

Université de Montréal

**Déficit familial de la LCAT au Québec: description
d'une première mutation et contribution du génotype de
l'*APO E* sur le phénotype lipoprotéique**

Par :

Alexis Baass

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)

En Sciences Biomédicales

Déposé, Décembre 2009

© Alexis Baass, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Déficit familial de la LCAT au Québec: description
d'une première mutation et contribution du génotype de
l'*APO E* sur le phénotype lipoprotéique**

Présenté par :

Alexis Baass

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D^f. May Faraj : Président-rapporteur

D^f. Robert Dufour : Directeur de recherche

D^f. Pierre Larochelle : Codirecteur

D^f. Jean Bergeron : Membre du jury

SOMMAIRE

Le déficit familial de LCAT (FLD) est une maladie caractérisée par un défaut de l'activité de l'enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT). Ce défaut résulte en une concentration plasmatique de C-HDL extrêmement basse, des opacités cornéennes prématurées, la présence d'anémie, de protéinurie et d'insuffisance rénale. Nous avons identifié les premiers patients canadiens-français atteints de déficit familial de LCAT. Deux frères, présentant les signes classiques de FLD étaient homozygotes pour une nouvelle mutation du gène de la LCAT: la mutation c.102delG. Cette mutation se traduit au niveau protéique par un changement du cadre de lecture au niveau du codon His35 et l'insertion d'un codon stop en position 61 entraînant une abolition de l'activité LCAT *in vitro* et *in vivo*.

La présence de cette mutation cause une réduction importante du C-HDL chez les hétérozygotes (22%) et les homozygotes (88%) ainsi qu'une baisse du C-LDL chez les hétérozygotes (35%) et les homozygotes (58%). De plus, le profil lipidique différait de manière importante entre les deux frères atteints de FLD qui présentaient des génotypes *APOE* différents. Nous suggérons que *APOE* est un gène qui modifie le phénotype du FLD et pourrait expliquer l'hétérogénéité des profils lipidiques chez les patients atteints de FLD. Nos résultats suggèrent également que l'association du génotype *LCAT*^{-/-} a un allèle *APOE* ε2 est un nouveau mécanisme conduisant à la dysbétalipoprotéinémie.

Finalement nous avons montré des différences importantes dans les sous-populations des HDL chez les deux sujets atteints de FLD. Le porteur de l'allèle *APOE* ε2 présentait une proportion beaucoup plus importante de HDL immatures (preβ discoïdaux) par rapport à son frère (77.9% vs. 31.0%).

Mots-clés :

Mutation, 102delG, LCAT, FLD, HDL, LpX, dysbétalipoprotéinémie, *APOE*.

ABSTRACT

Familial LCAT deficiency (FLD) is a disease characterized by a defect in the enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) resulting in low HDL-C, premature corneal opacities, anaemia as well as proteinuria and renal failure. We have identified the first French Canadian kindred with familial LCAT deficiency. Two brothers, presenting classical signs of FLD, were shown to be homozygous for a novel *LCAT* mutation. This c.102delG mutation occurs at the codon for His35 and causes a frameshift that stops transcription at codon 61 abolishing LCAT enzymatic activity both *in vivo* and *in vitro*. It has a dramatic effect on the lipoprotein profile, with an important reduction of HDL-C in both heterozygotes (22%) and homozygotes (88%) and a significant decrease in LDL-C in heterozygotes (35%) as well as homozygotes (58%). Furthermore, the lipoprotein profile differs markedly between the two affected brothers who had different *APOE* genotypes. We propose that *APOE* could be an important modifier gene explaining heterogeneity in lipoprotein profiles observed among FLD patients. Our results suggest that a *LCAT*^{-/-} genotype associated with an *APOE* ε2 allele could be a novel mechanism leading to dysbetalipoproteinemia. Finally we have identified major differences in the HDL sub-populations of both subjects affected by FLD. The carrier of the *APOE* ε2 allele presented a much higher proportion of immature HDL particles (discoid preβ) compared to his brother (77.9% vs. 31.0%).

Key words :

Mutation, 102delG, LCAT, FLD, HDL, LpX, dysbetalipoproteinemia, APOE.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
DÉDICACE	xii
REMERCIEMENTS	xiii
IMPLICATION DES AUTEURS	xiv
AVANT PROPOS	xvi
CHAPITRE I : Introduction	1
1. Lipides et santé cardiovasculaire	1
2. Lipoprotéines	4
2.1. Structure générale des lipoprotéines.....	4
2.2. Classes de lipoprotéines.....	4
2.3. Métabolisme des lipoprotéines.....	5
2.3.1. La voie intestinale.....	5
2.3.2. Voie hépatique.....	7
3. La dysbêtalipoprotéïnémie	9
3.1. Apo E.....	9
3.2. Génétique de la dysbêtalipoprotéïnémie.....	10
3.3. Caractéristiques biochimiques et cliniques.....	10
3.4. Traitement.....	11
4. Les HDL	12
4.1. Composition des HDL.....	12
4.1.1. Composition lipidique.....	12
4.1.2. Composition protéique.....	12
4.2. Caractéristiques physiques et chimiques des HDL.....	13
4.2.1. Densité.....	13
4.2.2. Taille et forme.....	14
4.2.3. Migration électrophorétique.....	14
4.3. Métabolisme des HDL.....	15
4.3.1. Genèse des HDL.....	15
4.3.2. Catabolisme des HDL.....	17
4.4. Génétique des HDL.....	18
4.5. Les hypoalphalipoprotéïnémies monogéniques.....	19

4.5.1. Mutation de l'apo A-I	19
4.5.2. Mutation de l'ABCA1	19
4.5.3. Mutation de la LPL	20
4.5.4. Mutations de la LCAT	20
5. LCAT (Lecithin :cholesterol acyltransferase).....	21
5.1. Historique.....	21
5.2. Structure de la protéine LCAT.....	21
5.3. Activité enzymatique de la LCAT	22
5.4. Génétique de la LCAT	23
6. Déficit familial de LCAT (Familial LCAT Deficiency ou FLD)	25
6.1. Généralités	25
6.2. Fish Eye Disease (FED).....	25
6.3. Caractéristiques biochimiques du FLD.....	26
6.3.1. Mesure de l'activité de la LCAT	26
6.3.2. Mesure de la masse de la LCAT	26
6.4. Classification des déficits de LCAT	27
6.5. Lipoprotéines	28
6.5.1. Anomalies des lipoprotéines de basse densité	28
6.5.2. Anomalies des lipoprotéines de haute densité	30
6.5.3. Profil lipidique	30
6.6. Signes et symptômes cliniques du FLD.....	31
6.6.1. Atteinte ophtalmologique.....	31
6.6.2. Atteinte hématologique.....	32
6.6.3. Atteinte rénale.....	32
6.6.4 Atteinte cardiovasculaire	33
6.6.5 Atteinte des autres systèmes	34
6.7 Traitement du FLD	34
CHAPITRE II: Characterization of a new <i>LCAT</i> mutation causing familial LCAT deficiency (FLD) and the role of <i>APOE</i> as a modifier gene of the FLD phenotype.....	35
7. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE.....	36
7.1 Premier objectif.....	36
7.2 Second objectif.....	36
8. ABSTRACT.....	37
9. INTRODUCTION.....	38
10. MATERIALS AND METHODS	40
10.1 Subjects	40
10.2 Genetic analysis	41
10.3 Biochemical analysis	42
10.4 Measurement of LCAT activity	42
10.5 Electrophoresis and chromatography.....	43
11. RESULTS	43
11.1 Genetic analysis	43

11.2 Measurement of LCAT activity	45
11.3 Biochemical analysis	46
11.4 Lipoprotein electrophoresis and chromatography	47
12. DISCUSSION	48
CHAPITRE III: Impact de la dysbétalipoprotéïnémie sur la distribution des sous-familles de HDL chez les patients atteints de FLD	53
13. Introduction.....	54
14. Matériel et méthodes.....	55
14.1. Sujets.....	55
14.2. Électrophorèse en deux dimensions du HDL.....	55
15. Résultats.....	56
16. Discussion.....	57
CHAPITRE IV : CONCLUSION.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	61
PUBLICATIONS ET PRÉSENTATIONS	xvii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Facteurs de risque cardiovasculaire	1
Tableau II.	Composition lipidique et protéique des lipoprotéines	5
Tableau III.	Fréquence et caractéristiques biochimiques des isoformes d'apo E	9
Tableau IV.	Classification des déficits de la LCAT	27
Tableau V.	Profils lipidiques de patients atteints de FLD.	31
Table VI.	Lipid parameters of unaffected, heterozygote and homozygote family members for the 102delG <i>LCAT</i> mutation.	45
Table VII.	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> LCAT activity of two unaffected, two heterozygote and two homozygote kindred for the 102delG <i>LCAT</i> mutation.	46
Tableau VIII.	Quantification des sous-populations de HDL chez un sujet témoin (contrôle) et chez deux patients atteints de FLD.	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Le C-HDL et risque cardiovasculaire dans l'étude de Framingham	2
Figure 2.	Structure générale d'une lipoprotéine	4
Figure 3.	Métabolisme des lipoprotéines de la voie intestinale	6
Figure 4.	Métabolisme des lipoprotéines de la voie hépatique	8
Figure 5.	Électrophorèse des lipoprotéines.	11
Figure 6.	Forme et taille des particules de HDL.	14
Figure 7.	Séparation des lipoprotéines par électrophorèse en 2D	15
Figure 8.	Métabolisme des HDL	17
Figure 9.	Principaux gènes expliquant la variabilité des concentrations de C-HDL	18
Figure 10.	Structure tertiaire prédite de la LCAT	22
Figure 11.	Activité enzymatique de la LCAT.	23
Figure 12a.	Mutations de <i>LCAT</i> causant le déficit familial de LCAT. ...	24
Figure 12b.	Mutations de <i>LCAT</i> causant la maladie des yeux de poisson	24
Figure 13.	Classification des déficits de la LCAT	27
Figure 14.	Lipoprotéine.....	29
Figure 15.	Lipoprotéines de haute densité.....	30
Figure 16.	Caractéristiques cliniques du FLD.....	32
Figure 17.	Pedigree of a French Canadian family with familial LCAT deficiency.....	44
Figure 18	Characterization of lipoproteins.....	47
Figure 19.	Proposed role of the APOE ϵ 2 allele in the hypertriglyceridemic FLD phenotype.....	51
Figure 20.	Séparation des sous populations de HDL chez un sujet témoin (contrôle) et chez deux patients atteints de FLD.	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1:	ATP-binding cassette A1
ABCG1:	ATP-binding cassette G1
ABCG5/G8:	ATP-binding cassette G5/G8
ACAT:	Acetyl-CoA:Cholesterol Acyl Transferase
Apo:	Apolipoprotéine
ApoBec-1:	Apo B editing complex-1
ARNm:	ARN messenger
C-HDL:	Cholestérol de la fraction 'High Density Lipoprotein'
C-LDL:	Cholestérol de la fraction 'Low Density Lipoprotein'
CETP:	Cholesterol ester transfer protein
GALNT:	Galactosamine:polypeptide acetylgalactosaminyltransferase
FED:	Fish eye disease
FLD:	Familial LCAT deficiency
HL:	Lipase hépatique
IEF:	Isoelectric Focusing
IDL:	Intermediate density lipoprotein
LCAT:	Lecithin:cholesterol acyl transferase
LDL-R:	Récepteur des LDL
LIPC:	Gène de la lipase hépatique
LIPG:	Gène de la lipase endothéliale
LPL:	Lipase lipoprotéique
LpX:	Lipoprotéine X
LRP:	LDL Receptor Related Protein
MTTP:	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
MVK:	Mevalonate kinase
NPC1L1:	Niemann-Pick C1-like 1
PCSK9:	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PLTP:	Phospholipid Transfer Protein

SRB1:	Scavenger Receptor type B1
TG:	Triglycérides
VLDL:	Very low density lipoprotein
VLDL-R:	Récepteur des VLDL
WVOX :	WW domain containing oxydoreductase

DÉDICACE

A ma famille :

Mon père Karsten Baass

Ma mère Béatrice Baass

Ma sœur Patricia Baass

Mon frère Nicolas Baass

Ma conjointe Fabienne Parente

Mon fils Olivier Baass

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le **Dr. Robert Dufour** de m'avoir permis de travailler sur ce projet et de m'avoir communiqué son intérêt pour la recherche clinique.

J'aimerais également remercier le **Dr. Pierre Larochelle** d'avoir accepté d'assumer la codirection de ma maîtrise et de m'avoir permis de travailler sur des projets de recherche clinique.

Je tiens aussi à remercier le **Dr. Jean Davignon** dont l'aide a été précieuse pendant tout ce projet. Il m'a permis de profiter amplement de ses connaissances encyclopédiques.

L'aide technique et les conseils pratiques des technologistes du laboratoire du Dr. Davignon ont été précieux pour mon apprentissage. J'aimerais tout particulièrement remercier Monsieur **Michel Tremblay**.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide des infirmières de la clinique de nutrition métabolisme et athérosclérose de l'Institut de recherches cliniques de Montréal : Madame **Rina Riberdy** et Madame **Lise Patenaude**.

Finalement, je voudrais remercier Monsieur **Hanny Wassef** pour ses conseils et son aide technique dans l'analyse par chromatographie.

IMPLICATION DES AUTEURS

Alexis Baass

Résident en Biochimie Médicale et étudiant au programme MSc en Sciences Biomédicales (Université de Montréal):

- Organisation, gestion du projet et interprétation des données
- Suivi des patients
- Entrevue médicale des membres de la famille du prépositus et création de l'arbre généalogique
- Interprétation des séquences du gène LCAT
- Séparation des lipoprotéines par chromatographie et mesure des lipides plasmatiques
- Mesure de l'apo E plasmatique
- Mesure de l'activité LCAT
- Rédaction de l'article scientifique

Hanny Wassef

Étudiant au PhD en Médecine Expérimentale (Université McGill)

- Aide technique pour la séparation des lipoprotéines par chromatographie
- Aide technique pour la mesure de l'apo E plasmatique

Michel Tremblay

Technicien senior du laboratoire du Dr. Davignon (IRCM):

- Aide technique pour effectuer l'ultracentrifugation des lipoprotéines
- Aide technique pour effectuer l'électrophorèse des lipoprotéines
- Aide technique pour mesurer le cholestérol libre plasmatique

Lise Bernier

PhD (IRCM)

- Séquençage du gène LCAT chez le prépositus

Robert Dufour

MD, MSc., Directeur de la clinique des troubles lipidiques (IRCM)

- Directeur de maîtrise
- Conseils pratiques
- Supervision dans le suivi des patients

Jean Davignon

MD, MSc., Directeur du laboratoire d'hyperlipidémie et athérosclérose (IRCM)

- Conseils pratiques
- M'a permis d'utiliser l'infrastructure de son laboratoire

AVANT-PROPOS

Le présent mémoire consiste en quatre chapitres qui traitent du déficit familial de la LCAT. Le premier chapitre est, d'une part une introduction qui décrit brièvement le métabolisme des HDL, et d'autre part une revue de la littérature sur la fonction de la LCAT et sur le déficit familial de la LCAT.

Le second chapitre est composé d'un article scientifique publié dans la revue *Atherosclerosis* en 2009. Les résultats présentés dans cet article ainsi que la rédaction de l'article lui-même ont été effectués dans le cadre du programme de la formation en maîtrise en sciences biomédicales de l'Université de Montréal. Des changements mineurs ont été effectués à l'article pour tenir compte des recommandations du guide de présentation et d'évaluation des mémoires et des thèses de doctorat de la faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal. Ces changements ont été effectués uniquement dans le but de maintenir la clarté et la concision du mémoire et pour respecter les directives de l'article B.1.5 qui visent à harmoniser et à faciliter la présentation des mémoires et thèses à l'Université de Montréal.

Le troisième chapitre traite de l'étude des sous-populations de HDL chez deux patients atteints de déficit familial de LCAT, et de l'impact de la présence d'un allèle $\epsilon 2$ de *APOE* sur l'augmentation de la proportion de HDL immatures.

Enfin, le quatrième chapitre est une conclusion globale qui reprend les conclusions principales de cet ouvrage tout en présentant des perspectives de recherche future.

CHAPITRE I : Introduction

1. Lipides et santé cardiovasculaire

La maladie cardiovasculaire est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les sociétés industrialisées. Bien que la mortalité par évènement coronarien soit en diminution depuis les années 1970 suite à d'importantes campagnes de santé publique, la maladie cardiovasculaire reste un fardeau important pour nos sociétés (1). Les facteurs de risque de maladie cardiovasculaire ont été étudiés depuis plusieurs décennies. Entre autres, les vastes études épidémiologiques de Framingham (2), PROCAM (3), MONICA (4) et INTERHEART (5) ont démontré l'importance des paramètres lipidiques tel que le C-LDL (Cholestérol des Low Density Lipoprotein), l'apolipoprotéine B, le C-HDL (Cholestérol des High Density Lipoprotein) et l'apolipoprotéine A-I comme facteurs de prédiction des évènements coronariens (Tableau I).

Étude INTERHEART: Facteurs de risques expliquant 90% du risque d'évènement coronarien dans 52 pays

•Age	•Sexe
•Ratio apo B / apo A-I	•Obésité abdominale
•Tabagisme	•Alimentation (Fruits/légumes)
•Tension artérielle	•Niveau d'activité physique
•Consommation d'alcool	•Stress

Tableau I. Facteurs de risque cardiovasculaire (5)

De nombreuses études expérimentales utilisant des approches pharmacologiques (séquestrant des sels biliaires (6, 7), statines (8, 9)) ou diététiques (10) visant à baisser le cholestérol plasmatique ont montré que l'abaissement du C-LDL cause une baisse significative du risque cardiovasculaire. Il a été évalué qu'une diminution du C-LDL plasmatique de

1% est accompagnée d'une diminution du risque coronarien d'environ 2% (11). De plus, des études récentes ont démontré que les porteurs d'une mutation entraînant une perte de fonction du gène *PCSK9* (mutation R46L) qui conduit à une baisse du C-LDL de 15 % par rapport à des individus non porteurs contribue à une baisse du risque coronarien de 47 % (12). L'ensemble de ces données montre clairement l'importance du C-LDL comme facteur de risque majeur de la maladie cardiovasculaire.

L'impact du C-HDL comme élément protecteur de la maladie cardiovasculaire est moins bien établi. Les études épidémiologiques telles que les études de Framingham (2, 13) et de PROCAM (3) montrent qu'une concentration en C-HDL abaissée augmente le risque cardiovasculaire de 3 à 4 fois par rapport aux individus ayant une concentration en C-HDL élevée (Figure 1) et ceci de manière indépendante du LDL (14).

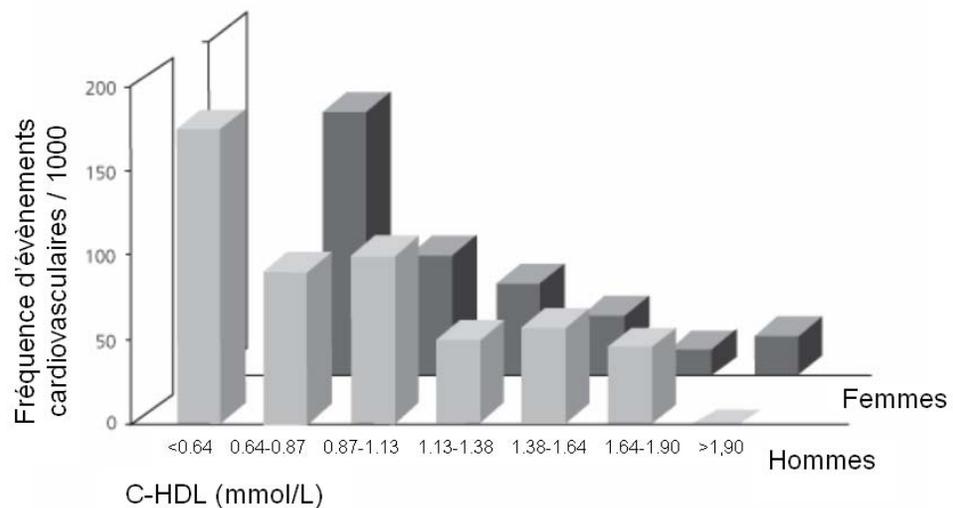


Figure 1. Le C-HDL et risque cardiovasculaire dans l'étude de Framingham (13)

L'étude interventionnelle VA-HIT (Veterans Affairs High Density Lipoprotein Intervention Trial) a démontré que l'utilisation d'un fibrate chez des individus coronariens avec des niveaux de C-LDL normaux entraîne une augmentation

des niveaux de C-HDL ainsi qu'une diminution significative du risque cardiovasculaire. Toutefois, les concentrations de C-HDL sont fortement et inversement corrélées aux concentrations de triglycérides plasmatiques, qui pourraient constituer une variable confondante (15). D'autres thérapies visant à augmenter le C-HDL de manière pharmacologique, tels que les inhibiteurs de la CETP, n'ont pas encore montré de manière claire une diminution du risque coronarien (16). Paradoxalement, l'étude de patients présentant des niveaux de C-HDL extrêmement abaissés secondairement à certaines maladies monogéniques (apo A-I-milano et déficit familial de LCAT discutés plus loin) indique que ceux-ci ne présentent pas d'augmentation du risque cardiovasculaire et étaient, dans certains cas, protégés contre l'infarctus cardiaque (17).

En fait, il semble que la relation entre le C-HDL et le risque cardiovasculaire soit plus complexe qu'imaginée initialement. Ceci est sans doute en partie dû au fait que les particules de HDL sont elles-mêmes beaucoup plus complexes et hétérogènes que les particules de LDL (voir section 4).

2. Lipoprotéines

2.1. Structure générale des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules composées de lipides et de protéines dont la fonction principale est le transport des lipides dans le sang (18). Étant donné que les lipides hydrophobes (triglycérides et esters de cholestérol) ou amphiphiles (phospholipides et cholestérol) sont transportés dans un milieu aqueux (le plasma), les lipoprotéines s'organisent pour former une interface entre ces deux milieux. En effet, les lipoprotéines contiennent une surface hydrophile en contact avec le plasma qui est composée des pôles polaires des phospholipides, du cholestérol et des apolipoprotéines ainsi que d'un noyau hydrophobe composé de triglycérides et d'esters de cholestérol (Figure 2).

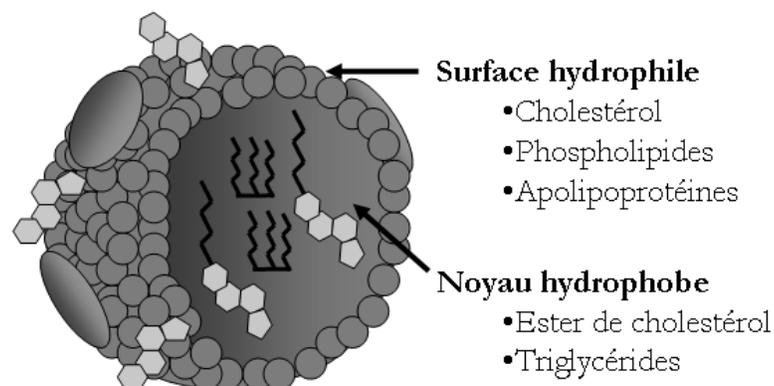


Figure 2. Structure générale d'une lipoprotéine

2.2. Classes de lipoprotéines

Les lipoprotéines sont généralement classées selon leur densité (18). Les lipoprotéines les moins denses sont les lipoprotéines riches en triglycérides : les chylomicrons et les VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Les lipoprotéines pauvres en triglycérides tel les LDL (Low Density Lipoprotein) et les HDL (High Density Lipoprotein) présentent une plus forte densité. Les chylomicrons sont surtout retrouvés en phase post prandiale, tandis que les VLDL, les LDL et les HDL sont les lipoprotéines majoritaires à jeun. Les caractéristiques

physiques ainsi que la composition des principales lipoprotéines sont présentées dans le tableau II (19).

Lipoprotéine	Densité (g/mL)	Mobilité	Composition (% du poids)					Apolipoprotéine
			Triglycéride	Phospholipide	Cholestérol	Cholestérol estérifié	Protéine	
HDL	1,063-1,21	α	2 - 7	26 - 32	3 - 5	15 - 20	45 - 55	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E, D, J
LDL	1,006-1,063	β	4 - 8	18 - 24	6 - 8	45 - 50	18 - 22	B-100
VLDL	0,98-1,006	Pré- β	45 - 65	15 - 20	4 - 8	16 - 22	6 - 10	B-100, E, C-I, C-II, C-III
Chylomicron	< 0,98	Nulle	80 - 95	3 - 6	1 - 3	2 - 4	1 - 2	A-I, A-IV, A-V, B-48, C-I, C-II, C-III, E

Tableau II. Composition lipidique et protéique des lipoprotéines (19)

La densité représente la densité à laquelle flottent les différentes lipoprotéines après une ultracentrifugation sur gradient de densité. La mobilité représente la mobilité électrophorétique des différentes lipoprotéines.

2.3. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines peut être divisé en plusieurs voies. La voie intestinale, qui permet le transport des lipides de l'intestin vers le foie ainsi que la voie hépatique, qui permet le transport des lipides du foie vers les autres organes. A ces deux voies importantes se rajoute la voie des HDL, qui permet le transport à rebours du cholestérol des organes vers le foie (20). Le métabolisme des HDL sera présenté plus loin.

2.3.1. La voie intestinale

La figure 3 récapitule les principales étapes du métabolisme des lipoprotéines de la voie intestinale. Après leur ingestion, les lipides alimentaires sont modifiés au niveau de l'intestin pour permettre leur absorption. La lipase pancréatique va hydrolyser les triglycérides alimentaires pour libérer des acides gras libres (21). Sous l'action des sels biliaires, les acides gras libres et

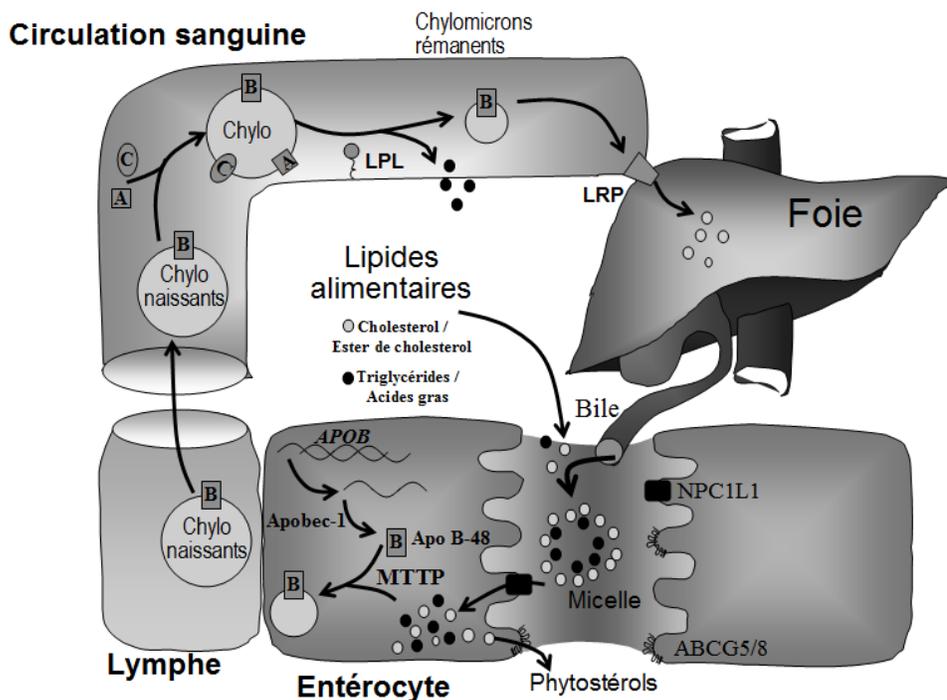


Figure 3. Métabolisme des lipoprotéines de la voie intestinale

Voir le texte de la section 2.3.1 pour l'explication de la voie métabolique et des abréviations.

le cholestérol alimentaire vont former des micelles qui faciliteront l'absorption intestinale des lipides (22). Les stérols alimentaires (cholestérol et phytostérols) sont absorbés par les entérocytes via le transporteur NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1). Le transporteur ABCG5/G8 (ATP-binding cassette G5/G8) va permettre le retour des phytostérols du cytosol vers la lumière intestinale et l'ACAT (Acetyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase) va catalyser l'estérification du cholestérol cytosolique (23). Au niveau des entérocytes, l'augmentation du cholestérol intra-cellulaire va causer l'augmentation de transcription de l'apo B. L'ARNm (ARN messenger) de l'apo B sera par la suite modifié par l'apobec-1 (apo B editing complex-1) qui permet la déamination d'une cytosine en uridine et l'insertion de manière post-transcriptionnelle d'un codon stop (UAA) dans l'ARNm de l'apo B (24). Celui-ci sera transcrit en une apolipoprotéine B tronquée de 264 kDa, nommée apo B-48, représentant 48% de la taille de l'apo

B hépatique (apo B-100). Sous l'action de la MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) l'apo B-48 sera lipidée par l'ajout de triglycérides et d'esters de cholestérol, ce qui conduira à la production d'un chylomicron naissant (25). Les chylomicrons naissants seront transportés vers la membrane cellulaire basale et excrétés dans la lymphe pour ensuite rejoindre le plasma via le canal thoracique. Au niveau plasmatique, ces chylomicrons naissants vont gagner plusieurs apolipoprotéines tel l'apo C-II, l'apo C-III et l'apo A-V. Dans la circulation sanguine, les chylomicrons vont lier la LPL (lipase lipoprotéique) présente au niveau de l'endothélium artériel (26). Cette dernière va catalyser la dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol. Les acides gras seront captés par les tissus tels que les muscles et les tissus adipeux. La perte de triglycérides va entraîner l'augmentation de la proportion d'esters de cholestérol des chylomicrons qui deviendront des chylomicrons rémanents. Ceux-ci pourront se lier au LRP (LDL Receptor Related Protein) hépatique qui va permettre leur internalisation et leur dégradation finale dans l'hépatocyte (26).

2.3.2. Voie hépatique

La figure 4 décrit les étapes du métabolisme des lipoprotéines qui proviennent de la voie hépatique. Au niveau de l'hépatocyte, l'augmentation du cholestérol cytosolique ou une augmentation des acides gras libres entraînent l'augmentation de la transcription du gène *APOB*. Étant donné que l'apobec-1 n'est pas exprimé au niveau du foie, ceci conduira à la traduction d'une protéine de poids moléculaire de 550 kDa nommée apo B-100. L'apo B-100 sera lipidée de manière co-traductionnelle via l'action de la MTTP pour former les VLDL naissantes (20). Celles-ci seront relâchées dans la circulation plasmatique où elles gagneront plusieurs apolipoprotéines telles que l'apo E et les apo C. Les VLDL circulantes vont lier la lipase lipoprotéique (principalement au niveau de l'endothélium des muscles et du tissu adipeux) et cette dernière va catalyser la

dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol (27). La perte de triglycérides va entraîner l'augmentation de la proportion de cholestérol des VLDL qui deviendront des VLDL rémanents ou IDL (Intermediate Density Lipoproteins). Les IDL pourront être captées par le foie via le LDL-R (LDL Receptor) et le LRP (LDL receptor related protein) ou être catabolisées par la lipase hépatique (HL). La lipase hépatique va hydrolyser les triglycérides et les phospholipides des IDL qui deviendront de plus en plus denses et vont perdre la majorité de leurs apolipoprotéines pour donner naissance aux LDL. Les LDL sont les principales lipoprotéines transportant le cholestérol plasmatique et vont être capturées par le récepteur aux LDL des tissus périphériques et du foie (28). La liaison du LDL à son récepteur va causer la migration du complexe LDL-LDL-R vers des puits de clathrine au niveau de la membrane des hépatocytes et ceux-ci seront internalisés. L'endosome va transporter le complexe LDL-LDL-R vers le lysosome où les LDL seront dégradés en cholestérol et acides gras. Le LDL-R pourra être recyclé à la membrane hépatocytaire ou être dégradé par la convertase PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) (29).

Circulation sanguine

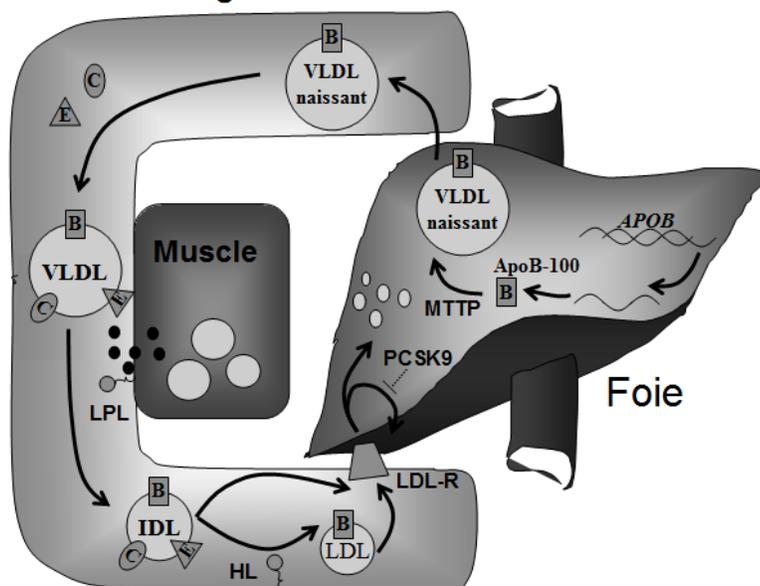


Figure 4. Métabolisme des lipoprotéines de la voie hépatique

Voir le texte de la section 2.3.2 pour l'explication de la voie métabolique et des abréviations.

3. La dysbêtalipoprotéinémie

La dysbêtalipoprotéinémie, ou dyslipidémie de type III selon la classification de Frederickson (30), est une hyperlipidémie mixte caractérisée par une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie secondaire à un défaut de l'apo E.

3.1. Apo E

Le gène de l'apo E est présent au niveau du groupe *APOE*, *APOC1*, *APOC1'*, *APOC2* sur le chromosome 19q13.2. C'est un gène de 3,5 kb constitué de 4 exons codant pour un peptide de 317 acides aminés. L'apo E est principalement produit par le foie mais aussi le cerveau, les reins et les surrénales. C'est un constituant majeur des chylomicrons, des VLDL et des IDL et un ligand pour le LDL-R, le LRP (LDL Receptor Related Protein) ainsi que les protéoglycans d'héparan sulfate. L'apo E joue également le rôle de modulateur de l'activité de la LPL et la lipase hépatique (31). Chez l'humain, trois principaux isoformes d'apo E ont été identifiés par IEF (Isoelectric Focusing) : l'apo E2, E3 et E4 (tableau III). L'apo E4 présente une affinité augmentée au récepteur LDL par rapport à l'apo E3. Ceci résulte en une augmentation du cholestérol intra-hépatocytaire causant une diminution de l'expression du LDLR et une hypercholestérolémie. L'inverse est vrai pour apo E2 qui présente une affinité moindre pour le LDLR (32).

Isoforme Apo E	Fréquence	Charge IEF	Substitution	Affinité relative au LDL-R	Cholestérol	Note
E4	15 %	+1	Cys ₁₁₂ →Arg	↑	↑	Risque augmenté Alzheimer
E3	75 %	0	—	—	—	—
E2	10 %	-1	Arg ₁₅₈ →Cys	↓	↓	Homozygote Dyslipidémie Type III

Tableau III. Fréquence et caractéristiques biochimiques des isoformes d'apo E (31)

3.2. Génétique de la dysbêtalipoprotéinémie

La vaste majorité des patients atteints de dysbêtalipoprotéinémie sont homozygotes pour l'allèle $\epsilon 2$ d'*APOE*. La fréquence observée d'hyperlipidémie de type III est de 0,01 % alors que 1% de la population est homozygote pour l'allèle $\epsilon 2$. La transmission de la dysbêtalipoprotéinémie se fait par un mode autosomal récessif et multifactoriel (33). L'expression de la maladie nécessite d'autres facteurs génétiques (mutations de la LPL) ou environnementaux tels que l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète ou l'hypothyroïdie. Ces facteurs vont contribuer au développement du phénotype de type III via: 1) une surproduction de VLDL, 2) une diminution de la lipolyse ou 3) une diminution de la capture des lipoprotéines rémanentes (IDL). Dans certains cas extrêmement rares, la dysbêtalipoprotéinémie s'exprime sous un mode autosomal dominant comme dans le cas de la mutation apo E3 Leiden (34).

3.3. Caractéristiques biochimiques et cliniques

La dysbêtalipoprotéinémie est causée par une diminution de la clairance des particules rémanentes des chylomicrons et des VLDL. Ceci se traduit par une augmentation plasmatique des IDL causant une hypercholestérolémie (>7.5 mmol/L), une hypertriglycéridémie (>2.0 mmol/L) et une augmentation de l'apo E plasmatique avec une baisse du C-LDL et du C-HDL. La moitié des patients vont présenter des xanthomes palmaires (stries palmaires orangées ou brunes) et parfois des xanthomes tubéreux. Cette maladie est associée à un risque élevé de maladie coronarienne athérosclérotique et de maladie vasculaire périphérique (33). Le diagnostic de la dysbêtalipoprotéinémie est fait sur la base de plusieurs critères :

- La présence d'une dyslipidémie mixte
- L'augmentation du ratio C-VLDL / TG (>0.69) mesuré après ultracentrifugation préparative.

- La présence d'une bande β large aussi appelée β -VLDL à l'électrophorèse des lipoprotéines (Figure 5).
- La présence d'un génotype $\epsilon 2$ homozygote ou une autre mutation expliquant la maladie.

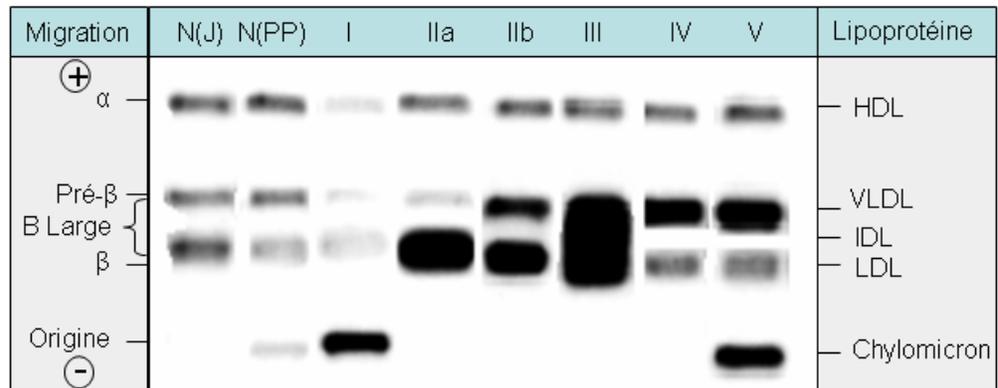


Figure 5. Électrophorèse des lipoprotéines.

Les lipoprotéines plasmatiques sont séparées par leur charge suite à une électrophorèse sur gel d'agarose ou acétate de cellulose.

N(J) : Normal à jeun (HDL, VLDL et LDL); **N(PP)** : Normal post prandial (HDL, VLDL, LDL, Chylo); **I** : Dyslipidémie de type I (Chylo); **IIa** : Dyslipidémie de type IIa (LDL); **IIb** : Dyslipidémie de type IIb (LDL, VLDL); **III** : Dyslipidémie de type III (IDL); **IV** : Dyslipidémie de type IV (VLDL); **V** : Dyslipidémie de type V (VLDL, Chylo).

3.4. Traitement

La dysbétalipoprotéïnémie répond habituellement bien au traitement. Parfois les changements diététiques sont suffisants pour normaliser les lipides plasmatiques mais l'addition d'une médication est nécessaire dans la plupart des cas. L'utilisation d'un agoniste PPAR- α , tel qu'un fibrates, est la première ligne de traitement (33). Cette classe de médicament agit entre autre en augmentant l'activité de la lipase lipoprotéique, en diminuant la production hépatique de triglycérides et en augmentant la β -oxydation des acides gras au niveau du foie.

4. Les HDL

Le rôle principal des HDL est le transport à rebours du cholestérol de la périphérie (le macrophage par exemple) vers le foie. Toutefois, les HDL possèdent plusieurs autres fonctions biologiques tout aussi importantes (35):

- Transport du cholestérol vers les surrénales (synthèse des hormones)
- Rôle anti-inflammatoire
- Rôle antioxydant
- Rôle anti-thrombotique
- Rôle dans la stabilisation de la fonction endothéliale

4.1. Composition des HDL

4.1.1. Composition lipidique

Les HDL sont des lipoprotéines riches en phospholipides (~25% du poids) et en cholestérol estérifié (~20% du poids). Ce sont les lipoprotéines qui possèdent la proportion la plus faible en triglycérides (~5% du poids) et la plus élevée de protéines (~50% du poids) (19).

4.1.2. Composition protéique

4.1.2.1. Apo A

Aucune apolipoprotéine n'est propre aux HDL. Ainsi, l'apo A-I se retrouve principalement au niveau des HDL mais aussi de manière mineure au niveau des chylomicrons. Les apo A-I (70%) et A-II (20%) sont les composantes protéiques majeures des HDL et constituent environ 90% de la masse protéique des HDL (19). Les apo A-I et A-II jouent tous deux un rôle important dans la structure des HDL mais ont aussi d'autres fonctions essentielles telle que l'activation de la LCAT (apo A-I) et de la lipase hépatique (apo A-II). Il existe deux principaux types de particules de HDL selon leur contenu en apolipoprotéines: celles qui contiennent l'apo A-I mais pas l'apo A-II (Lp A-I)

et celles qui contiennent ces deux apolipoprotéines (Lp A-I :A-II). Les Lp A-I représentent environ un tiers des HDL tandis que les Lp A-I :A-II représentent les deux tiers restants. La concentration de Lp A-I semblerait être un meilleur indicateur de protection cardiovasculaire que la concentration de Lp A-I :A-II (35).

4.1.2.2. Autres apolipoprotéines

L'apo E, l'apo A-IV et les apo C sont des composantes mineures des HDL. Elles proviennent de la dégradation des lipoprotéines riches en triglycérides. Les HDL vont également transporter d'autres protéines telles que l'apo J, l'apo M, la CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein), la LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyl Transferase), la PLTP (Phospholipid Transfer Protein) et la paraoxonase (36).

4.2. Caractéristiques physiques et chimiques des HDL

Les HDL sont un groupe très hétérogène de lipoprotéines qui peuvent être subdivisées en sous-populations. Il existe plusieurs méthodes de classification des HDL, soit par leur composition en apolipoprotéines, leur densité, leur taille et leur forme ou par leur migration électrophorétique.

4.2.1. Densité

Les HDL sont les lipoprotéines ayant la plus haute densité à cause de leur faible concentration en triglycérides et leur haute concentration en apolipoprotéines. Dans le plasma de sujets normolipidiques, les HDL flottent à une densité entre 1.063 – 1.210 g/ml lors d'une ultracentrifugation sur gradient de densité. Les HDL peuvent être davantage subdivisées en HDL₂ (densité de 1,063 – 1,125 g/ml) et en HDL₃ (densité de 1,125 – 1,21 g/ml) (18). La

concentration de HDL₂ serait un meilleur indicateur de risque cardiovasculaire que la concentration de HDL₃.

4.2.2. Taille et forme

Les HDL sont les plus petites lipoprotéines et ont un diamètre de 50-100 Å. Elles sont subdivisées en : HDL_{2b} (100 Å), HDL_{2a} (90 Å), HDL_{3a} (85 Å), HDL_{3b} (80 Å) et HDL_{3c} (75 Å). Les HDL naissantes ont la forme de particules discoïdales arrangées en bi-couche de phospholipides et de cholestérol non-estérifié, encerclées par l'apo A-I. Les HDL matures sont de forme sphérique classique (figure 6) (35).

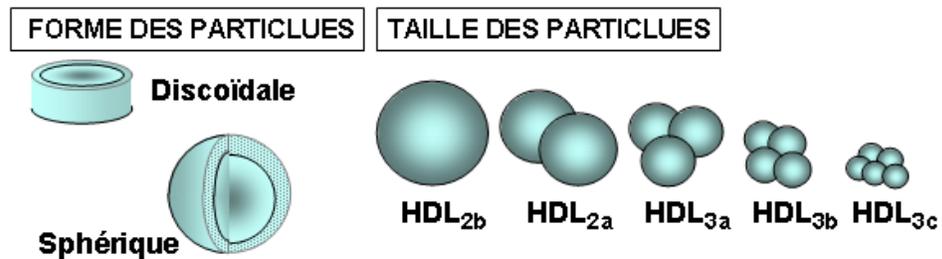


Figure 6. Forme et taille des particules de HDL.

4.2.3. Migration électrophorétique

Lors de la séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur gel d'agarose, les HDL sphériques vont migrer en position α à cause de leur charge et les HDL immatures discoïdales vont migrer en position pré- β . Certains HDL riches en apo E vont migrer en position γ avec les gamma-globulines. Une séparation plus fine des HDL peut être effectuée par électrophorèse en deux dimensions. Brièvement, une première séparation électrophorétique est effectuée sur gel d'agarose (séparation par charge) suivie d'une seconde migration par électrophorèse sur gel de gradient de polyacrylamide non dénaturant (séparation par la taille) (Figure 7) (37).

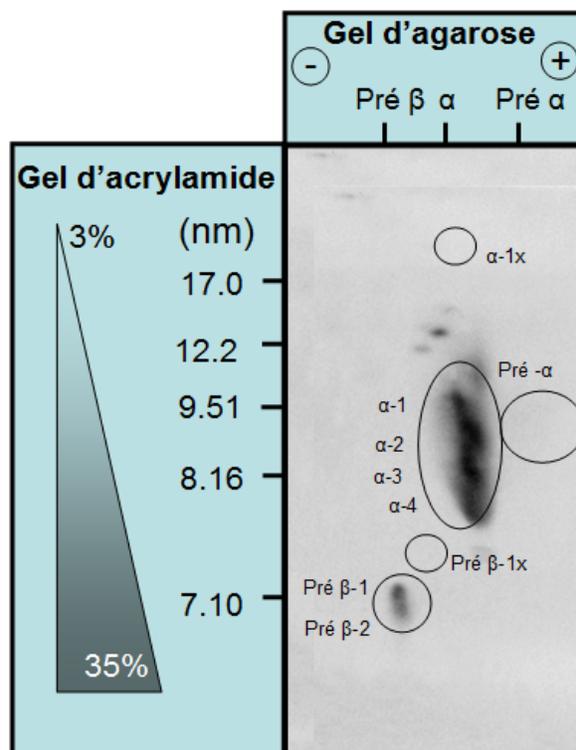


Figure 7. Séparation des lipoprotéines par électrophorèse en 2D

Les lipoprotéines sont d'abord séparées horizontalement par leur charge sur gel d'agarose puis le gel est appliqué sur un gel de gradient de polyacrylamide vertical qui permet la séparation selon la taille. Les HDL pré β peuvent être séparées en pré β-1 et pré β-2 selon leur taille. Les pré β-1x sont des HDL discoïdales retrouvées chez les patients atteints de déficit familial de la LCAT. Les HDL α sphériques sont divisées en quatre classes selon leur taille. Les HDL α-1x sont des HDL sphériques retrouvées chez les patients atteints de déficit familial de la LCAT.

4.3. Métabolisme des HDL

4.3.1. Genèse des HDL

Les HDL jouent un rôle essentiel dans le transport du cholestérol de la périphérie vers le foie. Les HDL débutent leur vie sous forme de particules d'apo A-I produites par le foie et l'intestin. L'apo A-I provient aussi de la dégradation des chylomicrons lorsqu'ils sont soumis à l'action de la lipase lipoprotéique. L'apo A-I est une protéine amphipathique qui circule dans le

plasma associée à des phospholipides, et possède une grande affinité pour le cholestérol (38). Sous l'action de l'ABCA1 (ATP-binding cassette A1), le cholestérol libre présent au niveau des tissus sera transféré sur l'apo A-I pour donner naissance à des pré- β HDL immatures de forme discoïdale qui contiennent deux molécules d'apo A-I. Le cholestérol libre de ces HDL va être estérifié via l'action de la LCAT plasmatique. Le cholestérol libre, qui est une molécule polaire, va se localiser à la surface des HDL pré- β . Lorsqu'il devient estérifié, l'ester de cholestérol non-polaire va migrer vers l'intérieur des HDL pré- β pour former le cœur hydrophobe de ces particules qui deviennent alors des HDL α sphériques. Les HDL vont capter d'autres constituants provenant de la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides (39). Les chylomicrons vont relâcher des phospholipides, des triglycérides, les apolipoprotéines A-I, A-IV et C qui seront captées par les HDL. Les VLDL vont donner des phospholipides, des triglycérides, les apolipoprotéines C et E aux HDL. Les HDL α vont également capter du cholestérol libre de la périphérie via l'action de SRB1 (Scavenger Receptor type B1) et de l'ABCG1 (ATP-binding cassette G1). De nouveau la LCAT jouera un rôle essentiel dans l'estérification du cholestérol et la croissance du noyau hydrophobe des HDL. Ces grosses HDL vont lier une autre molécule d'apo A-I pour un total de 3 molécules d'apo A-I par particule de HDL (35). La figure 8 récapitule les principales étapes du métabolisme des HDL.

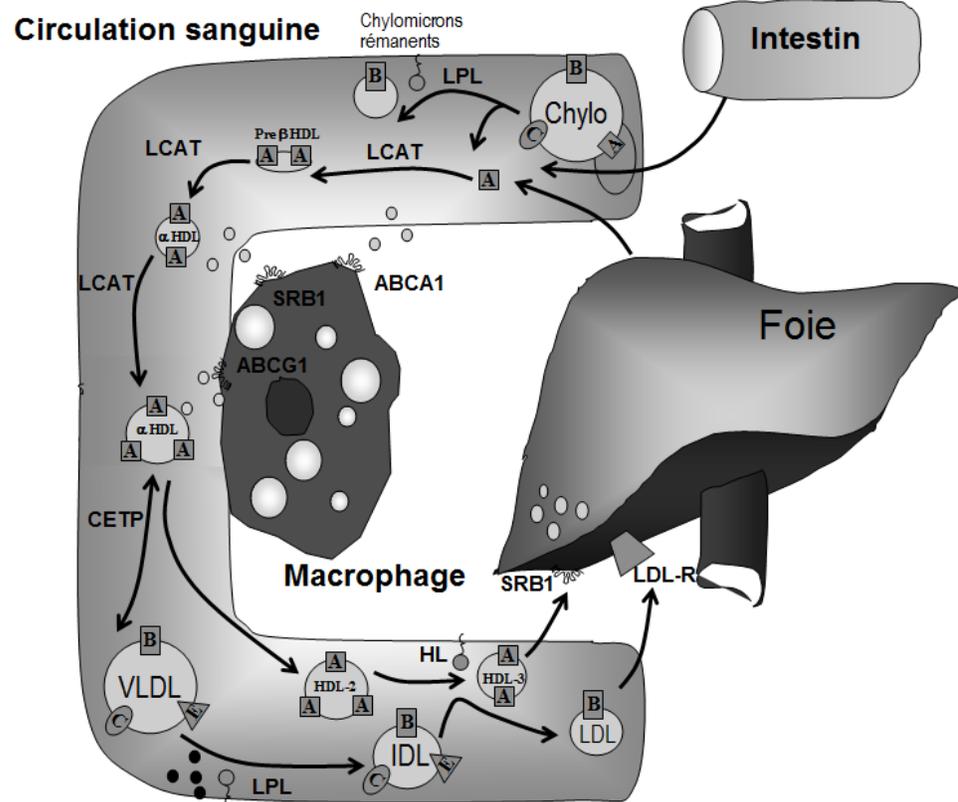


Figure 8. Métabolisme des HDL

Voir le texte de la section 4.3.1 pour l'explication de la voie métabolique et des abréviations.

4.3.2. Catabolisme des HDL

Il existe deux voies pour le retour du cholestérol des HDL vers le foie : la voie médiée par la CETP (Cholesterol Ester Transfert Protein) et la voie directe. Grâce à l'action de la CETP, le cholestérol estérifié des HDL₂ sera transporté vers les lipoprotéines contenant l'apo B en échange de triglycérides pour donner naissance aux HDL₃ (particules appauvries en cholestérol). Le cholestérol ainsi transféré aux VLDL pourra retourner vers le foie via le LDL-R, le LRP ou le VLDL-R. Cette voie représente environ 90% du cholestérol estérifié transporté vers le foie. De plus, les HDL enrichies en triglycérides seront la cible de la lipase hépatique qui va hydrolyser les triglycérides et diminuer la taille des HDL et enrichir leur noyau en ester de cholestérol. Le cholestérol estérifié des HDL peut aussi être transporté directement vers le foie via l'action du SRB1.

Chez les humains, cette voie ne représente que 10% du cholestérol estérifié transporté vers le foie (40).

4.4. Génétique des HDL

Des études portant sur des jumeaux ont permis de déterminer qu'entre 40 à 80% de la variabilité inter-individuelle dans la concentration de C-HDL est d'origine génétique. D'autres facteurs tels que le tabagisme, l'obésité, la consommation d'alcool, l'activité physique, la résistance à l'insuline, le diabète ou les hormones stéroïdiennes et certain médicaments vont également influencer le niveau de C-HDL (41). La concentration en C-HDL plasmatique est un paramètre complexe qui reflète l'interaction des multiples facteurs impliqués dans sa genèse, son métabolisme et son catabolisme. Ceci explique le nombre élevé des gènes impliqués dans le contrôle du niveau de C-HDL (figure 9) (20).

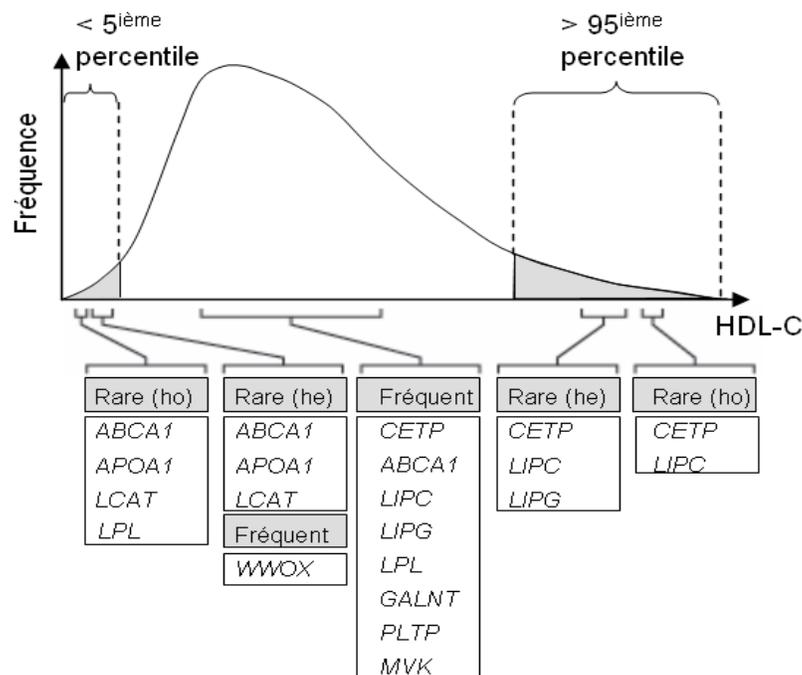


Figure 9. Principaux gènes expliquant la variabilité des concentrations de C-HDL (20). *ABCA1* (ATP binding cassette A-1), *APOA1* (Apolipoprotein A-1), *LCAT* (Lecithin cholesterol acyl transferase), *LPL* (Lipoprotein lipase), *WWOX* (WW domain containing oxydoreductase), *CETP* (Cholesterol ester transfer protein), *LIPC* (Hepatic lipase), *LIPG* (Endothelial lipase), *GALNT* (Galactosamine:polypeptide acetylgalactosaminyltransferase). *PLTP* (Phospholipid transfer protein), *MVK* (Mevalonate kinase)

L'étude des patients présentant des valeurs extrêmes de C-HDL a permis la découverte de plusieurs gènes clefs impliqués dans le métabolisme des HDL. Certaines mutations du gène CETP ou LIPC vont résulter en des concentrations plasmatiques de C-HDL extrêmement élevées > 95^{ième} percentile (hyperalphalipoprotéinémie). Certaines maladies monogéniques qui entraînent des niveaux de C-HDL extrêmement bas < 5^{ième} percentile pour l'âge et le sexe seront discutées plus loin (hypoalphalipoprotéinémie). Plus récemment, des études de 'genome-wide association' ont permis la découverte de polymorphismes fréquents expliquant une partie de la variabilité inter-individuelle du HDL chez les patients présentant des niveaux de C-HDL normaux (42).

4.5. Les hypoalphalipoprotéinémies monogéniques

4.5.1. Mutation de l'apo A-I

L'apo A-I est le constituant principal des HDL et en forme la charpente. Plus d'une douzaine de mutations du gène *APOA-I* ont été décrites. Le déficit complet d'apo A-I conduit à un niveau de C-HDL très bas ainsi que des xanthomes cutanés et une augmentation du risque cardiovasculaire chez certains patients (41). La mutation apo A-I Milano est une mutation qui se traduit par l'ajout d'un groupement cystéine qui va permettre la dimérisation de l'apo A-I avec l'apo A-II. Cliniquement cette mutation va entraîner une réduction importante du C-HDL et semble être associée à un risque cardiovasculaire très faible et à une longévité accrue (43).

4.5.2. Mutation de l'ABCA1

ABCA1 est un transporteur ATP dépendant qui permet l'efflux du cholestérol des tissus périphériques (tels les macrophages) vers l'apo A-I plasmatique. Certaines mutations de l'ABCA1 vont causer la maladie de Tangier, une

maladie autosomique récessive, caractérisée au niveau clinique par des amygdales orangées, une hépatosplénomégalie, des neuropathies périphériques ainsi qu'un risque cardiovasculaire augmenté. Au niveau biochimique, cette maladie cause un abaissement important de la concentration de C-HDL, d'apo A-I, d'apo A-II et une hypertriglyceridémie. Ceci semble causé par un catabolisme augmenté de l'apo A-I et apo A-II lors du défaut de maturation des HDL. Les porteurs hétérozygotes de certaines mutations du gène ABCA1 vont aussi présenter une hypoalphalipoprotéïnémie mais a un degré moindre part rapport aux homozygotes (44).

4.5.3. Mutation de la LPL

La présence de mutations homozygotes du gène de la LPL conduit à l'hypertriglicéridémie de type I classique (45). La lipase lipoprotéique n'agit pas directement sur le métabolisme des HDL. Toutefois, les patients porteurs d'une mutation homozygote du gène de la LPL vont présenter des niveaux de C-HDL et de C-LDL extrêmement abaissés ainsi que des concentrations de triglycérides plasmatiques extrêmement élevées. Ceci est lié au fait qu'un défaut d'activité de la LPL conduit à l'accumulation plasmatique de chylomicrons riches en triglycérides et secondairement à des faibles taux de C-HDL puisque la lipolyse des chylomicrons contribue à la formation des HDL.

4.5.4. Mutations de la LCAT

Les mutations du gène de la LCAT conduisent également à une hypoalphalipoprotéïnémie sévère dont nous parlerons davantage dans la prochaine section.

5. LCAT (Lecithin :cholesterol acyltransferase)

5.1. Historique

La présence d'une enzyme permettant l'estérification du cholestérol plasmatique a été postulée dès 1935 par Sperry et al., suite à la découverte du fait que la majorité du cholestérol plasmatique était estérifié. Par la suite, des travaux de Glomset et al. publiés en 1962 ont démontré qu'une enzyme plasmatique permettait l'estérification du cholestérol par le transfert d'acide gras de la phosphatidylcholine (PC) vers le cholestérol. Cette enzyme fut nommée Lecithin Cholesterol Acyl Transferase ou LCAT (EC 2.3.1.43) (46).

5.2. Structure de la protéine LCAT

La LCAT est une glycoprotéine de 416 acides aminés ayant un poids moléculaire de 63kD. Elle est produite principalement par le foie. La protéine LCAT est transcrite sous la forme d'un peptide de 440 acides aminés, incluant un peptide signal de 24 acides aminés (47).

La protéine LCAT possède quatre sites de N-glycosylation et les groupes glucidiques représentent environ 25% de la masse totale de la protéine. La LCAT est transportée dans le plasma et liée aux lipoprotéines, principalement aux HDL et aux LDL. La structure primaire de la LCAT est hautement conservée à travers l'évolution des espèces, suggérant qu'une protéine entière est nécessaire pour maintenir son activité enzymatique (48). Les structures secondaire et tertiaire de la LCAT n'ont pas encore été déterminées, mais la structure prédite par homologie à la lipase pancréatique suggère que la LCAT est formée de 7 domaines β ainsi que de 4 hélices α (49). Le site actif de la LCAT a été identifié par homologie à d'autres lipases ainsi que par des études de mutation dirigée. La LCAT contient trois acides aminés essentiels à son activité enzymatique, qui forment la triade retrouvée dans toutes les lipases. Ces acides aminés sont la sérine en position 181, l'acide aspartique 345 et l'histidine 377 (figure 10) (50).

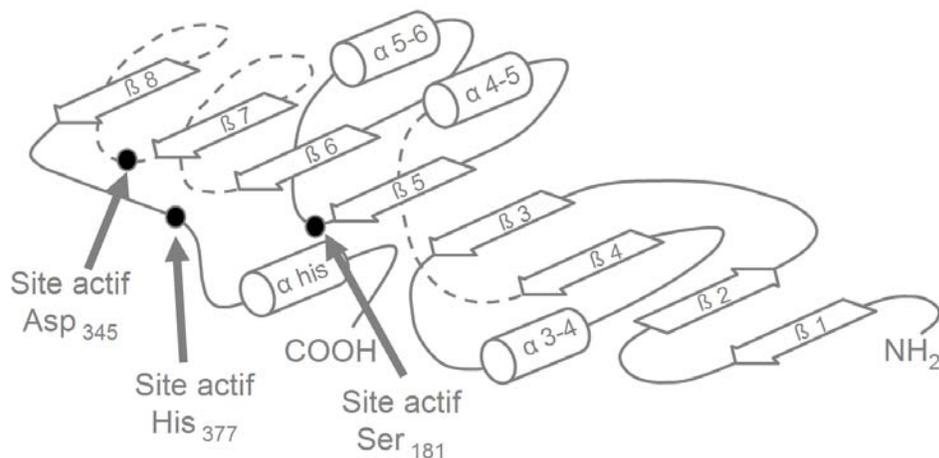


Figure 10. Structure tertiaire prédite de la LCAT (50).

5.3. Activité enzymatique de la LCAT

Le cholestérol sous sa forme estérifiée représente environ 75% du cholestérol plasmatique total. L'estérification du cholestérol est une étape cruciale pour permettre le transport efficace du cholestérol par les lipoprotéines. La LCAT possède l'activité enzymatique d'une phospholipase et d'une acyltransferase, activités nécessaires pour l'estérification du cholestérol plasmatique. Elle catalyse le transfert d'un acide gras insaturé de la position sn-2 de la phosphatidylcholine vers le groupe hydroxyl 3β du cholestérol. Il en résulte la formation d'esters de cholestérol et de lysophosphatidylcholine (51). Le substrat principal de la LCAT est le cholestérol des HDL car l'apo A-I, principalement retrouvée sur les HDL, est le plus important activateur de la LCAT (52). Il a été démontré que l'apo A-II, l'apo A-IV, l'apo CII et l'apo CIII peuvent aussi activer la LCAT, mais avec une efficacité moindre que l'apo A-I (figure 11) (48). La LCAT va aussi permettre l'estérification du cholestérol des lipoprotéines contenant l'apo B telles que les LDL et les VLDL (53). L'activité LCAT sur les HDL se nomme activité α -LCAT, tandis que l'activité LCAT sur les lipoprotéines contenant l'apo B se nomme activité β -LCAT. Ces deux activités représentent 70% et 30% de l'activité LCAT plasmatique totale

respectivement. L'estérification du cholestérol est une étape cruciale dans la maturation des HDL pré β discoïdaux en HDL α sphériques (54).

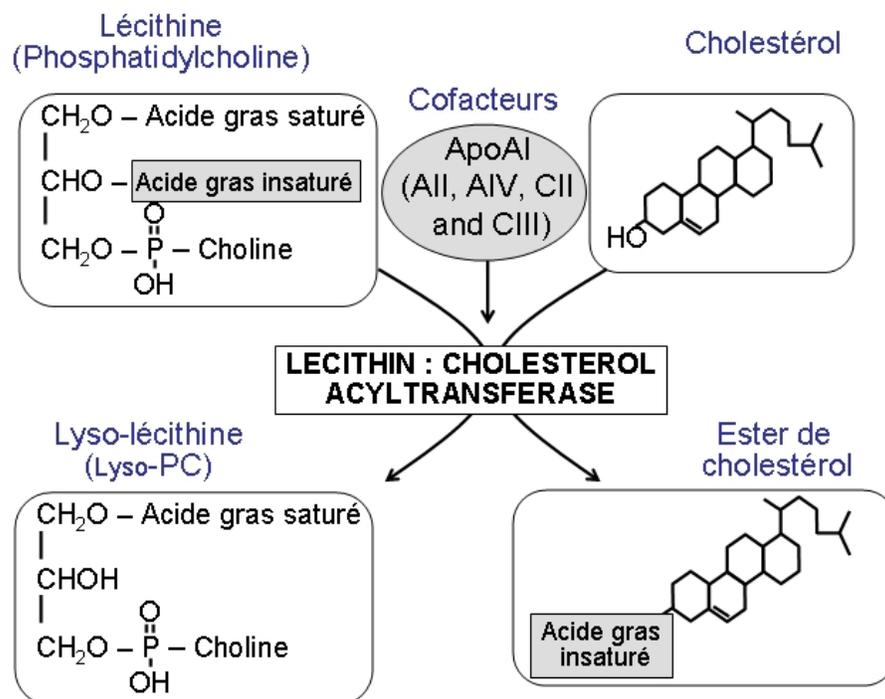


Figure 11. Activité enzymatique de la LCAT.

5.4. Génétique de la LCAT

Le gène codant pour la LCAT (OMIM 606967) a été cloné par McLean et al. en 1986 (55). En 1987, l'équipe de Azoulay et al. a localisé ce gène sur le chromosome 16q22.1 par hybridation *in situ* (56). Le gène *LCAT* est composé de 6 exons et 5 introns, mesure 4.23 kb et est transcrit en un ARN messager de 1550 bases. Plus de 60 mutations ont été décrites (57). Il est important de noter que certaines mutations de la *LCAT* vont conduire au déficit familial de LCAT (Familial LCAT Deficiency ou FLD) alors que d'autres mutations de ce même gène sont responsables d'une autre maladie : la maladie des yeux de poisson (Fish Eye Disease ou FED). Les mutations causant le FLD et le FED sont représentées dans la figure 12a et 12b respectivement.

De manière plus récente, une étude basée sur l'approche 'whole genome scan' a montré qu'un polymorphisme de la *LCAT*, le polymorphisme rs255052, était associé avec une hausse légère du C-HDL mais ce résultat n'a toutefois pas été reproduit dans d'autres études (42).

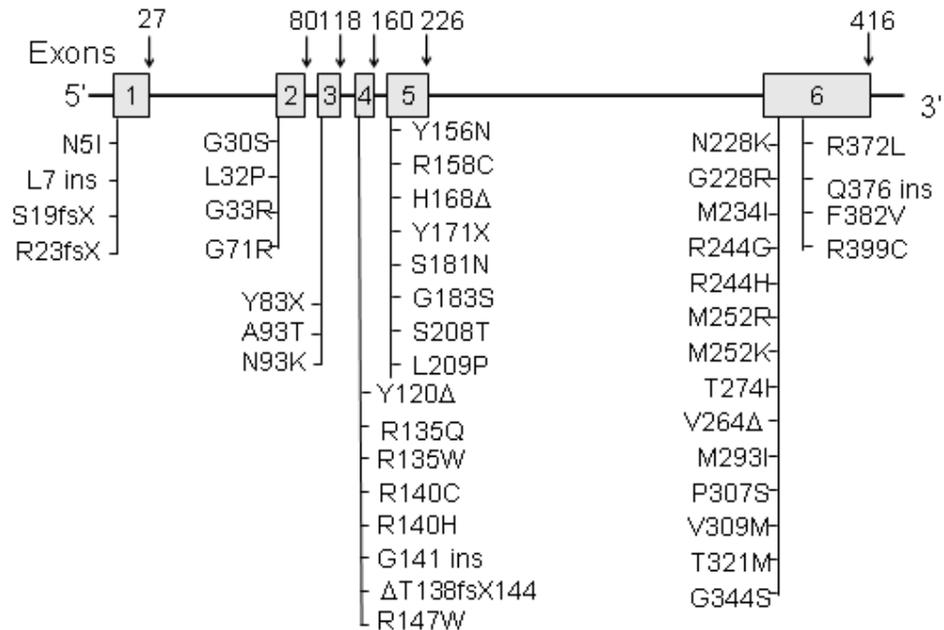


Figure 12a. Mutations de *LCAT* causant le déficit familial de LCAT (FLD).

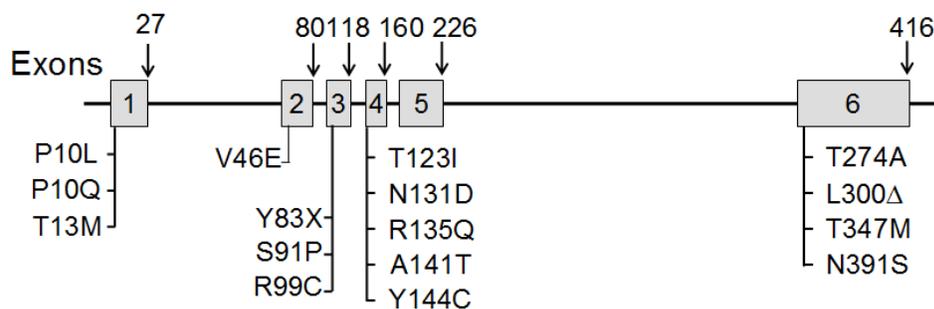


Figure 12b. Mutations de *LCAT* causant la maladie des yeux de poisson (FED).

6. Déficit familial de LCAT (Familial LCAT Deficiency ou FLD)

6.1. Généralités

Le déficit familial de LCAT (OMIM 245900) fut caractérisé par Norum et Gjones en 1967 dans une famille Norvégienne (58). Il s'agit d'une maladie autosomique récessive rare et de prévalence inconnue. Cette maladie est caractérisée par une absence d'activité α -LCAT et β -LCAT. Le cholestérol non-estérifié va s'accumuler dans des cellules spumeuses de plusieurs tissus tels que la cornée, la rate, les reins, le foie, la moelle osseuse et les artères. Cliniquement, cette maladie est caractérisée par une concentration de C-HDL $<5^{\text{ième}}$ percentile accompagnée de la triade classique: (1) des opacités cornéennes précoces bilatérales, (2) une anémie normochrome normocytaire, (3) une protéinurie et une insuffisance rénale progressive (47). Au niveau biochimique, le diagnostic du déficit familial de LCAT se fait lorsque l'absence complète d'activité LCAT est démontrée (activité α -LCAT et β -LCAT).

6.2. Fish Eye Disease (FED)

Carlson et Philipson ont décrit la maladie des yeux de poisson (Fish Eye Disease ou FED) en 1979 (59) (OMIM 136120). Cliniquement, il s'agit d'une maladie qui ressemble par certains points au déficit familial de LCAT. Elle est caractérisée par un C-HDL très abaissé ($<5^{\text{ième}}$ percentile) et des opacités cornéennes précoces. Toutefois, cette maladie diffère du FLD par l'absence d'anémie ou d'atteinte rénale et possiblement par une augmentation du risque de maladie cardiovasculaire précoce, bien que ceci demeure controversé (60). Cette maladie est encore plus rare que la FLD. La prévalence réelle est inconnue. L'activité LCAT chez les patients atteints de FED est globalement normale et la concentration de cholestérol estérifié plasmatique est également normale à cause de la perte sélective de l'activité α -LCAT, alors que l'activité β -LCAT est maintenue (61).

6.3. Caractéristiques biochimiques du FLD

6.3.1. Mesure de l'activité de la LCAT

La mesure de l'activité de la LCAT est le test diagnostique pour la déficience familiale de LCAT et le Fish Eye Disease. Il existe plusieurs approches pour mesurer l'activité de la LCAT. Elle peut être évaluée *in vitro* grâce à la mesure du taux d'estérification du cholestérol. Ceci peut être fait en mesurant le taux de formation d'esters de cholestérol dans des HDL (activité α -LCAT) ou des LDL (activité β -LCAT) humaines purifiées et incubées avec le plasma du patient (62). Des substrats exogènes peuvent aussi être utilisés. Des protéoliposomes synthétiques analogues au HDL contenant de l'apo A-I sont souvent utilisés pour mesurer le taux d'estérification du cholestérol (63). Cette méthode permet uniquement la mesure de l'activité α -LCAT. Plus récemment, des substrats exogènes synthétiques ont été commercialisés pour faciliter la mesure de l'activité LCAT grâce à une réaction colorimétrique (64).

L'activité *in vivo* de la LCAT peut être évaluée indirectement par la mesure du ratio cholestérol libre par rapport au cholestérol total. Chez les individus normaux, le cholestérol libre représente entre 25 et 35 % du cholestérol total. Chez les individus atteints de FLD, le cholestérol non-estérifié s'accumule dans le plasma et peut représenter jusqu'à 99 % du cholestérol total (47).

6.3.2. Mesure de la masse de la LCAT

La masse de la LCAT est habituellement déterminée par Western blot, en utilisant des anticorps polyclonaux contre la LCAT humaine ainsi que des calibrateurs de concentration connue (65). La masse de la LCAT sert principalement à déterminer l'activité spécifique de la LCAT (activité par unité de masse de la LCAT) et ceci est surtout utile lorsque l'activité de la LCAT n'est pas nulle.

6.4. Classification des déficits de LCAT

Les déficits de l'activité de la LCAT ont été regroupés en quatre classes par Kuivenhoven et al. (57) (tableau IV et figure 13). Cette classification repose sur plusieurs paramètres dont :

1. L'activité α -LCAT
2. L'activité β -LCAT
3. La masse de LCAT
4. Les symptômes cliniques

Classe	Phenotype	Activité α -LCAT	Activité β -LCAT	Masse LCAT
Classe 1	FLD	Nulle	Nulle	Nulle
Classe 2	FLD	Nulle	Nulle	Normale ou ↓
Classe 3	FED	↓	↓	↓
Classe 4	FED	↓	Normale	↓

Tableau IV. Classification des déficits de la LCAT (57)

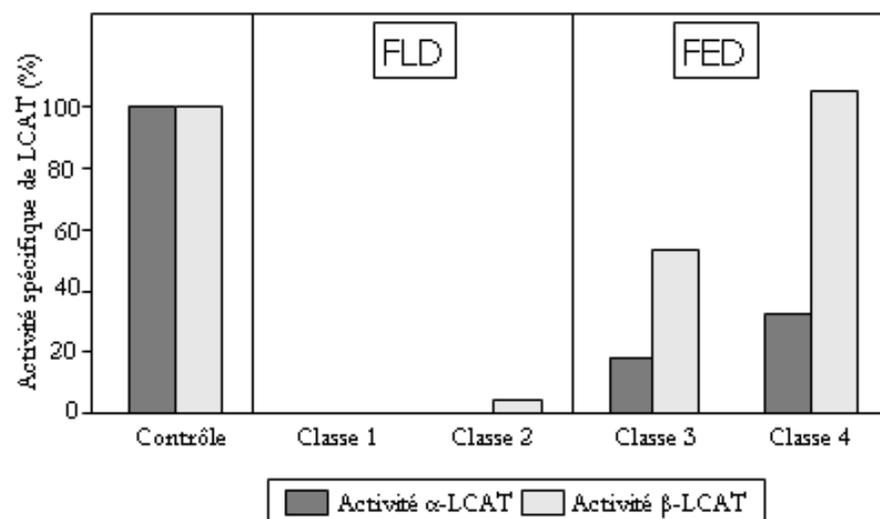


Figure 13. Classification des déficits de la LCAT (57)

Les déficits de classe 1 sont dus à l'absence complète des activités α et β -LCAT. La masse de LCAT n'est pas détectable. Ceux-ci résultent de mutations nulles du gène de la LCAT soit par une mutation non-sens, soit à la suite d'un défaut d'épissage de l'ARNm ou d'une insertion/délétion de nucléotides provoquant un changement du cadre de lecture. Ces mutations vont mener au phénotype classique du FLD.

Les déficits de classe 2 sont caractérisés par une absence complète de l'activité α -LCAT et β -LCAT. La masse de LCAT peut être normale ou diminuée. Ceux-ci sont causés par des mutations de type faux-sens.

La classe 3 se définit par des activités α et β -LCAT toutes deux réduites mais détectables, avec une masse de LCAT réduite. Elle est causée par des mutations de type faux-sens ou des délétion mineures.

La classe 4 présente une réduction uniquement de l'activité α -LCAT et une masse de LCAT réduite. Elle est causée par des mutations de type faux-sens.

6.5. Lipoprotéines

Étant donné que la LCAT joue un rôle clé dans la maturation des lipoprotéines, les patients atteints de déficit familial de LCAT présentent plusieurs anomalies importantes de la morphologie et du contenu lipidique des lipoprotéines plasmatiques. Ces anomalies vont être présentes aussi bien au niveau des lipoprotéines de basse densité (densité des LDL) qu'au niveau des lipoprotéines de haute densité (densité des HDL) car ce sont les deux classes de lipoprotéines qui transportent en majorité du cholestérol estérifié.

6.5.1. Anomalies des lipoprotéines de basse densité

Une caractéristique spécifique au déficit familial de LCAT et à la cholestase hépatique est la présence de lipoprotéines X ou LpX (66). Les LpX sont des

lipoprotéines de 400-600 Å de diamètre contenant un cœur d'albumine, du cholestérol libre, des phospholipides ainsi que des apolipoprotéines de classe A, C et E (67). Les LpX sont des lipoprotéines ayant une taille supérieure à celle des VLDL et une densité similaire à celle des LDL car elles ne contiennent qu'une faible concentration en triglycérides (68). Lors de la migration électrophorétique, les LpX migrent de manière cathodique par rapport aux LDL, restant proches du point d'origine (69). Le mécanisme de formation des LpX est encore inconnu mais il semble qu'en l'absence d'esters de cholestérol pour former le noyau des lipoprotéines, l'albumine circulant dans le plasma va servir de noyau hydrophobe qui liera le cholestérol libre, les phospholipides et certaines apolipoprotéines. Les LpX vont s'accumuler dans le plasma des patients atteints de FLD à cause de leur catabolisme très lent (figure 14).

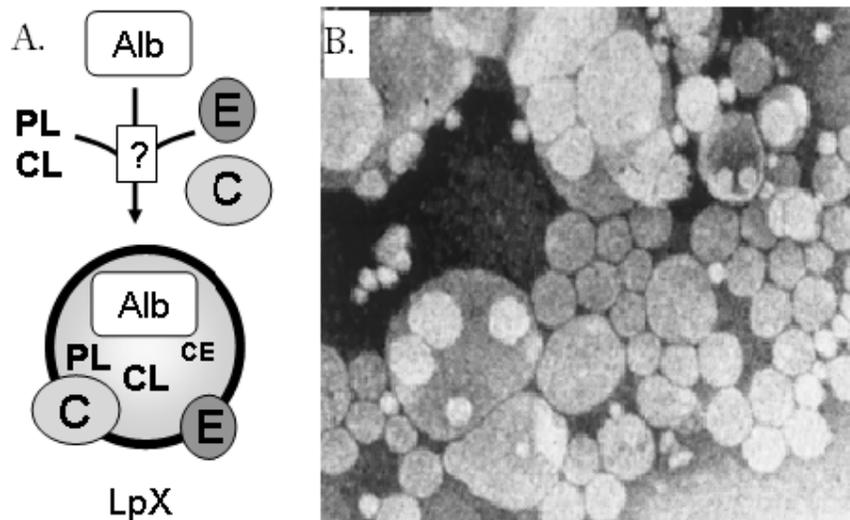


Figure 14. Lipoprotéine X A. Mécanisme possible de formation des LpX au niveau plasmatique. Alb (Albumine), PL (Phospholipide), CL (Cholestérol libre), E (Apo E), C (Apo C) **B. LpX par microscopie électronique (47).**

6.5.2. Anomalies des lipoprotéines de haute densité

On retrouve dans le plasma des patients atteints du déficit familial de LCAT des HDL discoïdales de petite taille, représentées par des HDL pré- β enrichies en cholestérol non-estérifié et en phospholipides (70). Ces HDL immatures vont former des accumulations en rouleau lors de l'étude par microscopie électronique (71). Ces HDL présentent également un catabolisme accru par rapport à celles d'individus normaux, possiblement par une clairance accrue de l'apo A-I et l'apo A-II via les reins (72) (figure 15).

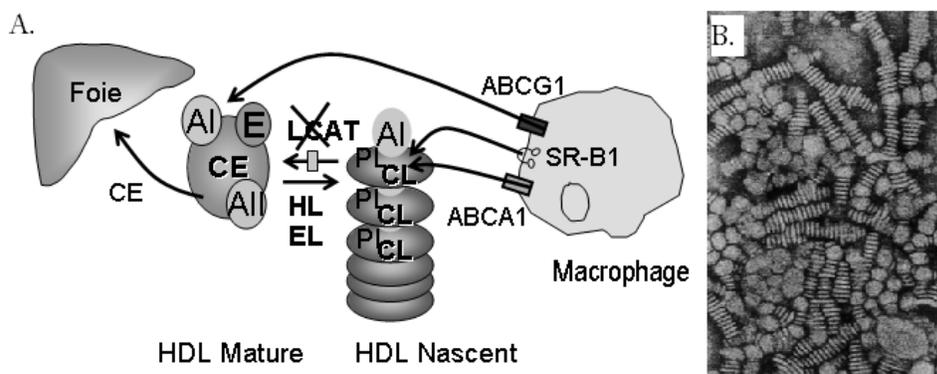


Figure 15. Lipoprotéines de haute densité. A. Mécanisme expliquant l'accumulation de HDL immatures et discoïdales dans le FLD. B. HDL discoïdales empilées en rouleaux vues par microscopie électronique (47).

6.5.3. Profil lipidique

Le tableau V résume les anomalies du bilan lipidique observées chez les patients atteints de déficit familial de LCAT (73). La concentration de C-HDL est très faible (0.25 mmol/L) chez les patients atteints de FLD à cause des deux mécanismes mentionnés ci-dessus soit :

- L'absence d'estérification du cholestérol des HDL et la présence de HDL immatures pauvres en cholestérol.
- Le catabolisme accru des apo A-I et apo A-II par les reins.

	Cholestérol total (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Apo A-I (mg/dL)	Apo B (mg/dL)
LCAT -/- (n=15)	3.89±0.54*	2.64±0.45*	0.25±0.04*	2.47±0.45	41.5±3.3*	46.3±5.7*
LCAT +/- (n=38)	4.14±0.16*	1.41±0.10	1.05±0.05*	2.43±0.14	103.1±3.8*	89.1±3.8*
LCAT +/+ (n=13)	5.09±0.24	1.68±0.34	1.33±0.75	2.97±0.22	131.4±5.0	93.9±6.1

Tableau V. Profils lipidiques de patients atteints de FLD. (LCAT -/-), d'hétérozygotes (LCAT +/-) et de contrôles (LCAT+/+). Un astérisque (*) dénote une différence statistiquement significative ($p < 0.05$) par rapport aux contrôles. (73).

Chez les individus atteints de FLD, les concentrations d'apo A-I et d'apo A-II sont respectivement seulement 27 et 18% de la normale. Le niveau de C-LDL est diminué chez les patients atteints de déficit familial de LCAT principalement par l'absence d'activité β -LCAT et l'augmentation de l'expression du récepteur des LDL au niveau des hépatocytes. Il semble exister une grande hétérogénéité dans les niveaux de triglycérides (TG) plasmatiques chez les patients atteints de déficit familial de LCAT. Les concentrations de TG varient de 1.24 à 8.1 mmol/L mais il n'existe présentement aucune explication à ce phénomène.

6.6. Signes et symptômes cliniques du FLD

6.6.1. Atteinte ophtalmologique

Le FLD se traduit par des opacités cornéennes prématurées qui apparaissent souvent pendant l'enfance (figure 16 A). Ces opacités débutent en périphérie de la cornée pour ensuite former des arcs cornéens bilatéraux. Par la suite, l'opacité peut se propager au reste de la cornée, qui prend alors une couleur blanchâtre et nébuleuse. Dans certains cas extrêmes, le champ visuel et l'acuité visuelle peuvent être atteints (74). Des études histologiques ont démontré que ces atteintes cornéennes résultent de l'accumulation de cholestérol non-estérifié et de phospholipides au niveau de la membrane de Bowman (75).

6.6.2. Atteinte hématologique

Les patients atteints de FLD vont fréquemment développer une anémie, souvent dès l'enfance. Il s'agit d'une anémie normochrome et normocytaire caractérisée par la présence de codocytes (figure 16 B). Cette anémie résulte d'une hémolyse accrue et d'une réduction de l'érythropoïèse. La durée de vie des érythrocytes chez les patients atteints de FLD est diminuée de moitié par rapport à des individus normaux (76). Ceci est dû à la fragilité des érythrocytes dont la membrane est riche en cholestérol non-estérifié, causant ainsi une altération de la fluidité membranaire (77). De plus, la moelle osseuse de ces patients est souvent envahie par des cellules spumeuses, expliquant la diminution de l'érythropoïèse.

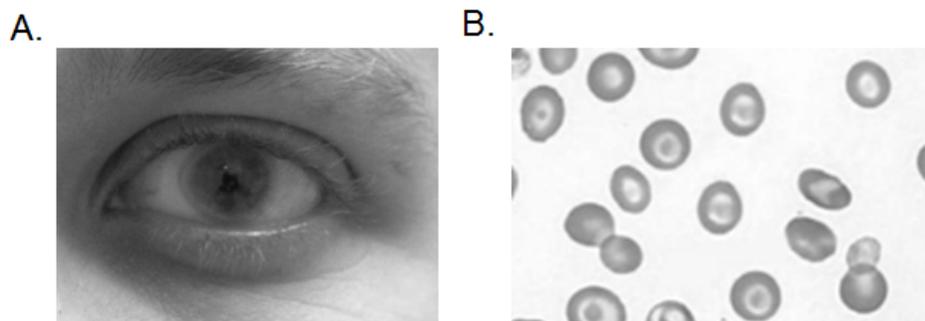


Figure 16. Caractéristiques cliniques du FLD. A. Arcs cornéens chez un patient atteint de FLD. B. Codocytes chez un patient atteint de FLD.

6.6.3. Atteinte rénale

L'atteinte rénale est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de FLD. Une protéinurie progressive peut apparaître dès la vingtaine pour s'accompagner d'une insuffisance rénale dès l'âge de 40-50 ans. L'insuffisance rénale est donc souvent accompagnée d'un syndrome néphrotique (78). L'examen histologique des biopsies rénales de patients souffrant de FLD démontre l'accumulation de lipides (cholestérol libre et phospholipides) et de cellules spumeuses au niveau du mésangium des

glomérules rénaux ainsi qu'un épaissement de la capsule de Bowman des néphrons. Des études de souris *LCAT*^{-/-} montrent que les LpX semblent jouer un rôle important dans le développement de l'atteinte rénale par une atteinte de l'endothélium des capillaires rénaux (79).

6.6.4 Atteinte cardiovasculaire

Malgré une importante baisse du C-HDL circulant, les patients atteints de FLD ne semblent pas présenter un risque accru de maladie cardiovasculaire. Ceci pourrait être dû à l'activité anti-oxydante des LpX sur les LDL (possiblement via l'action anti-oxydante de l'albumine). Il est aussi possible que la baisse du C-LDL observée chez les patients atteints de FLD contribue à leur faible risque cardiovasculaire. Toutefois, certains patients atteints de FLD ont présenté une maladie vasculaire coronarienne et périphérique importante (80, 81).

Une étude portant sur la progression de l'épaisseur intima-média carotidienne (IMT) chez des porteurs hétérozygotes d'une mutation de la *LCAT* montrait que ceux-ci présentaient une progression plus rapide de l'IMT par rapport à des sujets témoins. Toutefois, cette étude n'a pas révélé d'augmentation de l'IMT chez les homozygotes par rapport aux sujets témoins (82).

Une étude récente indique que les souris *LCAT*^{-/-} ne semblent pas avoir d'augmentation de l'athérosclérose même avec un background *APOE*^{-/-} (79). Toutefois, ces résultats ont été contredits par l'étude de Furbee et al. (83) qui démontre une augmentation importante de l'athérosclérose chez les souris *LCAT*^{-/-} avec un background *APOE*^{-/-} ou *LDLR*^{-/-}. Il semble donc qu'il existe une certaine controverse concernant le rôle de la *LCAT* sur l'athérosclérose. Il est fort probable que l'effet de *LCAT* sur l'athérosclérose dépende entre autre de l'environnement génétique du patient et pourrait être potentialisé par des mutations de l'*APOE* ou du *LDLR*.

6.6.5 Atteinte des autres systèmes

L'hépatomégalie et la splénomégalie sont observées de manière non systématique chez les patients atteints de FLD. Lors de la biopsie hépatique, on peut parfois observer une « histiocytose bleue » causée par une surcharge en cholestérol non-estérifié (84).

6.7 Traitement du FLD

Il n'existe pas présentement de traitement curatif du déficit familial de la LCAT à part la transplantation hépatique. Des thérapies géniques sont à l'étude mais elles n'ont pas encore été utilisées chez l'humain. Le traitement du déficit familial de la LCAT passe surtout par le traitement des complications engendrées par cette maladie. Certains patients présentant une progression importante des opacités cornéennes avec une atteinte de l'acuité visuelle ont été traités par transplantation cornéenne (85). La majorité des patients vont développer une insuffisance rénale qui deviendra terminale après l'âge de 50 ans. Pour ces patients, les seules alternatives sont la transplantation rénale qui est très efficace (86), ou plus souvent l'hémodialyse. Une étude a démontré l'utilité de combiner l'acide nicotinique avec un fibrate pour diminuer les taux circulants de Lp-X et diminuer la protéinurie (87). Une autre étude a démontré l'utilité d'un bloqueur des récepteurs de l'angiotensine II pour diminuer la protéinurie et améliorer la fonction rénale chez un patient atteint de FLD (88).

**CHAPITRE II: Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial
LCAT deficiency (FLD) and the role of *APOE* as a modifier gene of the
FLD phenotype**

Published in: Atherosclerosis 2009 (Epub)

**Alexis Baass, Hanny Wassef, Michel Tremblay, Lise Bernier, Robert
Dufour, Jean Davignon**

Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group, Clinical Research
Institute of Montreal (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal, QC,
Canada, H2W1R7

7. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

7.1 Premier objectif

L'objectif principal de cette étude est l'identification et la caractérisation d'une mutation causant le phénotype du déficit familial de LCAT dans une famille canadienne-française, ainsi que l'étude de l'impact de cette mutation sur l'activité LCAT plasmatique et sur le bilan lipidique.

7.2 Second objectif

Le second objectif de cette étude est d'analyser les lipoprotéines plasmatiques chez les patients présentant une FLD par électrophorèse et par chromatographie d'exclusion de taille, afin d'identifier les déterminants génétiques expliquant les différences de phénotype entre les patients.

8. ABSTRACT

Familial LCAT deficiency (FLD) is a disease characterized by a defect in the enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) resulting in low C-HDL, premature corneal opacities, anaemia as well as proteinuria and renal failure. We have identified the first French Canadian kindred with familial LCAT deficiency. Two brothers, presenting classical signs of FLD, were shown to be homozygous for a novel *LCAT* mutation. This c.102delG mutation occurs at the codon for His35 and causes a frameshift that stops transcription at codon 61 abolishing LCAT enzymatic activity both *in vivo* and *in vitro*. It has a dramatic effect on the lipoprotein profile, with an important reduction of HDL-C in both heterozygotes (22%) and homozygotes (88%) and a significant decrease in LDL-C in heterozygotes (35%) as well as in homozygotes (58%). Furthermore, the lipoprotein profile differs markedly between the two affected brothers who had different *APOE* genotypes. We propose that *APOE* could be an important modifier gene explaining heterogeneity in lipoprotein profiles observed among FLD patients. Our results suggest that a *LCAT*^{-/-} genotype associated with an *APOE* ε2 allele could be a novel mechanism leading to dysbetalipoproteinemia.

9. INTRODUCTION

LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase; EC 2.3.1.43) is a 63 kDa enzyme essential for the esterification of plasma cholesterol. This enzyme catalyzes the transfer of the sn-2 acyl group of phosphatidyl choline (PC) to the 3 β -OH group of cholesterol. LCAT is produced by the liver and secreted in the plasma where it is mainly found associated with HDL, but also with apo B containing lipoproteins such as LDL and VLDL (47, 57). Apo A-I is the major co-factor of LCAT, whose activity is key in the maturation of discoidal pre- β HDL to spherical α -HDL particles (89). Once esterified, cholesterol present on the surface of HDL will migrate to form the lipophilic core of the mature HDL particles (90). These HDL particles will transport cholesterol from the peripheral tissues to the liver, where it will be taken up via the SR-BI receptor (scavenger receptor class B type I). Cholesterol present in HDL can also be exchanged with triglyceride of VLDL via the action of the cholesterol ester transfer protein (CETP). These mechanisms explain how LCAT plays an important role in the metabolism of HDL particles as well as in reverse cholesterol transport (90).

The *LCAT* gene located on chromosome 16q22.1, spans 4.2 kilobases and comprises 6 exons and 5 introns. Over 70 mutations in the *LCAT* gene have been reported and span the whole length of the cDNA (Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). These mutations can be classified into two major classes: Familial LCAT Deficiency (FLD, OMIM# 245900) and Fish-Eye Disease (FED, OMIM# 136120) (47, 57). Both diseases are inherited via an autosomal recessive pattern and are extremely rare. The true prevalence of both the heterozygous and homozygous states is unknown. Familial LCAT deficiency was initially described by Norum and Gjone in 1967 (58). In FLD, LCAT activity is completely suppressed either by the production of a truncated nonfunctional protein or a point mutation in a key amino acid.

Both the α -LCAT activity (LCAT activity on HDL particles) and β -LCAT activity (LCAT activity on LDL particles) are lost leading to low plasma HDL cholesterol (<5th percentile) and LDL cholesterol.

In addition lamellar HDL particles forming rouleaux on electron microscopy as well as lipoprotein X (LpX), may also be present in the plasma of patients with FLD (67). LpX are very large lipoproteins which have a vesicular structure and are composed of phospholipids, free cholesterol, small amounts of apo A-I, apo E and apo C as well as large amounts of albumin (57).

The classical symptoms associated with FLD are premature corneal opacifications, anemia, progressive proteinuria and renal failure (47). Bilateral corneal opacities progress from childhood and seem to be caused by the accumulation of free cholesterol as well as amyloid deposits in both the Bowman layer and the anterior stroma of the cornea (85). Mild normochromic-normocytotic anemia is frequently observed resulting from reduced erythropoiesis as well as hemolysis secondary to the abnormal lipid composition of the red blood cell membrane. This gives rise to the presence of codocytes (target cells) and reticulocytes on the peripheral blood smear (76). FLD is also characterized by a progressive proteinuria which leads to terminal renal insufficiency by the 4th or 5th decade. Histological studies of renal biopsies revealed free cholesterol deposits in the mesangium as well as foam cell accumulation in the glomeruli (91). The proposed mechanism of renal injury suggests that LpX could cause damage to the renal capillary endothelium (92). Renal impairment is probably the leading cause of morbidity and mortality in FLD patients.

It has been observed that members of a same family, homozygous for the same LCAT mutation, can often present very different lipid profiles. Gjone et al. observed that plasmas of certain FLD patients presented LpX whereas

others did not (92). Furthermore, some patients have low plasma triglycerides, whereas others have overt hypertriglyceridemia (93-96). We hypothesized that *APOE* may be a modifier gene explaining variations in lipoprotein phenotypes observed in FLD patients, and that it can contribute to the level of triglycerides and cholesterol.

10. MATERIALS AND METHODS

10.1 Subjects

The index case, a 24 year old man (IV-5 on Figure 17), was referred to our lipid clinic by the patient's ophthalmologist on the basis of corneal anomalies and low HDL-C. The patient presented progressive corneal opacities which were first identified at the age of 12 years. Slit lamp examination showed an inhomogeneous opacity of the corneal stroma which was prominent in the limbus. The patient had no other known prior medical history. Further investigation revealed a normochromic-normocytotic anemia with the presence of codocytes on the peripheral blood smear. Renal function was unaltered as the calculated estimated glomerular filtration rate (eGFR) was normal, but a slight proteinuria was detected (0.27 g/day). Detailed questioning of the patient and a thorough physical examination failed to reveal any clinical evidence of atherosclerosis. Doppler ultrasound of the carotid arteries did not reveal any atherosclerotic plaques and the intima-media thickness (IMT) was normal for both the left (0.6 mm) and right (0.5 mm) carotid arteries.

The index case's brother, a 26 year old man (IV-6 on Figure 17), had a childhood history of a slight normochromic-normocytotic anemia of unknown origin and had been treated with oral iron supplements and folic acid for several years. Furthermore his paediatrician had noted an enlarged spleen of unknown

cause. Investigations revealed the presence of slight bilateral corneal opacifications as well as a stable anaemia. This patient did not present any renal dysfunction as the calculated eGFR was normal and there was an absence of proteinuria. There was no clinical evidence of cardiovascular disease. Doppler ultrasound of the carotid arteries did not reveal any atherosclerotic plaques. Left carotid IMT (0.6 mm) and right carotid IMT (0.7 mm) were both within normal limits.

We assessed the patients' kindred (Figure 17). All other members examined were apparently healthy and did not present any ophthalmic, hematologic, renal or cardiovascular disease. Only one patient (II 10) used a drug which could interfere with the lipid profile (omega 3 supplements 1g per day). The study was approved by the Ethics Review Board of the Clinical Research Institute of Montreal. Written informed consent was obtained from all participants.

10.2 Genetic analysis

The patients' genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using commercial kits produced by Qiagen (Qiagen, Mississauga, ON). Genomic DNA was amplified on an automated PCR thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Sequences of the primers and amplification conditions for each exon were obtained from NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/variantseqr). All primers contained an M13 tail used for sequencing. The amplified fragments were purified from agarose gels using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON) and sequenced on a CEQ automatic sequencer from Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Sequences were analyzed with a 3130 XL Genetic analyser from ABI (Applied Biosystem, Foster City, CA). Mutation detection was done using SequencherTM v.4.8 software (Gene Code Corp). All six exons

of the *LCAT* gene were sequenced for patients (III 6, III7, IV 5 and IV 6). For all other patients, only the first exon was sequenced. All exons of both the *LPL* and the *LIPC* genes were sequenced for patients IV 5 and IV 6. *APOE* genotype was determined in all kindred by restriction enzyme analysis as previously described by Hixson et al. (97).

10.3 Biochemical analysis

Fasting blood samples were centrifuged at 3000g for 15 minutes and the plasma was aliquoted and stored at -70°C. Total cholesterol, HDL-C and triglycerides were measured by enzymatic assay on an Advia 1650 automated analyzer (Siemens Diagnostics, Toronto, ON). LDL-C was calculated using the Friedewald formula (98). Free cholesterol was assayed using a kit produced by Wako (Wako Pure Chemical, Richmond, VA) and optical densities were measured on a Beckman DU-64 spectrophotometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON). Apo A-I and apo B were measured by nephelometry on a Dade-Behring BN Prospect automated multi-analyzer (Siemens Diagnostics, Toronto, ON). Total plasma apo E was measured by non-competitive polyclonal enzyme-linked immunoassay as previously described (99).

10.4 Measurement of LCAT activity

LCAT activity was measured using a commercial fluorescent LCAT assay kit (Calbiochem, USA) on a SpectraMax Gemini EM spectrophotometer (Molecular devices, USA). LCAT catalyzes the hydrolysis of the synthetic LCAT substrate (which fluoresces at 470 nm upon stimulation at 340 nm) to release a monomer which fluoresces at 390 nm. The fluorescent labelled LCAT substrate was incubated with human serum at 37° C according to the manufacturer's protocol. Emission intensities at 470 and 390 nm were assayed in duplicate at 0, 2, 4, 6 and 8 hours. LCAT activity was assessed as the change

in 470/390 nm emission intensity with time and was reported in units per hour (U/h).

10.5 Electrophoresis and chromatography

Lipoproteins fractions were separated by ultracentrifugation at $d = 1.006$ g/mL to obtain VLDL ($d < 1.006$) and LDL+HDL ($d > 1.006$) sub fractions. HDLs were isolated from the $d > 1.006$ fraction by heparin-manganese precipitation according to the Lipid Research Clinics procedure, as modified by Warnick and Albers (100). Lipoprotein electrophoresis was done using the Paragon Lipo agarose system according to the manufacturer's protocol (Beckman Coulter, Mississauga, ON). Fast protein liquid chromatography (FPLC) was performed on an automated gel filtration chromatography system (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) using a 60 cm column (10 mm internal diameter) packed with cross-linked agarose gel (Superose 6 prep grade, Pharmacia). The column was eluted with 0.15 mol/L NaCl, 0.01% EDTA, 0.02% sodium azide, pH 7.4 at a rate of 0.5 mL/min. A total of 90 fractions of 0.5 mL each were collected 30 minutes after the addition of the sample. Cholesterol and triglyceride concentrations of each fractions were measured enzymatically on an autoanalyzer (Cobas Mira, Roche) (101).

11. RESULTS

11.1 Genetic analysis

A novel mutation was identified in the first exon of the *LCAT* gene. This mutation was identified as being a point deletion of a guanine residue at position 102 (102delG) of the cDNA. Patients IV-5 and IV-6 were shown to be homozygous for this mutation (Figure 17). Subjects II-7, III-5, III-6, III-7, III-8

and IV-3 were identified as heterozygous carriers of the c.102delG mutation. The deceased subject II-6 is surmised to be an obligate heterozygote. Six non-carrier family members were also identified (II-2, II-10, III-1, III-9, IV-2, IV-4, IV-7). To exclude contribution of lipoprotein lipase mutation, *LPL* was sequenced in patients IV-5 and IV-6 and no mutations were found. We sequenced the gene coding for the hepatic lipase (*LIPC*) and both affected kindred presented the F356L polymorphism in exon 7 of *LIPC*.

Three subjects were carriers of the *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 2$ genotype (II-7, II-10 and IV-6), whereas two carried the *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 3$ genotype (III-9 and IV-7). All other family members presented the more frequent *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype (Table VI).

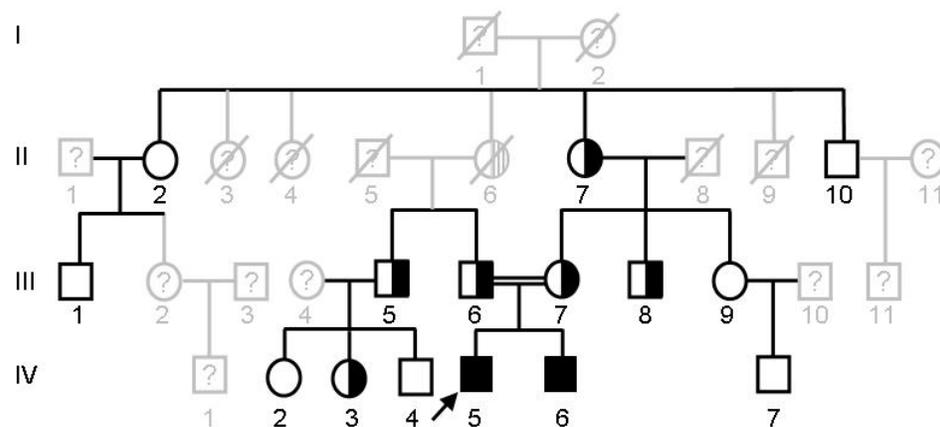


Figure 17. Pedigree of a French Canadian family with familial LCAT deficiency. Males are represented by squares and females by circles. Non affected family members are presented in white, heterozygote carriers are presented by a half white and half black diagram and homozygous patients are represented in black. The proband is indicated by an arrow. Both the proband and his affected brother were born from a consanguineous union since their parents were first cousins. Family members who underwent biochemical and genetic analysis are presented in full lines whereas members who did not participate are presented in a subdued grey tone. Family member II-6 was deceased at the time of the study but it is very likely that she was a heterozygote carrier.

	ID	Sex	Age	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Apo A-I (g/L)	Apo B (g/L)	Apo E (mg/dL)	APOE Genotype
Unaffected	II-2	F	70	1.1	5.8	1.81	3.49	1.69	0.89	6.94	ε3/ε3
	II-10	M	72	1.2	3.83	1.32	1.96	1.47	0.68	5.55	ε3/ε2
	III-1	M	48	0.79	4.68	1.5	2.82	1.49	0.73	3.88	ε3/ε3
	III-9	F	52	0.54	5.98	1.99	3.74	1.69	0.93	3.85	ε4/ε3
	IV-2	F	26	0.88	4.89	1.32	3.17	1.36	0.96	1.78	ε3/ε3
	IV-4	M	24	0.74	3.68	1	2.34	1.22	0.71	2.27	ε3/ε3
	IV-7	M	26	2.27	7.43	1.62	4.77	1.61	1.32	3.6	ε4/ε3
	Mean ± SD			1.08 ± 0.61	5.20 ± 1.40	1.52 ± 0.28	3.21 ± 1.04	1.51 ± 0.14	0.90 ± 0.29	3.98 ± 1.79	
Heterozygous	II-7	F	74	1.03	4.36	1.42	2.47	1.36	0.8	4.49	ε3/ε2
	III-5	M	58	1.55	4.54	1.07	2.76	1.27	0.89	5.71	ε3/ε3
	III-6	M	55	2.33	4.08	1.09	1.93	1.44	0.84	5.01	ε3/ε3
	III-7	F	49	0.73	3.86	1.38	2.1	1.48	0.64	4.64	ε3/ε2
	III-8	M	47	1.33	4.39	0.93	2.85	1.21	0.86	2.67	ε3/ε3
	IV-3	F	29	0.77	3.01	1.28	1.38	1.38	0.47	3.13	ε3/ε3
		Mean ± SD			1.14 ± 0.42	3.76 ± 0.38 *	1.19 ± 0.09 *	2.08 ± 0.38 *	1.34 ± 0.08 *	0.68 ± 0.13	4.28 ± 1.15
Homozygous	IV-5	M	24	0.45	2.6	0.13	0.74	0.42	0.23	5.71	ε3/ε3
	IV-6	M	26	4.73	5.07	0.22	1.69	0.36	0.36	18.74	ε3/ε2
		Mean ± SD			2.74 ± 3.09	4.26 ± 1.63	0.19 ± 0.07	1.36 ± 0.62	0.64 ± 0.09	0.45 ± 0.10	12.23 ± 9.21

* Unpaired two tailed *t* test. Significantly different from unaffected family members ($p < 0,05$)

Mean ± SD adjusted for age and sex

Table VI. Lipid parameters of unaffected, heterozygote and homozygote family members for the 102delG *LCAT* mutation.

11.2 Measurement of *LCAT* activity

In vitro *LCAT* activity was measured in 2 non-affected relatives, 2 heterozygotes and in the 2 homozygotes (Table VII). The latter presented an extremely low *LCAT* activity (average 0.004 U/h) which was comparable to the background activity (0.007 U/h). The average residual *LCAT* activity of these patients was only 7% of the activity of non-affected family members. Heterozygotes had an *LCAT* activity which was 38% lower than the *LCAT* activity of non-carrier family members (average 0.037 and 0.06 U/h respectively). An estimate of the *in vivo* *LCAT* activity was obtained by measurement of the plasma free cholesterol to total cholesterol ratio. As was expected, the free cholesterol to total cholesterol ratio was markedly elevated in the homozygous patients (94.95% on average) compared to both heterozygote patients and non affected controls (30.05% and 25.90% respectively).

	ID	Total Cholesterol (mmol/L)	Free Cholesterol (mmol/L)	Free/Total %	LCAT Activity (U/h)
Unaffected	IV-2	5.47	1.43	26.1	0.057
	III-9	5.87	1.5	25.6	0.062
Heterozygote	III-6	4.16	1.25	30.0	0.036
	III-7	3.39	1.02	30.1	0.038
Homozygote	IV-5	2.65	2.42	91.3	0.004
	IV-6	4.88	4.81	98.6	0.004

Table VII. *In vitro* and *in vivo* LCAT activity of two unaffected, two heterozygote and two homozygote kindred for the 102delG LCAT mutation.

11.3 Biochemical analysis

Table VI shows the lipoprotein profiles of the different family members as well as the average values of the lipid parameters for homozygous patients, heterozygous carriers and unaffected kindred. As expected HDL-C is greatly diminished in affected homozygotes (0.19 ± 0.07 mmol/L) compared to both heterozygotes (1.19 ± 0.09 mmol/L) and non-carrier subjects (1.52 ± 0.28 mmol/L). LDL-C follows a similar trend, and is lower in homozygotes (1.36 ± 0.62 mmol/L) compared to both heterozygotes and non-carriers (2.08 ± 0.38 mmol/L and 3.21 ± 1.04 mmol/L respectively). Similarly, both apo A-I and apo B are also greatly diminished in homozygous patients compared to the two other groups. It is noteworthy that the two homozygous patients display very different lipid profiles. Patient IV-5 has low plasma triglycerides and total cholesterol (0.45 and 2.6 mmol/L respectively) with normal apo E (5.71 mg/dL) whereas patient IV-6 has hypertriglyceridemia and normal cholesterolemia (4.73 and 5.07 mmol/L respectively) as well as an elevated apo E (18.74 mg/dL).

11.4 Lipoprotein electrophoresis and chromatography

Electrophoresis of the plasma lipoprotein fractions (Figure 18A) clearly showed that both the α (HDL) and β (LDL) lipoprotein sub fractions of homozygotes were greatly diminished compared to an unaffected family member. The two homozygous patients had very different lipoprotein electrophoretic patterns. Patient IV-5 had a slow migrating band in both the total and the LDL+HDL ($d > 1.006$) fractions, compatible with the presence of a large dense lipoprotein, suggestive of LpX particles. In contrast, patient IV-6 showed a broad beta band in both the total and VLDL ($d < 1.006$) fractions. FPLC patterns, obtained from patient IV-5 (Figure 18B Top), indicated the presence of large lipoproteins rich in cholesterol and poor in triglycerides, confirming the presence of LpX particles. The FPLC pattern of patient IV-6 (Figure 18B Bottom), presented a large lipoprotein with an equimolar proportion of cholesterol and triglycerides.

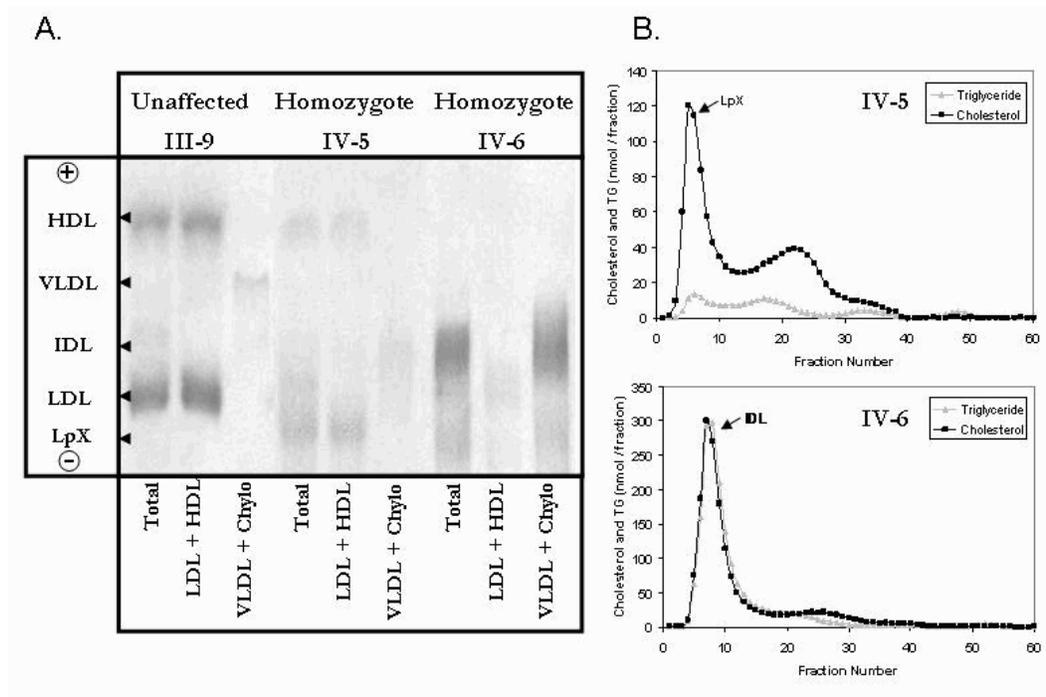


Figure 18 Characterization of lipoproteins. A: Lipoprotein electrophoretic patterns of an unaffected and both homozygote family members. Lipoprotein fractions were either applied directly (first lane for each patient) or after separation by ultracentrifugation at a density >1.006 and <1.006 (second

and third lane for each patient respectively). Homozygote members showed greatly diminished α and β fractions. An unusual slow migrating band was observed in the plasma of patient IV-5 suggestive of the presence of Lp-X particles. The plasma of patient IV-6 presented a broad beta band on electrophoresis compatible with the presence of remnant lipoproteins.

B: Fast protein liquid chromatography (FPLC) patterns of both homozygote kindred. Patient IV-5 (Top) presented a large cholesterol rich and triglyceride poor lipoprotein peak confirming the presence of LpX in the plasma. The cholesterol and triglyceride peak observed between fractions 5 and 15 in the plasma of patient IV-6 (Bottom) suggests the presence of triglyceride rich and cholesterol rich IDL particles.

12. DISCUSSION

Familial LCAT deficiency has been described in many countries including Canada (96, 102) but never in the French Canadian population. In this study, we report the first *LCAT* mutation in this population. The novel c.102delG *LCAT* mutation was identified in two patients presenting clinical characteristics compatible with familial LCAT deficiency. As is often the case with rare autosomal recessive conditions, the presence of homozygous family members resulted from a consanguineous marriage. In the case of these kindred, the parents (III-5 and III-6) of the index (IV-5) case and his affected brother (IV-6) were first cousins.

The LCAT c.102delG mutation is predicted to create a frame shift in the LCAT reading frame at amino acid 35 which leads to a stop codon at position 61 (H35fsX61). This would result in the translation of a truncated protein composed of the first 10 amino acids of the LCAT enzyme as well as 25 amino acids with no known homology. LCAT contains a catalytic triad which is essential for its enzymatic activity. This catalytic triad is highly conserved in many lipases. Serine 181 has been shown to be essential to maintain the LCAT activity. The two other residues implicated in the catalytic activity of LCAT are aspartic acid 345 and histidine 377 (50). Because of the nature of the H35fsX61 mutation, the resulting truncated LCAT protein does not contain any of the

active site amino acids. According to the classification by Kuivenhoven et al. this mutation is therefore predicted to give rise to the FLD phenotype (class I mutation) (57).

This observation is consistent with the functional biochemical studies that were performed. *In vitro* LCAT activity was greatly diminished in both brothers homozygous for the c.102delG mutation compared to heterozygotes and unaffected controls. This translates *in vivo* in an elevation of the free cholesterol to esterified cholesterol ratio of affected family members. In this study, the presence of one mutated allele conferred a 22% reduction in HDL-C and the presence of two mutated alleles was associated with an 88% reduction in HDL-C compared to unaffected kindred. This mutation was also associated with a 35% reduction in LDL-C in heterozygotes and a 57% reduction in homozygotes. The LCAT c.102delG mutation behaves in an autosomal codominant fashion with respect to the lipid phenotype, as do other class I LCAT mutations (73, 96). Indeed the presence of a mutated allele has an incremental effect on HDL-C, LDL-C, apo A-I and apo B.

It has long been recognized that there exists, even within families, a large heterogeneity in the lipid profiles of FLD patients. Indeed, early studies have shown that not all patients present LpX in their plasma (92). Furthermore, it was observed that certain LCAT deficient patients may have severe hypertriglyceridemia, whereas others do not (93-96). Little is known concerning the underlying factors explaining these differences in the lipoprotein profiles of FLD patients. We have identified two brothers, both homozygotes for the c.102delG *LCAT* mutation, presenting very different lipoprotein profiles. The index case, patient IV-5, had low plasma triglycerides (0.9 ± 0.27 mmol/L) and total cholesterol (2.67 ± 0.36 mmol/L) which remained quite stable when measured on five occasions over a two year interval. On the contrary, his brother (IV-6) had hypertriglyceridemia (8.57 ± 5.39 mmol/L) as well as a higher level of total cholesterol (5.72 ± 0.62 mmol/L). Electrophoretic

lipoprotein separation patterns were very different between these two kindred. Patient IV-5 had LpX whereas his brother did not. In this kindred, it would seem that the presence of LpX was associated with a mild proteinuria, in line with numerous observations proposing that LpX plays an important role in the progression of kidney disease in FLD ([79](#), [92](#), [103](#)).

Contrary to his brother, patient IV-6 displayed a broad beta migrating band on lipoprotein electrophoresis suggestive of the presence of remnant lipoproteins. Separation of lipoproteins by FPLC allowed for the identification of a large lipoprotein containing a nearly equimolar concentration of cholesterol and triglycerides, typical of triglyceride rich LDL or IDL particles. Furthermore, the VLDL cholesterol to triglyceride molar ratio was determined to be 0.63 which is also compatible with the presence of remnant lipoproteins. This patient presented an *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 2$ genotype, whereas his brother presented an *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype. Furthermore, we have shown that the difference in triglyceridemia observed between the two brothers was not attributable to mutations in the *LPL* or the *LIPC* genes. Mutations in the *LDLR* and defective *APOB* were excluded since none of the kindred presented any of the classical signs associated with autosomal dominant familial hypercholesterolemia (LDL-C > 95th percentile, xanthoma, premature cardiovascular disease). We hypothesize that the presence of the *APOE* $\epsilon 2$ allele contributed to the accumulation of IDL because of the slower hepatic capture of intermediate density lipoproteins in this patient with an *LCAT* $-/-$ background (Figure 19). Indeed, *LCAT* deficient patients would tend to produce VLDL at a faster rate than normal individuals ([104](#)). The deficit in lecithin:cholesterol acyltransferase activity does not allow for the formation of mature α -HDL particles, and this leads to the inhibition of cholesterol ester transfer from mature HDL to VLDL as well as the reverse transfer of triglycerides between these two lipoproteins. Through the action of lipoprotein lipase (LPL), VLDL rich in triglycerides and poor in cholesterol ester will give rise to the formation of triglyceride rich IDL.

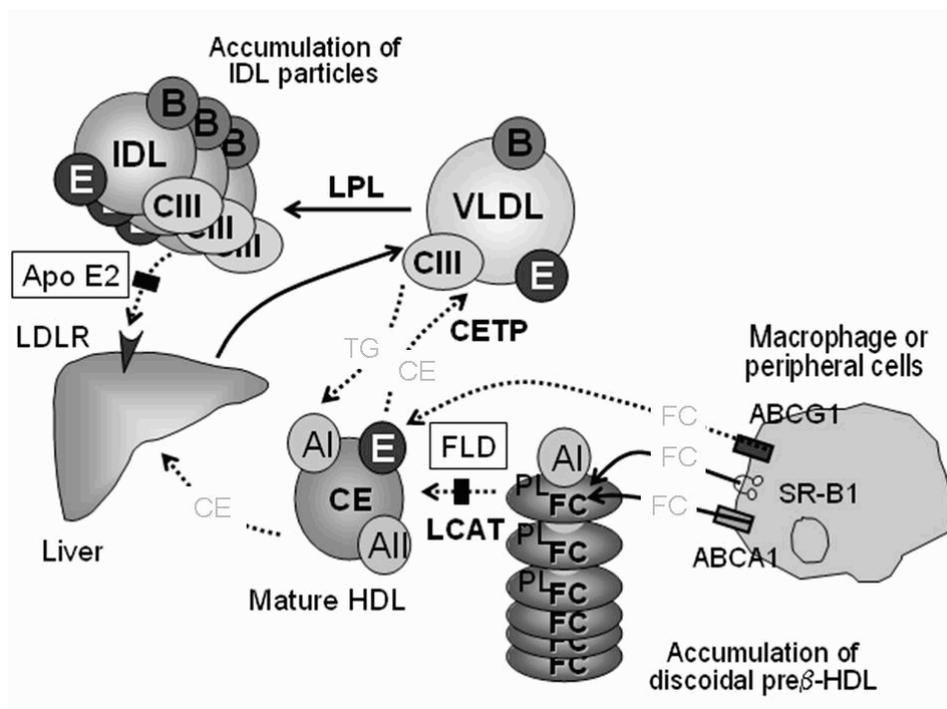


Figure 19. Proposed role of the APOE ϵ 2 allele in the hypertriglyceridemic FLD phenotype. The loss of the α LCAT activity in FLD will inhibit the formation of mature α -HDL particles. This will secondarily inhibit the exchange of triglycerides and cholesterol ester between HDL and VLDL, leading to the apparition of triglyceride rich and cholesterol ester poor VLDL particles. Through the action of LPL, these VLDL will give rise to triglyceride rich and cholesterol ester poor IDL particles. The presence of apo E2 will diminish the capture of these remnant lipoproteins causing a mixed dyslipidemia phenotype reminiscent of dysbetalipoproteinemia.

The IDL of patients presenting an epsilon 2 allele are less efficiently captured by the LDL receptor, leading to an accumulation of IDL particles and fasting hypertriglyceridemia (105). This effect of the epsilon 2 allele on triglyceridemia and cholesterolemia was not observed in kindred heterozygous for the LCAT mutation, indicating that complete inhibition of LCAT is necessary to obtain this phenotype.

Our results suggest that FLD patients with the *APOE* ϵ 3/ ϵ 2 genotype can present a lipid phenotype quite similar to the one observed in dysbetalipoproteinemia (type III Fredrickson lipoprotein phenotype) (33). Patient IV-6 also presented a high level of total plasma apo E which is

consistent with type III dyslipidemia (99). Since the frequency of the *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 2$ genotype is roughly 10-12% in the general population, *APOE* could be a significant modifier gene of the FLD lipoprotein phenotype. The effect of the *APOE* genotype on the lipid profile of FLD patients should be confirmed in other kindreds affected by familial LCAT deficiency.

It is generally recognized that FLD patients do not present a higher risk of cardiovascular disease compared to the general population (82), but this is not true in all cases. Indeed it has been shown in at least one instance that FLD can present itself with premature and severe vascular disease (81). Interestingly one of our patients also presented an important hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia and presented a mean IMT which was higher than his brother (0.65 mm vs 0.55 mm). It might be that certain patients, especially FLD patients with an epsilon 2 allele, could be at a higher risk of cardiovascular disease because of the presence of atherogenic remnant lipoproteins in their plasma (33). Studies performed in a murine model have shown that *LCAT* $-/-$ mice with a *APOE* $-/-$ background have an important elevation of triglyceridemia and cholesterolemia compared to *LCAT* $+/+$ *APOE* $-/-$ mice and more importantly, show increased atherosclerosis (83). Taken together, these observations tend to indicate that not all FLD patients will present the same lipid phenotype, and that other genes, such as *APOE*, may play an important role in the modulation of triglyceridemia and cholesterolemia in these patients.

CHAPITRE III: Impact de la dysbêtalipoprotéïnémie sur la distribution des sous-familles de HDL chez les patients atteints de FLD.

Ce manuscrit n'a pas encore été soumis pour publication

Alexis Baass¹, Hanny Wassef¹, Bella Asztalos², Ernst Schaefer², Robert Dufour¹, Jean Davignon¹

¹Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group, Clinical Research Institute of Montreal (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal, QC, Canada, H2W1R7

²Lipid Metabolism Laboratory, Jean Mayer US Department of Agriculture Human Nutrition Research Centre on Aging at Tufts University, Boston , MA, USA.

13. Introduction

Tous les patients atteints de déficit familial de LCAT ne présentent pas le même phénotype lipidique. Certains patients ont une concentration plasmatique en triglycérides normale alors que d'autres ont une hypertriglycémie marquée (93-96). L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de la présence d'une dysbétalipoprotéïnémie sur la distribution des HDL par électrophorèse en deux dimensions chez un patient atteint de FLD. Une étude pionnière utilisant la microscopie électronique a montré que les patients atteints de déficit familial de LCAT ont des HDL de morphologie anormale (71). Deux types de HDL anormaux ont été identifiés : des HDL discoïdales d'une taille de 40Å par 200 Å qui ont tendance à former des rouleaux ainsi que des petites particules sphériques de 45-80Å de diamètre. Asztalos et al. ont étudié la distribution des HDL par électrophorèse en deux dimensions dans une cohorte de 11 patients atteints de déficit familial de LCAT (106). L'électrophorèse des HDL en deux dimensions permet de séparer les sous-familles de HDL par charge dans une première dimension puis par taille dans une seconde dimension. Cette étude a montré que les patients atteints de déficit familial de LCAT vont présenter principalement des HDL discoïdales et faiblement lipidés pré β -1 ainsi que des HDL sphériques de petite taille, les HDL α -4. Les patients enrôlés dans cette étude présentaient des concentrations de triglycérides très variables avec une moyenne de 2,3 mmol/L et un écart type de 1,7 mmol/L. Étant donné l'interrelation étroite entre les HDL et les lipoprotéines riches en triglycérides, via l'action de la CETP, il nous a paru intéressant d'étudier l'impact de la triglycémie sur la morphologie des HDL chez les patients avec un déficit de LCAT. Étant donné la rareté de cette maladie, nous avons effectué une étude pilote avec les deux seuls patients canadiens français identifiés à ce jour.

14. Matériel et méthodes

14.1. Sujets

Deux frères homozygotes pour la mutation 102delG de la LCAT et présentant les symptômes cliniques caractéristiques du déficit familial de LCAT ont été enrôlés dans cette étude. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques de ces patients ont été présentées précédemment (107). Brièvement, le sujet IV-5 présente des niveaux de cholestérol plasmatiques de 2,6 mmol/L et une triglycéridémie de 0,45 mmol/L. Le sujet IV-6 présente un phénotype de dyslipidémie de type III avec une concentration de cholestérol plasmatique de 5,07 mmol/L et une triglycéridémie de 4,73 mmol/L.

14.2. Électrophorèse en deux dimensions du HDL

La méthodologie employée pour effectuer la séparation des sous-familles de HDL par électrophorèse en deux dimensions a été décrite précédemment (106). Brièvement, quatre microlitres de plasma ont été appliqués sur un gel vertical d'agarose (0.7%). La séparation électrophorétique dans la première dimension a été effectuée sous un voltage de 250 V jusqu'à une migration du front de 3.5 cm à partir de l'origine. Le gel d'agarose a alors été appliqué sur un gel non dénaturant de gradient de polyacrylamide (3-35%). L'électrophorèse dans la seconde dimension a été effectuée à 250 V pour 24 heures à 10°C, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose à 30 V pour 24 heures à 10°C. Les sous-familles de HDL ont été identifiées grâce à l'utilisation d'anticorps anti-apo A-I monoclonaux de chèvre et d'un anticorps secondaire marqué à l'iode I¹²⁵. La quantification de la radioactivité a été effectuée avec un FluoroImager (Molecular Diagnostics).

15. Résultats

La figure 20 présente l'électrophorèse en deux dimensions d'un individu de contrôle, ainsi que des deux frères atteints de déficit familial de LCAT. Le tableau VIII présente les résultats de la quantification des sous-classes de HDL pour ces trois individus. Le sujet IV-6 présente une importante fraction de ces HDL sous la forme de HDL pré- β (77,9%) comparé au sujet IV-5 (31,0%) et au sujet témoin (contrôle) (7,6%). Les sujets IV-5 et IV-6 vont présenter une sous-famille de HDL, les HDL pré- β -1x, non retrouvée chez le sujet témoin. De plus, le sujet IV-6 présente une faible proportion de HDL α (22,1%) par rapport au sujet IV-5 (69,1%) et au sujet témoin (89,6%). Les deux patients atteints de déficit familial de LCAT ont également des HDL de grande taille de mobilité α , non retrouvées chez le sujet témoin : les HDL α -1x

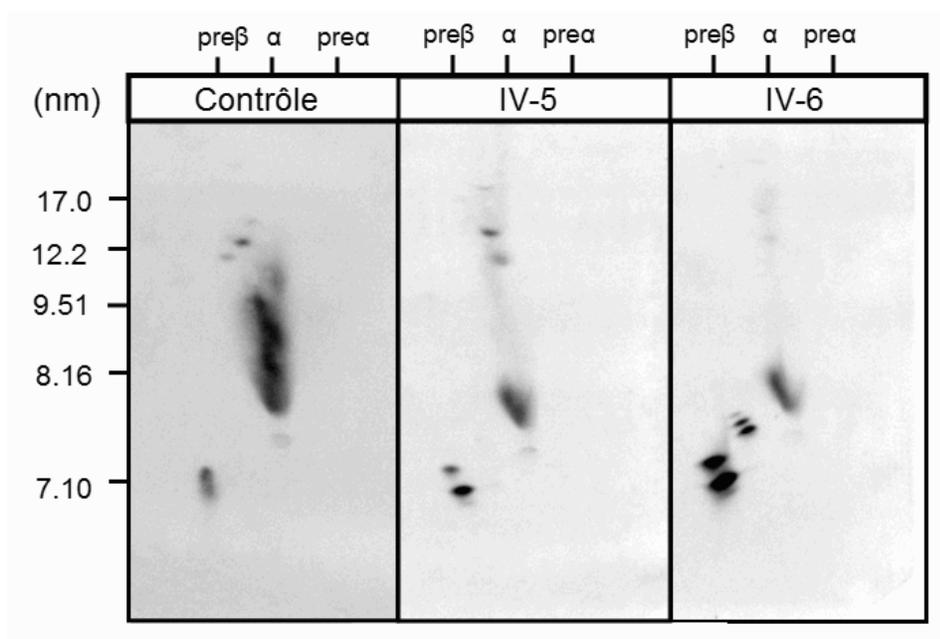


Figure 20. Séparation des sous-populations de HDL chez un sujet témoin (contrôle) et chez deux patients atteints de FLD.

	Contrôle	IV-5	IV-6
Pre β -1	5.1%	30.5%	66.1%
Pre β -1x	ND	0.5%	11.8%
Pre β -2	2.4%	ND	ND
Total Pre β	7.6%	31.0%	77.9%
α -1x	ND	12.6%	1.1%
α -1	10.8%	ND	ND
α -2	43.6%	ND	ND
α -3	24.2%	ND	ND
α -4	11.0%	56.5%	21.0%
Total α	89.6%	69.1%	22.1%
Pre α -1	0.5%	ND	ND
Pre α -2	1.8%	ND	ND
Pre α -3	0.6%	ND	ND
Pre α -4	0.1%	ND	ND
Total Pre α	3.0%	ND	ND

Tableau VIII. Quantification des sous-populations de HDL chez un sujet témoin (contrôle) et chez deux patients atteints de FLD.

16. Discussion

Chez les patients atteints de déficit familial de LCAT, la majorité des HDL sont sous la forme de petites particules à faible teneur en lipide: les HDL pre β -1 et les HDL α -4. Curieusement, des lipoprotéines de mobilité α de grande taille (~20 nm) et contenant de l'apo A-I (HDL α -1x) ont été identifiées chez les homozygotes et non chez le contrôle. Il est possible qu'il s'agisse d'un empilement serré de plusieurs HDL discoïdales en rouleaux qui contribuerait à augmenter la taille apparente de ces amas de particules.

Des différences marquantes dans la distribution des HDL ont été observées entre les sujets IV-5 et IV-6. En effet le sujet IV-6 présente encore plus de HDL sous leurs formes pre β discoïdale que le sujet IV-5. Il est possible que l'hypertriglycémie et l'accumulation de particules de IDL dans le plasma du patient IV-6 contribuent à activer la CETP. Ceci aurait pour effet d'augmenter les échanges de triglycérides des VLDL vers les HDL et de diminuer davantage la quantité de cholestérol au niveau des HDL. Ces HDL enrichies en TG pourront être la cible de la lipase hépatique qui va hydrolyser les TG des HDL et donc, diminuer le contenu lipidique du cœur de ces HDL. Les quelques HDL sphériques α vont se transformer en HDL pre β discoïdales.

CHAPITRE IV : CONCLUSION

À ce jour, plus de 1800 maladies monogéniques ont été identifiées. Les maladies monogéniques causant un phénotype lipidique extrême, tel que l'hypercholestérolémie familiale (28), sont des maladies souvent rares mais leur étude a contribué énormément au développement de nos connaissances dans le domaine du métabolisme des lipoprotéines et de l'athérosclérose. L'étude des gènes causant ces maladies monogéniques rares a également permis l'identification de polymorphismes de ces gènes (SNP, single nucleotide polymorphisms) dont la fréquence est assez élevée dans la population générale. Les études récentes de type 'whole genome scanning' permirent d'identifier les gènes les plus importants dans la régulation des niveaux de lipides plasmatiques, mais une grande partie de la variabilité interindividuelle du bilan lipidique reste à ce jour inexplicée. L'étude de l'interaction entre ces gènes pourra nous en apprendre davantage sur les phénotypes complexes. En effet, il apparaît de plus en plus clairement que la présence de multiples polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides aurait un impact synergique sur les paramètres du bilan lipidique (20).

Le déficit familial de LCAT est une maladie extrêmement rare, causée par des mutations du gène *LCAT* dont la conséquence est la perte totale des activités α -LCAT et β -LCAT. Le phénotype typique est une hypoalphalipoprotéïnémie sévère, des arcs cornéens précoces, une anémie ainsi que de la protéinurie et une insuffisance rénale. Nous avons identifié les premiers cas canadiens français atteints de déficit familial de LCAT. Les deux patients décrits présentaient une nouvelle mutation du gène de la LCAT: la mutation 102delG, dont la conséquence est la formation d'une protéine tronquée. Cette mutation cause l'abolition complète de l'activité LCAT *in vitro* et *in vivo* chez les sujets homozygotes, alors que les porteurs hétérozygotes présentaient une activité diminuée de moitié par rapport aux non-porteurs. La mutation 102delG de la LCAT entraîne également une baisse importante du C-HDL, du C-LDL, de

l'apo A-I, de l'apo-B et cette baisse est proportionnelle au nombre d'allèles mutés. Nous avons aussi noté que deux frères porteurs de la même mutation avaient des phénotypes lipidiques très différents. L'un d'entre eux présentait un phénotype lipidique classique de FLD accompagné d'une accumulation de LpX plasmatiques alors que l'autre présentait une hypertriglycéridémie et une accumulation de IDL dans son plasma, phénotype classique d'une dysbétalipoprotéïnémie. Nous avons émis l'hypothèse que la présence d'un allèle $\epsilon 2$ du gène *APOE* était la cause de l'apparition d'un phénotype lipidique de type III chez un des deux patients atteint d'un déficit familial de la LCAT. Nous avons également montré que les deux patients avaient une distribution de HDL très différente, le sujet *LCAT* -/- atteint de dysbétalipoprotéïnémie présentant une proportion plus élevée de HDL immatures par rapport à son frère ou à un sujet témoin.

Notre étude souffre toutefois du fait que nous avons identifié uniquement deux individus atteints de déficit familial de LCAT. Ceci rend difficile la recherche systématique des polymorphismes génétiques qui pourraient être impliqués dans la modification du phénotype lipidique et de l'apparition de la dysbétalipoprotéïnémie chez les patients atteints de FLD. Il faudrait mettre sur pied une collaboration internationale afin d'obtenir un maximum de sujets atteints de cette maladie extrêmement rare dans le but d'avoir une puissance statistique suffisante pour identifier les gènes contribuant aux modifications du bilan lipidiques chez les patients atteints de FLD. De plus, il serait important d'identifier les gènes qui contribuent à la modulation des niveaux plasmatiques de LpX car ces lipoprotéines anormales jouent un rôle important dans la progression de la maladie rénale chez les patients atteints de FLD. Étant donné que l'insuffisance rénale est la cause principale de mortalité et de morbidité des patients atteints de FLD, l'identification d'une thérapie visant à diminuer les niveaux de LpX aurait un impact positif sur la progression de cette maladie.

Étant donné que la mutation 102delG de la *LCAT* est la première mutation de ce gène identifiée dans la population canadienne française, il serait intéressant de déterminer la prévalence de cette mutation au Québec. Pour débiter il serait important de sélectionner une cohorte de sujets atteints d'hypoalphalipoprotéinémie, pour augmenter la probabilité d'identifier d'autres porteurs de cette mutation. Si la prévalence de cette mutation s'avère suffisamment élevée chez les patients atteints d'hypoalphalipoprotéinémie, il pourrait être utile d'étudier la prévalence de cette mutation sur un échantillon représentatif de la population Québécoise. Ceci nous permettra éventuellement d'identifier un effet fondateur pour la mutation 102delG de la *LCAT* au Québec.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kraushaar LE, Kramer A. Are we losing the battle against cardiometabolic disease? The case for a paradigm shift in primary prevention. *BMC Public Health* 2009;9:64.
2. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961;55:33-50.
3. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1987;59:9G-17G.
4. Keil U, Kuulasmaa K. WHO MONICA Project: risk factors. *Int J Epidemiol* 1989;18:S46-55.
5. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.
6. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984;251:351-64.
7. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984;251:365-74.
8. Grodos D, Tonglet R. Scandinavian simvastatin study (4S). *Lancet* 1994;344:1768.
9. Barringer TA, 3rd. WOSCOPS. West of Scotland Coronary Prevention Group. *Lancet* 1997;349:432-3.
10. Hjermmann I, Velve Byre K, Holme I, Leren P. Effect of diet and smoking intervention on the incidence of coronary heart disease. Report

- from the Oslo Study Group of a randomised trial in healthy men. *Lancet* 1981;2:1303-10.
11. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-78.
 12. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;354:1264-72.
 13. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62:707-14.
 14. Ashen MD, Blumenthal RS. Clinical practice. Low HDL cholesterol levels. *N Engl J Med* 2005;353:1252-60.
 15. Albrink MJ, Krauss RM, Lindgren FT, von der Groeben J, Pan S, Wood PD. Intercorrelations among plasma high density lipoprotein, obesity and triglycerides in a normal population. *Lipids* 1980;15:668-76.
 16. Joy T, Hegele RA. The end of the road for CETP inhibitors after torcetrapib? *Curr Opin Cardiol* 2009;24:364-71.
 17. Klos KL, Kullo IJ. Genetic determinants of HDL: monogenic disorders and contributions to variation. *Curr Opin Cardiol* 2007;22:344-51.
 18. Gagné C, Gaudet, D. Les dyslipoprotéinémies l'approche clinique. 3ième ed, 2007.
 19. Schaefer E. Lipoprotéines de haute densité et insuffisance coronarienne. 1st ed: Gower Medical Publishing, 1990.
 20. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 2009;10:109-21.
 21. Armand M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:156-64.

22. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2461-83.
23. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1183-94.
24. Davidson NO, Shelness GS. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr* 2000;20:169-93.
25. Hussain MM, Iqbal J, Anwar K, Rava P, Dai K. Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. *Front Biosci* 2003;8:s500-6.
26. Redgrave TG. Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* 2004;32:79-82.
27. Griffin BA, Packard CJ. Metabolism of VLDL and LDL subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:200-6.
28. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:431-8.
29. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-6.
30. Fredrickson DS, Lees RS. A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation* 1965;31:321-7.
31. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 2000;4:101-8.
32. Davignon J, Dufour, R. Primary Hyperlipidemias. 1st ed: Clinical Publishing, 2007.
33. Smelt AH, de Beer F. Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 2004;4:249-57.

34. Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999;40:1933-49.
35. Barter P, Rye, K. High Density Lipoprotein Cholesterol: A Handbook for Clinicians. 3rd ed: Sherborne Gibbs, 2007.
36. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5:1431-45.
37. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta* 1993;1169:291-300.
38. Pownall HJ, Ehnholm C. The unique role of apolipoprotein A-I in HDL remodeling and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:209-13.
39. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S195-200.
40. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;96:1221-32.
41. Sviridov D, Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:157-63.
42. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;41:56-65.
43. Chiesa G, Sirtori CR. Apolipoprotein A-I(Milano): current perspectives. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:159-63.
44. Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:321-30.

45. Rahalkar AR, Giffen F, Har B, Ho J, Morrison KM, Hill J, et al. Novel LPL mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:151-60.
46. Glomset JA, Parker F, Tjaden M, Williams RH. The esterification in vitro of free cholesterol in human and rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1962;58:398-406.
47. Santamarina-Fojo S, Hoeg J, Assmann G, Brewer HB, Jr. Chapter 118: Lecithin Cholesterol Acyltransferase Deficiency and Fish Eye Disease. In: Valle, Beaudet, Vogelstein, Kinzler, Antonarakis, Ballabio, eds. *Scriver's Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease Vol.*, 2008.
48. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:245-56.
49. Peelman F, Vinaimont N, Verhee A, Vanloo B, Verschelde JL, Labeur C, et al. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. *Protein Sci* 1998;7:587-99.
50. Peelman F, Verschelde JL, Vanloo B, Ampe C, Labeur C, Tavernier J, et al. Effects of natural mutations in lecithin:cholesterol acyltransferase on the enzyme structure and activity. *J Lipid Res* 1999;40:59-69.
51. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9:155-67.
52. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46:1493-8.
53. Chen CH, Albers JJ. Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:1091-6.

54. Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1966;7:638-48.
55. McLean J, Wion K, Drayna D, Fielding C, Lawn R. Human lecithin-cholesterol acyltransferase gene: complete gene sequence and sites of expression. *Nucleic Acids Res* 1986;14:9397-406.
56. Azoulay M, Henry I, Tata F, Weil D, Grzeschik KH, Chaves ME, et al. The structural gene for lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) maps to 16q22. *Ann Hum Genet* 1987;51:129-36.
57. 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.
58. Norum KR, Gjone E. Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1967;144:698-700.
59. Carlson LA, Philipson B. Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia. *Lancet* 1979;2:922-4.
60. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin:cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16:163-71.
61. Carlson LA, Holmquist L. Evidence for deficiency of high density lipoprotein lecithin: cholesterol acyltransferase activity (alpha-LCAT) in fish eye disease. *Acta Med Scand* 1985;218:189-96.
62. Stokke KT, Norum KR. Determination of lecithin: cholesterol acyltransferase in human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1971;27:21-7.

63. Chen CH, Albers JJ. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin: cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 1982;23:680-91.
64. <http://www.emdbiosciences.com/product/428900>. (Accessed.
65. Albers JJ, Adolphson JL, Chen CH. Radioimmunoassay of human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J Clin Invest* 1981;67:141-8.
66. Narayanan S. Lipoprotein-X. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1979;11:31-51.
67. Forte T, Nichols A, Glomset J, Norum K. The ultrastructure of plasma lipoproteins in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1974;137:121-32.
68. Narayanan S. Biochemistry and clinical relevance of lipoprotein X. *Ann Clin Lab Sci* 1984;14:371-4.
69. Gjone E, Javitt NB, Blomhoff JP, Fausa O. Studies of lipoprotein-X (LP-X) and bile acids in familial LCAT deficiency. Preliminary report. *Acta Med Scand* 1973;194:377-8.
70. Utermann G, Menzel HJ, Langer KH, Dieker P. Lipoproteins in lecithin-cholesterol-acyltransferase(LCAT)-deficiency. II. Further studies on the abnormal high-density-lipoproteins. *Humangenetik* 1975;27:185-7.
71. Forte T, Norum KR, Glomset JA, Nichols AV. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: structure of low and high density lipoproteins as revealed by electron microscopy. *J Clin Invest* 1971;50:1141-8.
72. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, et al. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J Clin Invest* 1994;93:321-30.
73. Calabresi L, Pisciotta L, Costantin A, Frigerio I, Eberini I, Alessandrini P, et al. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase

- deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1972-8.
74. Vrabec MP, Shapiro MB, Koller E, Wiebe DA, Henricks J, Albers JJ. Ophthalmic observations in lecithin cholesterol acyltransferase deficiency. *Arch Ophthalmol* 1988;106:225-9.
75. Winder AF, Garner A, Sheraidah GA, Barry P. Familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Biochemistry of the cornea. J Lipid Res* 1985;26:283-7.
76. Suda T, Akamatsu A, Nakaya Y, Masuda Y, Desaki J. Alterations in erythrocyte membrane lipid and its fragility in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *J Med Invest* 2002;49:147-55.
77. Norum KR, Gjone E. The influence of plasma from patients with familial plasma lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency on the lipid pattern of erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;22:94-8.
78. Myhre E, Gjone E, Flatmark A, Hovig T. Renal failure in familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Nephron* 1977;18:239-48.
79. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC, et al. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem* 2001;276:15090-8.
80. Homma S, Murayama N, Yoshida I, Kusano E, Kuriki K, Saito K, Asano Y. Marked atherosclerosis in a patient with familiar lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency associated with end-stage renal disease and diabetes mellitus. *Am J Nephrol* 2001;21:415-9.
81. Scarpioni R, Paties C, Bergonzi G. Dramatic atherosclerotic vascular burden in a patient with familial lecithin-cholesterol acyltransferase

- (LCAT) deficiency. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1074; author reply -5.
82. Ayyobi AF, McGladdery SH, Chan S, John Mancini GB, Hill JS, Frohlich JJ. Lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency and risk of vascular disease: 25 year follow-up. *Atherosclerosis* 2004;177:361-6.
83. Furbee JW, Jr., Sawyer JK, Parks JS. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice. *J Biol Chem* 2002;277:3511-9.
84. Naghashpour M, Cualing H. Splenomegaly with sea-blue histiocytosis, dyslipidemia, and nephropathy in a patient with lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: a clinicopathologic correlation. *Metabolism* 2009.
85. Viestenz A, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Seitz B, Kuchle M. Histopathology of corneal changes in lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. *Cornea* 2002;21:834-7.
86. Stoynovska BB. Successful renal transplantation in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Transpl Int* 1992;5:187.
87. Yee MS, Pavitt DV, Richmond W, Cook HT, McLean AG, Valabhji J, Elkeles RS. Changes in lipoprotein profile and urinary albumin excretion in familial LCAT deficiency with lipid lowering therapy. *Atherosclerosis* 2009.
88. Aranda P, Valdivielso P, Pisciotta L, Garcia I, Garca AAC, Bertolini S, et al. Therapeutic management of a new case of LCAT deficiency with a multifactorial long-term approach based on high doses of angiotensin II receptor blockers (ARBs). *Clin Nephrol* 2008;69:213-8.

89. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:245-56.
90. Lewis G, Rader D. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research* 2005;96:1221-32.
91. Imbasciati E, Paties C, Scarpioni L, Mihatsch MJ. Renal lesions in familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. Ultrastructural heterogeneity of glomerular changes. *Am J Nephrol* 1986;6:66-70.
92. Gjone E, Blomhoff JP, Skarbovik AJ. Possible association between an abnormal low density lipoprotein and nephropathy in lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Clin Chim Acta* 1974;54:11-8.
93. Moriyama K, Sasaki J, Arakawa F, Takami N, Maeda E, Matsunaga A, et al. Two novel point mutations in the lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene resulting in LCAT deficiency: LCAT (G873 deletion) and LCAT (Gly344-->Ser). *J Lipid Res* 1995;36:2329-43.
94. Ohta T, Hattori S, Nakamura R, Horiuchi S, Frohlich J, Takata K, et al. Characterization of subspecies of apolipoprotein A-I-containing lipoprotein in homozygotes for familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1137-45.
95. Funke H, von Eckardstein A, Pritchard PH, Hornby AE, Wiebusch H, Motti C, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. Six newly identified defective alleles further contribute to the structural heterogeneity in this disease. *J Clin Invest* 1993;91:677-83.
96. Frohlich J, McLeod R, Pritchard PH, Fesmire J, McConathy W. Plasma lipoprotein abnormalities in heterozygotes for familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Metabolism* 1988;37:3-8.

97. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545-8.
98. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
99. Cohn JS, Tremblay M, Amiot M, Bouthillier D, Roy M, Genest J, Jr., Davignon J. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-sized remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:149-59.
100. Warnick GR, Albers JJ. A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1978;19:65-76.
101. Tallis GA, Shephard MD, Whiting MJ. Lipoprotein profiling by high performance gel chromatography. *Clin Chim Acta* 1994;228:171-9.
102. Frohlich J, Godolphin WJ, Reeve CE, Evelyn KA. Familial LCAT deficiency. Report of two patients from a Canadian family of Italian and Swedish descent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1978;150:156-61.
103. Lynn EG, Choy PC, Magil A, O K. Uptake and metabolism of lipoprotein-X in mesangial cells. *Mol Cell Biochem* 1997;175:187-94.
104. Berglund L. Lipoprotein metabolism: a well-tried tool to characterize dyslipidemic mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1201-3.
105. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
106. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, Yamashita S, Miller M, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res* 2007;48:592-9.

107. Baass A, Wassef H, Tremblay M, Bernier L, Dufour R, Davignon J. Characterization of a new LCAT mutation causing familial LCAT deficiency (FLD) and the role of APOE as a modifier gene of the FLD phenotype. *Atherosclerosis* 2009;207:452-7.

PUBLICATIONS ET PRÉSENTATIONS

Publications

1. Baass A, Wassef H, Tremblay M, Bernier L, Dufour R, Davignon J. Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial *LCAT* deficiency (FLD) and the role of *APOE* as a modifier gene of the FLD phenotype. *Atherosclerosis* 2009;207:452-7.
2. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, Levy E, Davignon J, Lambert M. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem*. 2009;55:1637-45.
3. Baass A. La Xanthochromie dans le Diagnostic de l'Hémorragie Sous Arachnoïdienne. *Annales de Biologie Clinique du Québec*. 2007; 44:29-33.
4. Berlanga JJ, Baass A, Sonenberg N. Regulation of poly(A) binding protein function in translation: Characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *RNA*. 2006;12:1556-68.

Présentations

1. Société de lipidologie de Montréal (SLIM) Novembre 2009
Invited speaker: An unusual case of low C-HDL
2. Congrès annuel AMBQ/AMBC (Association des médecins biochimistes du Québec/Canada) 2009
Présentation orale: Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial *LCAT* deficiency (FLD)
3. 11^{ème} Journée de recherche du CHUM (Centre hospitalier de l'Université de Montréal) 2009
Présentation orale: Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial *LCAT* deficiency (FLD).
4. Journée de la recherche des étudiants de l'IRCM (Institut de recherche clinique de Montréal) 2009
Présentation par poster: Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial *LCAT* deficiency (FLD).
5. 10th congrès de la SQLNM (Société Québécoise de lipidologie, nutrition et métabolisme) 2009
Présentation par poster: Characterization of a new *LCAT* mutation causing familial *LCAT* deficiency (FLD).
6. 15th International Symposium on Atherosclerosis 2009

Présentation orale: Plasma PCSK9 varies with age and sex in a pediatric population and is associated with multiple markers of metabolism.

Prix

1. Meilleure présentation orale du congrès de l'AMBQ 2009
2. Meilleure présentation orale de la journée de la recherche du CHUM 2009