mechanism of hypertriglyceridemia in Tangier disease. Determination of plasma lipolytic activities, k_1 values and apolipoprotein composition of the major lipoprotein density classes. *Biochim Biophys Acta* 1987; 920:9-19.
261. Alaupovic, P., Knight-Gibson, C., Wang, C.-S., Downs, D., Koren, E., Brewer, H.B. Jr, Gregg, R.E., Isolation and characterization of an apoA-II containing lipoprotein (Lp-A-II:B) complex from plasma very low density lipoproteins of patients with Tangier disease and type V hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 1991; 32:9-19.
262. Fidge, N.H., Nestel, P.J., Identification of apolipoproteins involved in the interaction of human high-density lipoproteins₃ with receptors on cultured cells. *J Biol Chem* 1985; 260:3570-3575.
263. Schmitz, G., Niemann, R., Brennhansen, B., Krause, R., Assmann, G., Regulation of high-density lipoprotein receptors in cultured macrophages. *EMBO J* 1985; 4:2773-2779.
264. Graham, D.L., Oram, J.F., Identification and characterization of a high-density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting. *J Biol Chem* 1987; 262:7439-7442.
265. Keso, L., Lukka, M., Ehnholm, C., Baumann, M., Vihko, P., Olkinuora, M., Apolipoprotein A-I binding protein from human term placenta. Purification and partial characterization. *FEBS Lett* 1987; 205:105-108.
266. Kambouris, A.M., Roach, R.D., Nestel, P.J., Demonstration of a high density lipoprotein (HDL-) binding protein in HepG2 cells using colloidal gold conjugates. *FEBS Lett* 1988; 230:176-180.
267. Tozuka, M., Fidge, N.H., Purification and characterization of two high-density lipoprotein-binding proteins from rat and human liver. *Biochem J* 1989; 261:239-244.
268. Barbaras, R., Puchois, P., Fruchart, J.-C., Pradines-Figueres, A., Ailhaud, G., Purification of an apolipoprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem J* 1990; 269:767-773.
269. Ferreri, K., Menon, K.M.J., Detection of a 58 kilodalton high density lipoprotein binding protein in the membrane fraction of luteinized rat ovaries. *Endocrinology* 1990; 126:2137-2144.
270. Bond, H.M., Morrone, G., Venuta, S., Howell, K.E., Characterization and purification of proteins which bind high density lipoproteins. A putative cell surface receptor. *Biochem J* 1991; 279:633-641

271. Chiu, D.S., Oram, J.F., LeBoeuf, R.C., Alpers, C.E., O'Brien, D., High-density lipoprotein-binding protein (HBP)/vigilin is expressed in human atherosclerotic lesions and colocalizes with apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2350-2358.
272. Oram, J.F., Brinton, E.A., Bierman, E.L., Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1983; 72:1611-1621.
273. Oppenheimer, M.J., Oram, J.F., Bierman, E.L., Down regulation of high density lipoprotein receptor activity of cultured fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Arteriosclerosis* 1987; 7:325-332.
274. Oppenheimer, M.J., Oram, J.F., Bierman, E.L., Up regulation of high density lipoprotein receptor activity by gamma-interferon associated with inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem* 1988; 263:19318-19323.
275. Francone, O.L., Gurakar, A., Fielding, C.J., Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyl-transferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. *J Biol Chem* 1989. 264:7066-7072.
276. Brasaemle, D.L., Attie, A.D., Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 1990; 31:103-112.
277. Liscum, L., Dahl, N.K., Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 1992; 33:1239-1253.
278. Aviram, M., Bierman, E.L., Oram, J.F., High density lipoprotein stimulates sterol translocation between intracellular and plasma membrane pools in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res* 1989; 30:65-76.
279. Rothblat, G.H., Mahlberg, F.H., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1992; 33:1091-1098.
280. Oram, J.F., Yokoyama, S., Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996; 37:2473-2491.
281. Rubin, E.M., Krauss, R.M., Spangler, E.A., Verstuyft, J.G., Clift, S.M., Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I. *Nature* 1991; 353:265-267.
282. Barchiesi, B.J., Eckel, R.H., Ellis, P.P., The cornea and disorders of lipid metabolism. *Surv Ophthalmol* 1991; 36:1-22.
283. Norum, R.A., Lakier, J.B., Goldstein, S., Angel, A., Goldberg, R.B., Block, W.D., Nofze, D.K., Dolphin, P.J., Edelglass, J., Bogorad, D.D., Alaupovic, P., Familial deficiency of apolipoproteins A-I and C-III and precocious coronary heart disease. *N Engl J Med* 1982; 306:1513-1519.

284. Karathanasis, S.K., Ferris, E., Haddad, I.A., DNA inversion with the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7198-202.
285. Matsunaga, T., Hiasa, Y., Yanagi, H., Maeda, T., Hattori, N., Yamakawa, K., Yamanouchi, Y., Tanaka, I., Obara, T., Hamaguchi, H., Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2793-2797.
286. Schmitz, G., Brüning, T., Williamson, E., Nowicka, G., The role of reverse cholesterol transport and its disturbances in Tangier disease and HDL deficiency with xanthomas. *Eur Heart J* 1990; 11(suppl. E):197-211.
287. von Eckardstein, A., Huang, Y., Wu, S., Funke, H., Nosedá, G., Assmann, G., Uptake, transfer and esterification of cell-derived cholesterol in plasma of patients with familial HDL-deficiency. *Atherosclerosis* 1994; 109:232.
288. Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, É., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J.A., Comprehensive genetic map of the human genome based on 5 264 microsatellites. *Nature* 1996; 380:152-154.
289. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.-H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O.F., Loubser, O., Ouellette, B.F.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J.D., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J.P., Genest, J. Jr, Hayden, M.R., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genet* 1999; 22:336-344.
290. Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S.M., Roomp, K., Zhang, L.H., Yu, L., Collins, J.A., van Dam, M., Molhuizen, H.O., Loubster, O., Ouellette, B.F., Sensen, C.W., Fichter, K., Mott, S., Denis, M., Boucher, B., Pimstone, S., Genest, J. Jr., Kastelein, J.J., Hayden, M.R., Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 1999; 354:1341-1346.
291. Higgins, C.F., ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:67-113.
292. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. John Hopkins University Baltimore, MD. MIM: #600046:1999. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
293. Zielenski, J., Tsui, L.C., Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29 :777-807.
294. Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., Aubourg, P., Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361:726-30.

295. Gartner, J., Moser, H., Valle, D., Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet* 1992;1:16-23.
296. Bull, L.N., van Eijk, M.J., Pawlikowska, L., DeYoung, J.A., Juijn, J.A., Liao, M., Klomp, L.W., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B.F., Knisely, A.S., Houwen, R.H., Freimer, N.B., A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998;18:219-224.
297. Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N.F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K.L., Lewis, R.A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., Lupski, J.R., A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;15:236-246.
298. Allikmets, R., Shroyer, N.F., Singh, N., Seddon, J.M., Lewis, R.A., Bernstein, P.S., Peiffer, A., Zabriskie, N.A., Li, Y., Hutchinson, A., Dean, M., Lupski, J.R., Leppert, M., Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997;277:1805-1807.
299. Cremers, F.P., van de Pol, D.J., van Driel, M., den Hollander, A.I., van Haren, F.J., Knoers, N.V., Tijmes, N., Bergen, A.A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A.J., Deutman, A.F., Hoyng, C.B., Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 1998;7:355-362.
300. Hirano K., Yamashita S., Nakajima N., Arai T., Maruyama T., Yoshida Y., Ishigami M., Sakai N., Kameda-Takemura K., Matsuzawa Y., Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1053-1059.
301. Zhong S., Sharp D.S., Grove J.S., Bruce C., Yano K., Curb J.D., Tall A.R., Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97:2917-2923.
302. Miida T., Inano K., Nakamura Y., Matsuto T., Hoshiyama M., Kaneko K., Okada M., Abnormality of HDL subfractions in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Rinsho Byori* 1996; 44:865-870.
303. Chiba H., Akita H., Kotani K., Kanno T., Manabe M., Complete cholesteryl ester transfer protein deficiency increases oxidized-LDL in plasma. *Rinsho Byori* 1997; 45:55-57.