

AGNES PASCOT

**LA DEFICIENCE FAMILIALE EN LIPOPROTEINE LIPASE (LPL):  
CARACTERISATION D'UNE COHORTE DE PATIENTS LIPEMIQUES  
ET ETUDE DE LA PRODUCTION *IN VITRO* DE LPL PAR DES  
MACROPHAGES.**

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
Médecine Expérimentale  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

AVRIL 1997

© Agnès Pascot, 1997



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-31772-2

Canada

## RÉSUMÉ

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme qui joue un rôle clef dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. L'expression phénotypique de la déficience en LPL chez les porteurs hétérozygotes est caractérisée par une dyslipidémie associée à une lipémie postprandiale prolongée, un état prédisposant à l'athérosclérose. Connaissant l'incidence élevée de cette déficience dans la population québécoise, le premier objectif de ce mémoire visait à déterminer l'incidence de mutations du gène de la LPL dans une cohorte de patients lipémiques. Puisque les macrophages produisent de la LPL et que leur présence a été associée à la formation de la plaque athérosclérotique, le deuxième objectif visait à étudier la production *in vitro* de LPL par des macrophages déficients en LPL et l'effet du Bezafibrate, un hypolipidémiant. En conclusion, nous avons démontré une incidence élevée de déficience en LPL dans la cohorte de patients lipémiques et identifié une baisse de production de la protéine LPL par les macrophages d'hétérozygotes.

Agnès Pascot

Pierre Julien, Ph.D.

## AVANT-PROPOS

**Je remercie spécialement le Dr Pierre Julien pour la direction de ce mémoire, ses conseils et son support financier tout au long de mes travaux de maîtrise.**

**Je tiens également à remercier:**

**-Le Dr Ven Murthy, co-directeur de mes travaux, pour la lecture de ce mémoire et son aide à la détection des mutations.**

**-Le Dr Claude Gagné, pour la lecture de ce mémoire et sa contribution clinique.**

**-Marie-Claude Vohl, étudiante graduée, pour son support moral, ses encouragements et son aide inestimable dans l'analyse statistique des résultats.**

**-François Cadédis, post-doctorat, pour sa patience et les mesures de la masse de LPL.**

**-Mme Nicole Roy, infirmière, pour sa gentillesse et les nombreux prélèvements.**

**-Les étudiants gradués du C.R.M.L., pour leurs conseils et leur contribution à ma formation scientifique.**

**-Le personnel du C.R.M.L., pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs encouragements.**

**-Mes parents qui m'ont permis de faire ces études et me soutiennent continuellement dans mes démarches et décisions.**

**-Martin Grégoire pour son support constant et ses encouragements à continuer.**

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
ABREVIATIONS .....	ix

### CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Caractérisation des lipoprotéines.....	2
1.2 Métabolisme des triglycérides d'origine alimentaire .....	3
1.3 Les lipases.....	5
1.4 La lipoprotéine lipase .....	8
1.4.1 Historique de la LPL .....	8
1.4.2 Structure et fonction de la LPL.....	9
1.4.3 Régulation de la LPL.....	12
1.5 Mutations dans les séquences codantes du gène de la LPL .....	14
1.6 La déficience familiale en LPL .....	16
1.6.1 Historique.....	16
1.6.2 L'état homozygoté pour la déficience en LPL.....	16
1.6.3 L'état hétérozygoté pour la déficience en LPL .....	19
1.7 La LPL chez les macrophages.....	22
1.8 L'athérosclérose.....	24
1.9 Le Bezafibrate et la LPL.....	25
1.10 Problématique et hypothèses .....	26

<b>CHAPITRE 2. L'occurrence fréquente des allèles mutés de la LPL (G188E, P207L and N291S) chez des patients lipémiques d'origine canadienne-française. ....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPITRE 3. Etudes <i>in vitro</i> de macrophages dérivés de monocytes de sujets hétérozygotes pour la déficience en LPL: Effet du Bezafibrate. ....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE 4. CONCLUSION.....</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 1.....</b>	<b>88</b>

## LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 1

<b>Tableau I: Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines.....</b>	<b>3</b>
<b>Tableau II: Structure et fonction du gène de la LPL humaine.....</b>	<b>10</b>
<b>Tableau III: Mutations du gène de la LPL retrouvées dans la population canadienne-française du Québec. ....</b>	<b>15</b>
<b>Tableau IV: Profils lipidiques du plasma dans la déficience primaire en LPL chez des patients dont l'activité de la LPL est absente.....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau V: Masse immunoréactive de LPL et activités lipasiques chez des porteurs d'une mutation (P207L ou G188E) pour la déficience partielle en LPL. ....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau VI: Profils lipidiques du plasma dans la déficience partielle en LPL (P207L ou G188E) .....</b>	<b>20</b>

## CHAPITRE 2

<b>Tableau 1: Occurrence de mutations dans le gène de la LPL chez des patients sélectionnés de façon aléatoire à la clinique des lipides de Québec et chez des patients lipémiques avec de hauts niveaux de triglycérides (&gt;10 mmol/l).....</b>	<b>48</b>
<b>Tableau 2: Caractéristiques cliniques des patients lipémiques.....</b>	<b>49</b>
<b>Tableau 3: Fréquences des isoformes de l'apoE chez les sujets contrôles et lipémiques.....</b>	<b>50</b>

<b>Tableau 4: Concentrations plasmatiques des lipoprotéines et des niveaux d'apolipoprotéines chez les patients lipémiques.....</b>	<b>51</b>
<b>Tableau 5: Corrélations entre les niveaux de TG et les niveaux de cholestérol LDL et HDL. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tableau 6: Caractéristiques cliniques et niveaux de lipoprotéines chez deux patients homozygotes pour la mutation N291S du gène de la LPL. ....</b>	<b>53</b>

### **CHAPITRE 3**

<b>Tableau 1: Données anthropométriques et profils des lipides et des lipoprotéines du plasma des sujets hétérozygotes et contrôles. ....</b>	<b>77</b>
---	-----------



## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

Figure 1: Métabolisme des TG exogènes et endogènes.. .....7

## CHAPITRE 2

Figure 1: Détection de la mutation N291S du gène de la LPL.. .....55

## CHAPITRE 3

Figure 1: Détection de la mutation P207L du gène de la LPL.....80

Figure 2: Autoradiogramme des produits RT-PCR des ARNm de la LPL provenant de macrophages dérivés de monocytes humains et de tissu adipeux de rat.....81

Figure 3: Ratios d'ARNm de la LPL obtenus par RT-PCR de l'ARN synthétisé par des macrophages dérivés de monocytes humains en culture, provenant de sujets contrôles et hétérozygotes... .....82

Figure 4: Masse de la LPL sécrétée par des macrophages dérivés de monocytes humains provenant de sujets contrôles et hétérozygotes... .....83

Figure 5: Activité de la LPL sécrétée par des macrophages dérivés de monocytes humains provenant de sujets contrôles et hétérozygotes... .....84

## ABBREVIATIONS

<b>AA:</b>	<b>acides aminés</b>
<b>Apo:</b>	<b>apolipoprotéines</b>
<b>ARN:</b>	<b>acide ribonucléique</b>
<b>ARNm:</b>	<b>ARN messenger</b>
<b>BMI:</b>	<b>body mass index</b>
<b>CETP:</b>	<b>cholesterol ester transfer protein</b>
<b>HDL:</b>	<b>high density lipoprotein</b>
<b>HFC:</b>	<b>hyperlipidémie familiale combinée</b>
<b>ICAM-1:</b>	<b>intercellular adhesion molecule-1</b>
<b>IDL:</b>	<b>intermediary density lipoprotein</b>
<b>kb:</b>	<b>kilo bases</b>
<b>kDa:</b>	<b>kilodalton</b>
<b>LDL:</b>	<b>low density lipoprotein</b>
<b>LH:</b>	<b>lipase hépatique</b>
<b>LHS:</b>	<b>lipase hormono-sensible</b>
<b>LP:</b>	<b>lipase pancréatique</b>
<b>LPL:</b>	<b>lipoprotéine lipase</b>
<b>LRP:</b>	<b>LDL receptor-related protein</b>
<b>MCT:</b>	<b>medium chain triglyceride</b>
<b>mmol/l:</b>	<b>millimoles par litre</b>
<b>pb:</b>	<b>paire de bases</b>
<b>PDGF:</b>	<b>platelet-derived growth factor</b>
<b>TG:</b>	<b>triglycéride(s)</b>
<b>VCAM-1:</b>	<b>vascular cell adhesion molecule-1</b>
<b>VLDL:</b>	<b>very low density lipoprotein</b>

**CHAPITRE 1**

**INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

### 1.1- Caractérisation des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules sphériques en circulation dans le plasma. Elles contiennent un noyau polaire composé de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol et elles sont recouvertes d'une couche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et de protéines qui permettent le transport de lipides hydrophobes. Les lipoprotéines ont été regroupées en différentes classes selon leur densité, leur diamètre, leur mobilité à l'électrophorèse ou leur teneur relative en lipides et en protéines (Tableau I) (Fruchart, 1989). Les lipoprotéines les plus volumineuses sont les chylomicrons avec un diamètre de plus de 1000 angströms. Les chylomicrons sont produits par l'intestin et sont riches en TG (85-95%) et pauvres en protéines (1-2%), ce qui leur confère une densité inférieure à 0.95 g/ml. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL: very low density lipoproteins) sont sécrétées par le foie. Les TG des VLDL sont hydrolysés par la LPL et les VLDL deviennent ainsi des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL: intermediate density lipoprotein) puis des lipoprotéines de faible densité (LDL: low density lipoprotein). Les lipoprotéines de haute densité (HDL: high density lipoprotein) sont synthétisées par l'intestin puis sécrétées sous une forme discoïdale, elles permettent le transport inverse du cholestérol, c'est à dire des tissus périphériques vers le foie. Les HDL ont été divisées en deux classes, les HDL<sub>2</sub> et les HDL<sub>3</sub>. Le tableau I résume les caractéristiques physiques de chacune de ces classes de lipoprotéines.

Tableau I. Caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines.

Classe	Densité (g/ml)	Diamètre (A)	Migrat. électro- phorétique	Composition (% de poids)				
				protéine	triglycér	cholestérol		phospho
						libre	esters	
chylomi- crons	< 0.950	300 - 5000	origine	1-2	85-95	1-3	2-4	3-6
VLDL	0.950 - 1.006	280 - 1000	prébêta (alpha <sub>2</sub> )	6-10	50-65	4-8	16-22	15-20
IDL	1.006 - 1.019	250 - 300	alpha <sub>2</sub> -bêta	17	20	9	34	20
LDL	1.019 -1.063	200 -250	bêta	18-22	4-8	6-8	45-50	18-24
HDL <sub>2</sub>	1.063 - 1.12	90 - 120	alpha <sub>1</sub>	45-55	2-7	3-5	15-20	26-32
HDL <sub>3</sub>	1.12 - 1.21	80 - 100	alpha <sub>1</sub>	56	3	3	15	23

Données tirées de (Fruchart, 1989; Schaefer EJ, 1991).

### 1.2-Métabolisme des triglycérides d'origine alimentaire

La consommation journalière moyenne de lipides d'un adulte nord-américain est en majorité d'origine animale et inclut 100 à 150 g de TG, 5 à 10 g de phospholipides et environ 1 g de cholestérol (The Lipid Research Clinics, 1982; Rizek RL, 1983). L'absorption intestinale des graisses chez les mammifères requiert l'affluence de molécules hydrosolubles capables d'émulsifier les graisses et de traverser la muqueuse absorbante intestinale. Ainsi, l'assimilation des graisses alimentaires est dépendante de l'efficacité de l'émulsion des TG par la bile et de l'efficacité des enzymes digestives.

Les graisses alimentaires sont en premier lieu hydrolysées dans la lumière gastrointestinale, ainsi le cholestérol estérifié et les TG sont hydrolysés en cholestérol libre, en monoglycérides et en acides gras. Ces composés sont, par la suite, émulsifiés grâce aux sels biliaires et c'est sous cette forme de micelles hydrosolubles qu'ils se présentent à la surface des microvillosités des

entérocytes pour y être absorbés (Kuksis A, 1986). Dans l'entérocyte, les TG et le cholestérol estérifié sont resynthétisés et couplés aux apolipoprotéines (apo), principalement les apo A1, apo AII, apo AIV et apo B48, ainsi qu'aux autres composés lipidiques retrouvés dans les lipoprotéines naissantes intestinales (Green PHR, 1981). Les chylomicrons sont assemblés dans l'appareil de Golgi puis sécrétés des entérocytes par la membrane plasmique basolatérale dans l'espace extracellulaire et la lymphe intestinale. D'autres apolipoprotéines dont l'apo E, l'apo CII et l'apo CIII, sont par la suite acquises dans la circulation sanguine lors d'échanges avec les HDL (Green PHR, 1981). L'apo E est importante pour la reconnaissance et l'assimilation des résidus de chylomicrons par les récepteurs hépatiques. Les hépatocytes possèdent des récepteurs spécifiques capables de reconnaître et de lier certains domaines de l'apo E (Sherrill BC, 1980). Quant aux apo C, l'apo CII est essentielle à l'activité catalytique de la lipoprotéine lipase (LPL) tandis que l'apo CIII est un inhibiteur pour cette activité (Wang CS, 1985 ; Auwerx J, 1992).

Des changements rapides surviennent dans les chylomicrons lorsqu'ils entrent dans les capillaires périphériques. Ainsi, les chylomicrons sont exposés à l'action lipolytique de la LPL qui est attachée à la surface luminale de l'endothélium vasculaire (Braun JEA, 1992). La LPL hydrolyse les TG des chylomicrons, libérant des acides gras libres, des mono et des diglycérides. Lors de cette lipolyse orchestrée par la LPL, les chylomicrons perdent la plupart de leurs TG et sont transformés en résidus de chylomicrons qui sont éliminés de la circulation sanguine par les récepteurs hépatiques (Redgrave TG, 1970; Green PHR, 1981). Les acides gras libres ainsi produits se lient à l'albumine et sont captés par les tissus périphériques dont principalement les tissus adipeux et les muscles, et peuvent également être retournés au foie pour la synthèse d'autres lipoprotéines (Redgrave TG, 1979).

Ces résidus de chylomicrons acquièrent, par transfert à partir des HDL, grâce à l'action de la protéine de transfert du cholestérol (CETP: cholesterol ester transfert protein), des esters de cholestérol qui sont échangés pour des TG. Ce processus, qui permet l'enrichissement des résidus de chylomicrons en esters de cholestérol est donc dépendant de l'interaction entre ces deux particules ainsi que du temps d'exposition entre ces deux particules (Zilversmit DB, 1984). Ainsi, l'élimination rapide des chylomicrons, grâce à la lipolyse efficace de la LPL, a

pour effet de réduire ce transfert d'esters de cholestérol vers les chylomicrons, d'augmenter le transport inverse du cholestérol vers le foie et ainsi de réduire la formation de lipoprotéines athérogéniques (Fruchart, 1989). En plus des altérations qui surviennent au noyau hydrophobique des chylomicrons durant la lipolyse, la quantité relative des apolipoprotéines est altérée. La majorité des apo AI et AII sont transférées aux HDL, tandis que l'apo AIV semble être relâchée dans le plasma (Schaefer EJ, 1978; Tall AR, 1979).

### 1.3-Les lipases

La super famille des lipases regroupe différentes lipases ayant un gène ancestral commun, d'où l'homologie entre ces différentes lipases tant au niveau du gène que de la protéine. Font partie de cette famille la lipase pancréatique (LP), la lipase hépatique (LH) et la lipoprotéine lipase (LPL) (Murthy V, 1996). La lipase hormono-sensible (LHS) et la lipase linguale en sont exclues. Ces lipases possèdent toutes une activité lipolytique pouvant hydrolyser les TG, elles sont capables d'hydrolyser des émulsions lipidiques, et elles ont une activité catalytique "interfaciale eau-lipides". Ce sont des protéines glycosylées qui hydrolysent préférentiellement les liaisons sn-1 et sn-3 des TG, générant des monoglycérides sn-2 et des acides gras libres (Dolphin PJ, 1992). La LH et la LPL possèdent également une activité phospholipasique (Deckelbaum RJ, 1992).

La lipase hormono-sensible (LHS) se retrouve surtout dans les tissus adipeux (Khoo JC, 1975; Fredrickson G, 1981). Contrairement aux autres lipases, l'action lipolytique de la LHS n'implique pas des TG d'origine alimentaire mais plutôt des TG intracellulaires mis en réserve dans les cellules adipeuses. Elle hydrolyse aussi des esters de cholestérol et des TG afin de permettre l'utilisation de ces composés comme source d'énergie.

La LP est synthétisée et sécrétée par les cellules acineuses du pancréas qui synthétisent également le précurseur de l'activateur protéique de la LP, la colipase (Verger R, 1984). Le canal pancréatique transporte la LP ainsi que la procolipase et d'autres hydrolases pancréatiques jusque dans le duodénum où la LP complète l'hydrolyse des TG alimentaires commencée antérieurement par la

lipase linguale (Verger R, 1984). La colipase, qui aide la LP à s'attacher aux interfaces eau-lipides, n'affecte pas son activité catalytique (Van Tilbeurgh H, 1994). Comme la LH, la LP est active sous la forme monomérique, mais différemment de la LPL et de la LH, elle n'est pas attachée à des surfaces membranaires mais agit comme molécules libres dans la lumière intestinale.

La LH est synthétisée par le foie où elle est localisée à la surface des sinusoides hépatiques, et attachée par des liens glycosaminoglycans (Olivecrona T, 1993). La LH est une protéine glycosylée active sous la forme monomérique. La glycosylation n'est pas une étape essentielle pour l'activité catalytique de la LH (Stahnke G, 1991). La LH n'a pas de cofacteur mais peut être stimulée par la présence d'apo E (Thuren T, 1992). La LH agit sur les TG des résidus de chylomicrons et des IDL afin de réduire leur taille, ainsi que sur les TG et les phospholipides des HDL. L'hydrolyse des TG des IDL produit des LDL tandis que l'action de la HL sur les HDL<sub>2</sub> produit des HDL de plus haute densité, les HDL<sub>3</sub>, mécanisme impliqué dans le transport inverse du cholestérol vers le foie (Thuren T, 1992).

La LPL est synthétisée par les cellules parenchymateuses, telles les adipocytes, les cellules musculaires, les macrophages (Borensztajn J, 1987), et est ensuite transportée à son site fonctionnel, la surface luminale des cellules endothéliales où elle s'attache par des liaisons avec des protéoglycans (Braun JEA, 1992). Elle n'est exprimée que transitoirement dans le foie de rat embryogénique, mais pas dans le foie adulte (Vilaro S, 1988). Elle est active sous la forme d'un homodimère glycosylé dont les dimères sont liés par des liens non-covalents. Elle peut réversiblement se dissocier en monomères, sa forme inactive, dans certaines conditions physiologiques de pH, de température, ou de force ionique (Olivecrona T, 1987). Elle requiert la présence d'apo CII, cofacteur essentiel à son activité catalytique (Olivecrona T, 1983). Contrairement à la LH, la glycosylation affecte la sécrétion et l'activité de la LPL (Stahnke G, 1991). La LPL est la principale enzyme responsable de l'hydrolyse des TG transportés par les chylomicrons et les VLDL.

Un résumé du métabolisme des TG plasmatiques exogènes et endogènes et de l'action des différentes lipases est illustré à la figure 1. Brièvement, les TG absorbés par l'intestin subissent l'action de la lipase pancréatique et sont



sécrétés sous la forme de chylomicrons (métabolisme des TG exogènes). Ces chylomicrons sont hydrolysés par la LPL, se transforment en résidus de chylomicrons et sont captés par le foie où ils sont métabolisés. Le foie sécrète les VLDL dont les TG sont eux aussi hydrolysés par la LPL et se transforment en résidus de VLDL (métabolisme des TG endogènes). Ces résidus sont par la suite, hydrolysés en IDL et en LDL par la LH. La CETP permet le transfert d'ester de cholestérol des HDL vers les résidus de VLDL ou les LDL qui sont soit captés par des récepteurs hépatiques (récepteurs LDL) et ainsi éliminés de la circulation ou soit dirigés vers les tissus adipeux. Les HDL se dirigent finalement vers le foie (transport inverse du cholestérol) où le cholestérol peut être éliminé de la circulation. Lors d'une déficience, même partielle, en LPL, les niveaux de HDL cholestérol sont plus bas à cause de la diminution de l'hydrolyse des TG par la LPL et par conséquent de l'augmentation des TG plasmatiques.

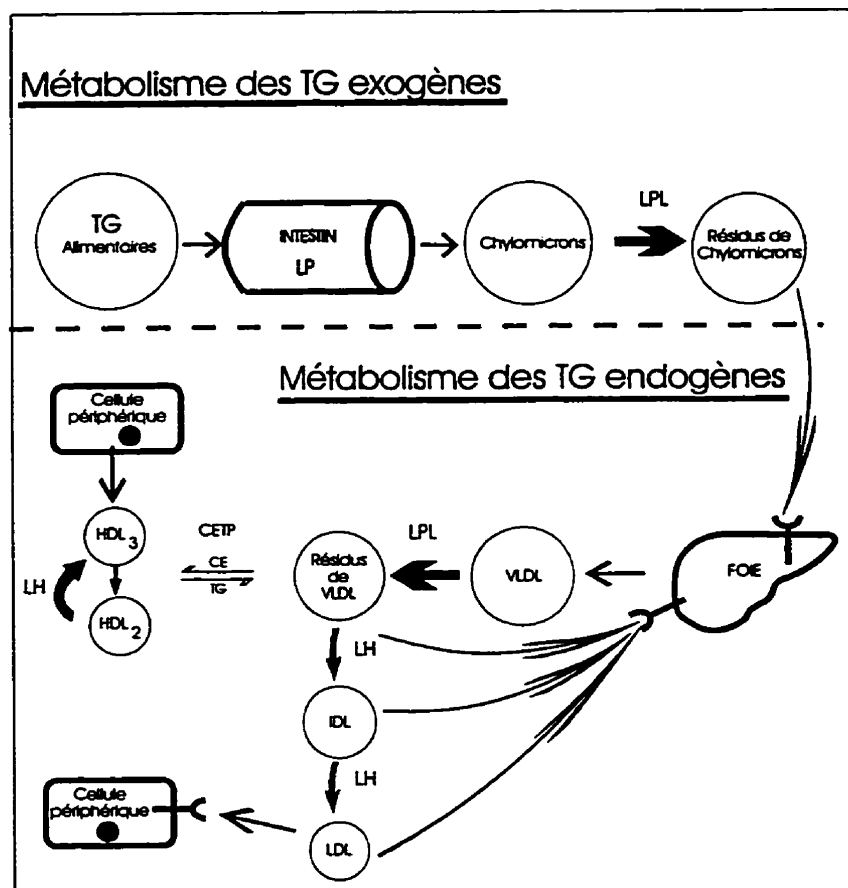


Figure 1: Métabolisme des TG exogènes et endogènes. TG, triglycérides; LP, lipase pancréatique; LPL, lipoprotéine lipase; LH, lipase hépatique; CETP, cholesterol ester transfer protein; CE, cholestérol estérifié; VLDL, very low

density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; IDL, intermediate density lipoprotein; HDL<sub>2</sub> ou 3, high density lipoprotein. figure inspirée de (Demacker PNM, 1995).

Par comparaison avec la LH, il a été suggéré que l'effet inhibiteur de l'apo E sur l'activité de la LPL, pourrait contribuer à diriger l'action de ces deux lipases plasmatiques vers des lipoprotéines spécifiques (Thuren T, 1992). Ainsi, les substrats préférés de la LPL sont les lipoprotéines riches en apo CII, les chylomicrons et les VLDL, tandis que ceux de la LH sont les TG des lipoprotéines riches en apo E, c'est-à-dire les résidus de chylomicrons, les IDL et les HDL<sub>2</sub>.

Depuis quelques années, l'importance de la LPL comme protéine multifonctionnelle impliquée dans différents aspects du métabolisme des lipides et des lipoprotéines est devenue évidente. Outre son rôle principal d'hydrolyser les TG plasmatiques en circulation, de récentes études accordent un rôle de ligand à la LPL pour la liaison des lipoprotéines aux récepteurs cellulaires et, conséquemment pour l'élimination des résidus de lipoprotéines riches en TG par le foie (Vilella E, 1991; Dugi KA, 1992; Eisenberg S, 1992; Kobayashi J, 1992; Dugi KA, 1993). Étant donné l'importance de la LPL dans le métabolisme des TG et la maturation de toutes les autres lipoprotéines plasmatiques, des défauts dans le fonctionnement normal de la LPL peuvent résulter dans le développement de certaines dyslipidémies et/ou dans la progression de l'athérosclérose.

## 1.4-La lipoprotéine lipase

### 1.4.1-Historique de la LPL

Dès 1943, Hahn (Hahn PF, 1943) remarque la présence d'un "facteur d'élimination des lipides" dans le plasma. Puis en 1952, Anfinsen et al (Anfinsen C, 1952) proposent que le phénomène observé d'élimination de la turbidité du plasma par ce facteur était en fait, le résultat de l'action d'une enzyme lipolytique. Cette enzyme est aujourd'hui appelée la lipoprotéine lipase ou LPL. La déficience ou la dysfonction de LPL a, par la suite, été associée avec la pathogénèse de l'hypertriglycéridémie et de la chylomicronémie (Havel R, 1960; Eckel RH, 1989).

### 1.4.2-Structure et fonction de la LPL

Le gène de la LPL se situe sur le chromosome 8p22, a une longueur de 30 kb, et contient 10 exons et 9 introns (Wang CS, 1992). Chez l'humain, il existe deux isoformes de l'ARNm de la LPL (3,35 kb et 3,75 kb) probablement dus à l'existence de deux sites de polyadénylation (Bergeron J, 1991). Ces ARNm codent pour une protéine monomérique de 448 acides aminés (AA).

Le gène de la LPL est organisé en deux grands domaines structuraux distincts. Le domaine N-amino terminal (résidus 1-312) et le domaine C-carboxy terminal (résidus 313-448). Le domaine N est la région où se retrouve plusieurs activités importantes de la LPL telle que la catalyse, tandis que le domaine C serait impliqué dans des fonctions comme l'interaction initiale avec les lipoprotéines et la prise de ces lipoprotéines par la LPL via des récepteurs de surface cellulaire (Murthy V, 1996). Le tableau II présente les principaux sites fonctionnels du gène de la LPL ainsi que les AA impliqués et leur domaine respectif. À l'exception de la triade catalytique, la plupart des résidus constituant les sites structuraux de la LPL sont hydrophobiques et leurs chaînes principales ne sont pas accessibles pour des liaisons hydrogènes. Ceci a pour effet de diminuer l'affinité du site catalytique pour les groupements phosphorylés des phospholipides, expliquant la très faible activité phospholipase de la LPL comparativement à son activité TG-lipase (Van Tilbeurgh H, 1994).

**TABLEAU II. Structure et fonction du gène de la LPL humaine, tiré de (Murthy V, 1996)**

<b>sites fonctionnels</b>	<b>domaine</b>	<b>AA impliqués</b>
triade catalytique	N-terminal	Ser <sup>132</sup> , Asp <sup>156</sup> , His <sup>241</sup>
oxyanion hole	N-terminal	Trp <sup>55</sup> , Leu <sup>133</sup>
site de liaison aux lipides	N-terminal	Glu <sup>91</sup> à Pro <sup>95</sup> Pro <sup>157</sup> à Pro <sup>160</sup> Arg <sup>187</sup> à Ile <sup>196</sup> Val <sup>126</sup> à Gly <sup>134</sup> Ser <sup>244</sup> à Leu <sup>253</sup>
lid	N-terminal	Cys <sup>216</sup> à Cys <sup>239</sup>
boucle β	N-terminal	Gly <sup>54</sup> à Trp <sup>64</sup>
site de liaison à l'apo CII	N-terminal	Lys <sup>147</sup> à Lys <sup>148</sup>
site de liaison à l'héparine	N-terminal	Arg <sup>263</sup> , Arg <sup>279</sup> -Lys <sup>280</sup> , His <sup>241</sup> Arg <sup>294</sup> , Lys <sup>296</sup> -Arg <sup>297</sup> , Lys <sup>300</sup> Lys <sup>147</sup> -Lys <sup>148</sup> , Arg <sup>151</sup>
	C-terminal	Lys <sup>319</sup> , Lys <sup>403</sup> , Arg <sup>405</sup> , Lys <sup>407</sup> Lys <sup>413</sup> , Lys <sup>414</sup>
site de glycosylation	N-terminal	Asn <sup>43</sup> -His <sup>44</sup> -Ser <sup>45</sup>
	C-terminal	Asn <sup>359</sup> -Lys <sup>360</sup> -Thr <sup>361</sup>
interaction avec lipoprotéines	C-terminal	56 AA dans C-terminal
site de dimérisation		

La triade catalytique de la LPL est constituée de trois acides aminés Ser<sup>132</sup>, Asp<sup>156</sup> et His<sup>241</sup>, qui sont les mêmes pour les trois lipases humaines (LPL, LH et LP) de même que pour toutes les espèces animales étudiées (Hide WA, 1992). L'"oxyanion hole" est probablement formé par la principale chaîne azotée des résidus Trp<sup>55</sup> et Leu<sup>133</sup> qui est voisine de la Ser<sup>132</sup> de la triade catalytique (Van Tilbeurgh H, 1994). Le site de liaison aux lipides constitue un sillon très hydrophobique, qui lie probablement la chaîne aliphatique de l'intermédiaire acyl-enzyme. Les acides aminés Tyr<sup>94</sup>, Pro<sup>157</sup>, Ala<sup>158</sup> et Ile<sup>194</sup> ont probablement aussi des interactions hydrophobiques avec les substrats lipidiques (Murthy V, 1996).

Le "lid" représente une boucle à surface mobile dans la structure tridimensionnelle de la LPL, qui recouvre le site catalytique puis qui est réarrangé afin de permettre aux substrats l'accès au domaine catalytique. La région du "lid" se situe entre deux cystéines conservées (Cys<sup>216</sup> à Cys<sup>239</sup>) qui forment un des quatre ponts disulfures de la molécule de LPL et pourraient ainsi avoir pour effet de stabiliser le "lid" de la protéine durant son action (Dugi KA, 1992). En plus de son rôle dans l'hydrolyse des TG et des phospholipides, cette structure pourrait être essentielle dans la détermination des substrats pour la lipase (Van Tilbeurgh H, 1994).

La boucle  $\beta$ -5 est une des boucles mobiles de la structure protéique de la LPL, qui occupe la région His<sup>53</sup> à Trp<sup>64</sup>. Il est probable que lors de l'ouverture du "lid" de la LPL, la boucle  $\beta$ -5 se rabattrait sur le coeur de la protéine rendant ainsi le site actif encore plus accessible et amenant l'"oxyanion hole" en une position catalytiquement active (Van Tilbeurgh H, 1994).

Le site Lys<sup>147</sup>-Lys<sup>148</sup> est responsable de la liaison de l'apo CII, l'activateur protéique de la LPL. Le tetrapeptide de l'apo CII (Lys-Gly-Glu-Glu) situé dans le domaine C-terminal est impliqué dans l'interaction entre l'apo CII et la LPL (Murthy V, 1996).

Deux sites de glycosylation ont été identifiés chez la LPL humaine. En l'absence de glycosylation du domaine N-terminal (Asn<sup>43</sup> à Ser<sup>45</sup>) la LPL est complètement inactive et l'enzyme n'est pas sécrétée (Ben Zeev O, 1992), tandis que la glycosylation du domaine C-terminal (Asn<sup>356</sup> à Thr<sup>361</sup>) ne semble pas affecter ni l'activité ni la sécrétion de l'enzyme (Ben Zeev O, 1994).

Les sites de liaison à l'héparine, situés dans les domaines C- et N-terminal, sont essentiels pour l'interaction de la LPL avec les glycosaminoglycans des parois cellulaires et pour la localisation de la LPL dans la paroi endothéliale des vaisseaux (Murthy V, 1996).

L'interaction initiale des lipoprotéines avec la LPL, qui est un prérequis pour leur hydrolyse subséquente, est probablement contrôlée par le domaine C-terminal de la LPL, plus particulièrement la région contenant les 56 derniers acides aminés (Lookene A, 1993). L'interaction de la LPL avec les lipoprotéines

provoquerait un changement conformationnel de l'enzyme, amenant l'ouverture du "lid" qui normalement masque la triade catalytique. Cette ouverture qui expose les résidus hydrophobiques du "lid" est appelée l'activation interfaciale (Tashiro J, 1992) et forme une clé entourée des chaînes d'acides aminés hydrophobiques de la structure de la LPL ou une hélice amphiphilique du "lid" (Dugi KA, 1992). Les chaînes d'acides gras des TG se lieraient à cette clé hydrophobique à l'aide de la partie glycérol du "oxyanion hole". L'hydrolyse des TG est alors possible par la triade catalytique.

La forme active de la LPL étant homodimérique (Osborne JCJ, 1985), deux formes possibles de liaison des monomères, soit tête-à-tête ou tête-à-queue, ont été envisagées, et c'est l'analyse structurale de la LPL ainsi que de la LP qui a permis de suggérer une liaison dimérique en position tête-à-queue (Van Tilbeurgh H, 1994), où le domaine N-terminal de chaque monomère est en contact avec le domaine C-terminal de l'autre monomère, de manière à ce que les deux "lids" soient libres de s'ouvrir pour l'activation interfaciale.

En plus de son action sur les TG, la LPL a aussi un rôle comme intermédiaire dans la prise et la dégradation des lipoprotéines par les cellules. Bien que la LPL elle-même se lie aux surfaces cellulaires par l'intermédiaire de son site de liaison à l'héparine avec les protéoglycans membranaires, il semble que la LPL jouerait un rôle de ligand pour les récepteurs cellulaires, tels le récepteur LDL ou le LRP (LDL receptor-related protein) (Williams KJ, 1992; Chappell DA, 1993; Mulder M, 1993; Nykjaer A, 1993).

#### 1.4.3-Régulation de la LPL

Bien que le site d'action de la LPL se situe à la surface luminale des vaisseaux sanguins où elle s'attache à l'endothélium et interagit avec les lipoprotéines, les cellules vasculaires endothéliales ne synthétisent pas de LPL. Des études d'hybridation *in situ* ont démontré que l'ARNm de la LPL se situait dans des cellules telles que les adipocytes, les myocytes et les macrophages, indiquant que la LPL retrouvée au niveau de l'endothélium originait de cellules parenchymateuses (Camps L, 1990).

Bien qu'un seul gène code pour la LPL, l'expression de cette dernière varie dans certains tissus, suggérant que la transcription du gène de la LPL est régulée de façon spécifique par des éléments *cis-acting* (Kirchgessner TG, 1989).

La synthèse de LPL se fait dans le réticulum endoplasmique rugueux. La glycosylation de la LPL se situe également dans le réticulum endoplasmique rugueux puis dans l'appareil de Golgi et est un mécanisme complexe qui a été décrit en détails par Braun et Severson (Braun JEA, 1992). La glycosylation du domaine N de la LPL est requise pour son activité catalytique. Il a d'ailleurs été rapporté que la sécrétion de LPL était dépendante de la synthèse nouvelle de l'enzyme et qu'un traitement de 24 heures avec de la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, inhibait presque entièrement l'activité de l'enzyme dans les cellules et le milieu de culture (Stray N, 1990), démontrant l'importance de la glycosylation de l'enzyme. L'incubation de cellules avec de la tunicamycine provoque la synthèse de la LPL sous une plus petite forme, due à l'absence des oligosaccharides liés au domaine N, qui ont été retenus dans le réticulum endoplasmique. La LPL est catalytiquement active sous une forme homodimérique, la plupart des protéines sont oligomérisées dans le réticulum endoplasmique, par conséquent le réarrangement des glucoses par les glucosidases pourrait induire la dimérisation et l'activation de la LPL (Braun JEA, 1992).

Les glycoprotéines produites par le Golgi sont relâchées dans le *trans*-Golgi où elles sont soit dégradées par des lysosomes (site intracellulaire pour la dégradation de la LPL), soit incorporées dans des vésicules sécrétrices (Braun JEA, 1992). La LPL sécrétée est ensuite translocalisée et liée à la surface luminale des cellules vasculaires endothéliales par des liens avec des protéoglycans (Braun JEA, 1992). Les cellules vasculaires de l'endothélium ne dégradent pas la LPL, par conséquent la quantité de LPL fonctionnelle liée à l'endothélium est déterminée par le balancement entre la translocation de l'enzyme de son site de synthèse vers l'endothélium et le relâchement de LPL endothéliale dans la circulation (Chajek T, 1978). Une régulation précise de l'activité fonctionnelle de la LPL liée à l'endothélium est importante afin de contrôler adéquatement le catabolisme des TG ainsi que l'apport d'acides gras aux cellules des tissus. Les acides gras libres, produits de réaction de la LPL, déplacent la LPL fonctionnelle des sites de liaison à l'endothélium et permettent

ainsi de prévenir l'apport excessif d'acides gras aux cellules parenchymateuses des tissus lors de conditions de lipolyse excessive. Une forte corrélation entre les concentrations d'acides gras libres plasmatiques et l'activité de la LPL dans le plasma chez des humains a été rapportée (Peterson J, 1990).

Lors d'un état à jeun, il a été observé que l'activité de la LPL était augmentée dans le tissu cardiaque alors que dans le tissu adipeux elle était abaissée, démontrant que la LPL est une enzyme régulée et spécifique à chaque tissu (Braun JEA, 1992). La régulation de l'activité de la LPL dans les tissus adipeux et cardiaque en réponse à un état à jeun est complexe et il a été rapporté que la LPL présente dans le tissu cardiaque est régulée par des mécanismes post-transcriptionnels qui sont différents des mécanismes survenant dans le tissu adipeux (Doolittle MH, 1990).

Récemment, il a été rapporté que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF: Platelet-Derived Growth Factor) stimulait la transcription du gène de la LPL dans des macrophages dérivés de monocytes humains par l'activation de la protéine kinase C et ainsi augmentait la synthèse de LPL (Inaba T, 1995). Les effets de plusieurs cytokines ont été étudiés sur la production de LPL par des cultures de macrophages (Querfeld U, 1990). La LPL jouerait un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG par les macrophages (Lindqvist P, 1983). Il a été démontré que les VLDL seraient responsables de l'accumulation des TG dans les macrophages (Bates SR, 1984). Ainsi, cette accumulation de TG par les VLDL est absente dans les macrophages provenant de patients déficients en LPL (Skarlatos SI, 1993), confirmant le rôle essentiel de la LPL dans l'accumulation des lipoprotéines riches en TG par les macrophages.

### 1.5-Mutations dans les séquences codantes du gène de la LPL.

Les mutations dans les régions codantes du gène de la LPL sont nombreuses (Murthy V, 1996). Différents types de mutations ont été observés, soit des mutations de type faux sens (substitution d'AA) et de type non-sens (substitution d'un codon AA pour un codon stop), des délétions de 1 pb à 6 kb et des insertions de 1 pb à 2 kb, ainsi que des mutations silencieuses (codons



altérés sans changement d'AA). La plus grande fréquence de mutations se retrouve dans les exons 5 et 6, qui sont les exons codant pour les fonctions importantes de la LPL, dont l'activité catalytique. Selon leur position sur le gène ainsi que leur capacité à modifier la structure tridimensionnelle de la LPL, toutes ces mutations du gène de la LPL influencent à divers degrés la fonction catalytique de l'enzyme, sa sécrétion et son site de liaison à l'héparine. Jusqu'à aujourd'hui, il y a 71 mutations connues dans les séquences codantes du gène de la LPL (Murthy V, 1996).

Au Québec, les mutations G188E (Monsalve MV, 1990) et P207L (Ma Y, 1991) sont les plus prévalentes. Elles se situent dans l'exon 5 et sont de type faux sens. Les mutations D250N (Ma Y, 1992) et N291S (Reymer PWA, 1995) sont également de type faux sens, mais se situent dans l'exon 6. La mutation D250N est moins prévalente dans la population canadienne française que les deux autres, tandis que la prévalence de la mutation N291S n'est pas encore connue. Contrairement aux mutations G188E, P207L et D250N, la mutation N291S n'affecte que partiellement l'activité de la LPL (tableau III). Selon une récente étude, l'AA à la position 291 du gène de la LPL serait impliqué dans la formation du dimère et la réduction de l'activité de la LPL observée serait, par conséquent, due à l'instabilité de la forme dimérique de la LPL (Busca R, 1995). En se basant sur l'activité de la LPL chez les hétérozygotes, on pourrait émettre l'hypothèse que les homozygotes pour cette même mutation auraient une activité résiduelle de la LPL et probablement pas de chylomicronémie.

Tableau III. Mutations du gène de la LPL retrouvées dans la population canadienne française consultant à la clinique de Québec.

Mutation (exon)	Activité de la LPL (%)		Prévalence (%)
	homozygotes	hétérozygotes	
207 (5)	0	50	72
188 (5)	0	50	13
250 (6)	0	50	3
291 (6)	> 0	> 50	n.d.

n.d., non déterminée.

## 1.6-La déficience familiale en LPL

### 1.6.1-Historique

La présence de plasma lipémique, à jeun, a été observée pour la première fois en 1799 (Thannhauser SJ, 1985). Des xanthomes éruptifs furent, par la suite, décrits par Addison et Gull (Addison T, 1851) et appelés xanthomata diabeticorum, à cause de leur présence chez des patients diabétiques, présentant un plasma lipémique (Jensen J, 1967). En 1921, des patients non-diabétiques avec des xanthomes éruptifs furent également décrits (Siemans HW, 1921). Mais ce n'est qu'en 1932, que Bürger et Grütz décrivirent le premier patient avec une forme familiale de chylomicronémie (Bürger M, 1932). Ce patient était un jeune garçon de 11 ans présentant des xanthomes éruptifs étendus, une hépatosplénomégalie ainsi qu'un plasma lipémique. La lipémie ainsi que tous les symptômes disparurent après une diète faible en gras. La nature familiale de ce désordre métabolique fut suggérée car les parents étaient cousins germains. Ce désordre fut nommé tout d'abord lipémie familiale idiopathique, puis hyperlipémie essentielle, et lipémie induite par les graisses et enfin hyperlipoprotéïnémie de type 1 par Fredrickson (Fredrickson DS, 1966). En 1960, la déficience en LPL a été décrite comme une cause de chylomicronémie familiale chez des enfants porteurs de ce syndrome (Havel R, 1960), et en 1978, Breckenridge et al (Breckenridge WC, 1978) ont rapporté le cas d'un patient avec une déficience en apo CII, l'activateur de la LPL, décrivant ainsi une autre cause possible de chylomicronémie familiale. Dans la population canadienne-française du Québec, la chylomicronémie familiale a été décrite comme un désordre génétique résultant d'une déficience en activité de la LPL mais pas d'une déficience en apo CII, l'activateur essentiel de la LPL (Murthy V, 1996). Dus à leurs fréquences élevées les premiers cas documentés à la clinique des lipides de Québec remontent en 1977 (Gagné C, 1977).

### 1.6.2-L'état homozygoté pour la déficience en LPL

La déficience familiale en LPL est une maladie rare, autosomique et récessive, estimée à une fréquence mondiale d'environ 1 cas par million d'habitants. La maladie se manifeste habituellement pendant l'enfance par des douleurs abdominales (coliques) ainsi que par les signes et symptômes habituels du syndrome de chylomicronémie. La manifestation clinique la plus commune est la présence de douleurs abdominales épisodiques qui surviennent à tous âges. L'hépatomégalie et la splénomégalie sont souvent présentes chez des patients avec des taux de TG supérieurs à 40 mM. Les xanthomes éruptifs apparaissent dans la déficience en LPL, mais on les retrouve chez des patients avec des taux de TG supérieurs à 70 mM (Gagné C, 1989). Les patients chylomicronémiques atteints de déficience en LPL ne semblent pas prédisposés à l'athérosclérose. Cette maladie a été décrite tant chez la population blanche que noire ou asiatique, et elle affecte les deux sexes de manière équivalente (Brunzell JD, 1989).

La morbidité reliée à la chylomicronémie des sujets homozygotes est liée principalement aux pancréatites (Nikkila EA, 1983). Le mécanisme par lequel la chylomicronémie provoque une pancréatite n'est toujours pas connu. L'inflammation du pancréas pourrait être le résultat d'une irritation par les acides gras et les lysolécithines relâchés en grandes quantités par la LP lors de l'hydrolyse des chylomicrons en circulation dans les capillaires sanguins (Chait A, 1992). Cette éventualité est appuyée par la présence de concentrations anormalement élevées de lysophosphatidylcholine plasmatique chez les patients chylomicronémiques (Cantin B, 1995). Des complications cardiovasculaires sont rarement observées. Les faibles taux de cholestérol dans la fraction LDL et la présence de chylomicrons, qui ne peuvent traverser la barrière endothéliale, pourraient expliquer l'absence de complications athérosclérotiques chez ces patients (Gagné C, 1989). Toutefois, un récent article a rapporté une athérosclérose précoce chez quatre patients atteints d'hyperchylomicronémie familiale, suggérant que ce défaut génétique pouvait augmenter la susceptibilité à l'athérosclérose chez l'homme (Benlian P, 1996).

Chez les homozygotes dont l'activité de la LPL est absente suite à une mutation du gène de la LPL telle que pour les mutations P207L, G188E et D250N, le catabolisme normal des chylomicrons et des VLDL est supprimé, induisant ainsi, à jeun, une hypertriglycéridémie massive caractérisée par la présence de

chylomicrons (Brunzell JD, 1995). Un aperçu des profils lipidiques de patients homozygotes déficients en LPL est présenté au tableau IV (Cantin B, 1995). Ces patients sont hyperlipidémiques comme le démontrent les concentrations élevées en TG plasmatiques. La séparation par ultracentrifugation des fractions lipoprotéiques démontre que la majorité du cholestérol et des TG plasmatiques chez ces patients se retrouve dans les chylomicrons. Les HDL des déficients sont riches en TG, alors que des particules HDL sont normalement riches en cholestérol et pauvres en TG.

Tableau IV. Profils lipidiques du plasma dans la déficience primaire en LPL chez des patients dont l'activité de la LPL est absente (Cantin B, 1995).

	contrôles	déficients LPL	P
N	21	26	
AGE (ans)	28 ± 8	29 ± 14	NS
<b>PLASMA</b>			
cholestérol total	4,79 ± 0,91	7,05 ± 5,63	NS
cholestérol libre	1,23 ± 0,25	2,68 ± 1,85	0,0074
TG	1,25 ± 1,31	24,77 ± 16,79	0,0001
phospholipides	2,36 ± 0,28	3,86 ± 2,76	0,0371
<b>CHYLOMICRONS</b>			
cholestérol	-	5,00 ± 3,94	-
TG	-	20,82 ± 12,15	-
<b>VLDL</b>			
cholestérol	0,56 ± 0,78	1,42 ± 2,72	NS
TG	0,80 ± 0,77	3,77 ± 6,71	NS
<b>LDL</b>			
cholestérol	3,24 ± 0,69	0,56 ± 0,19	0,0001
TG	0,13 ± 0,15	0,37 ± 0,24	0,0003
<b>HDL</b>			
cholestérol	1,12 ± 0,23	0,34 ± 0,07	0,0001
triglycérides	0,24 ± 0,05	0,34 ± 0,09	0,0001

Les valeurs sont exprimées en mmol/l. (moyenne ± erreur standard)

NS: non significatif ( $p > 0,05$ ).

Dans cette déficience en LPL, la concentration plasmatique des chylomicrons atteint éventuellement une concentration maximale, suggérant l'existence d'un mécanisme autre que la LPL pour l'hydrolyse de ces particules. La possibilité de la présence d'un autre système lipolytique est suggérée par le fait que les chylomicrons finissent par disparaître quel que soit le niveau atteint. Le ou les mécanismes d'hydrolyse des chylomicrons en l'absence d'activité de la LPL ne sont pas élucidés, mais pourraient être le résultat de l'activité catalytique de la LH ou de l'incorporation directe des chylomicrons par le système réticuloendothélial (Murthy V, 1996).

Le traitement de la déficience en LPL, chez l'homozygote, se limite à la restriction en graisses alimentaires, c'est-à-dire à moins de 50 grammes de matières grasses par jour chez l'adulte (Nikkila EA, 1983) comparativement à 100 grammes normalement. Par contre l'utilisation de l'huile MCT (medium chain triglyceride) est recommandée puisqu'elle est composée d'acides gras à chaîne moyenne et courte et que ces acides gras sont libérés dans la veine porte sans être incorporés dans les TG des chylomicrons. La principale raison d'utiliser l'huile MCT est de faciliter la fidélité à la diète pour obtenir des taux de TG plus bas afin d'éviter les pancréatites.

### 1.6.3-L'état hétérozygocité pour la déficience en LPL

Ces hétérozygotes ont été décrits comme ayant une activité plasmatique réduite en LPL après injection intraveineuse d'héparine (Babirak SP, 1989). Avec le développement de méthodes permettant de mesurer la masse immunoréactive de la protéine LPL, il a été possible de démontrer que l'activité et la concentration de la LPL chez ces hétérozygotes étaient, en moyenne, à un niveau intermédiaire entre celui des contrôles normolipidémiques et des sujets homozygotes (Babirak S, 1987), il y a parcontre une forte variation interindividuelle. Les hétérozygotes porteurs des mutations G188E, P205L et D250N voient leur activité de la LPL tronquée d'environ 50% (tableau V), tandis que les hétérozygotes porteurs de la mutation N291S ont une activité résiduelle provenant de l'allèle muté et donc ont une activité plasmatique de la LPL de plus de 50% (Busca R, 1995). La masse et l'activité de la LPL mais pas de la LH sont significativement abaissées chez les hétérozygotes P207L ou G188E (tableau V). L'expression phénotypique de l'état d'hétérozygocité pour la déficience en

LPL, chez les canadiens-français, est généralement caractérisée par une hypertriglycéridémie modérée (2.4 mmol/L), la présence de VLDL riches en TG, de LDL denses et de HDL pauvres en cholestérol (Tableau VI) (Julien P, 1994). De plus, la baisse de la concentration plasmatique en apo AI chez ces patients indique une diminution du nombre de particules de HDL en circulation (Julien P, 1994; Julien P, 1995a).

Tableau V. Masse immunoréactive de LPL et activités lipasiques chez des porteurs d'une mutation (P207L ou G188E) pour la déficience partielle en LPL (Julien P, 1996).

	contrôles	porteurs	P
N	22	32	
AGE (ans)	41 ± 12	44 ± 13	NS
masse LPL (ng/ml)	213 ± 79	164 ± 75	<0,02
activité LPL (nmol/min/ml)	203 ± 63	124 ± 48	<0,0001
activité LH (nmol/min/ml)	249 ± 117	204 ± 78	NS

NS: non significatif ( $p > 0,05$ ).

Il a été démontré que ces hétérozygotes pour la déficience en LPL ont une tolérance diminuée aux TG alimentaires et sont caractérisés par une lipémie postprandiale prolongée (Miesenböck G, 1993). L'hyperlipidémie postprandiale est reconnue comme étant une condition prédisposant à l'athérosclérose (Zilvermit, 1979). Toutefois, une athérogénèse précoce n'a été démontrée que tout récemment, chez quatre porteurs (Benlian P, 1996) et d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette tendance. Parcontre, l'incidence accrue de déficience en LPL chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires est présentement à l'étude dans notre laboratoire. Il a, par ailleurs, été suggéré que la déficience en LPL pourrait représenter un sous-groupe de l'hyperlipidémie familiale combinée (HFC), une dyslipidémie caractérisée par une surproduction d'apo B (Babirak SP, 1989). Cependant, les hétérozygotes canadiens-français examinés ne démontrent pas d'élévation de l'apoB des LDL (Sniderman AD, 1995), suggérant que l'expression phénotypique de l'état hétérozygote est induite par le catabolisme réduit des TG plasmatiques en phase postprandiale à cause de la présence de LPL catalytiquement défectueuse ce qui pourrait provoquer une hypertriglycéridémie modérée, une hypoalphalipoprotéïnémie ainsi que la

présence de particules LDL pauvres en cholestérol sans hyperapo B. Ainsi, la déficience partielle en activité de la LPL chez les hétérozygotes est impliquée dans l'expression phénotypique d'une dyslipoprotéinémie qui serait associée à des dérangements métaboliques potentiellement athérogéniques.

Tableau VI. Profils lipidiques du plasma dans la déficience partielle en LPL (P207L ou G188E) (Julien P, 1996).

	contrôles	porteurs	P
N	57	90	
triglycérides (mmol/L)			
total	1,46 ± 0,11	2,41 ± 0,20	< 0,0001
VLDL	0,97 ± 0,10	1,67 ± 0,15	< 0,0001
LDL	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,02	NS
HDL	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,01	NS
cholestérol (mmol/L)			
total	5,12 ± 0,16	5,09 ± 0,11	NS
VLDL	0,53 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,0003
LDL	3,42 ± 0,15	3,21 ± 0,11	NS
HDL	1,12 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,0007
apo B (g/l)			
total	0,99 ± 0,04	1,06 ± 0,03	NS
VLDL	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,0092
LDL	0,90 ± 0,03	0,92 ± 0,03	NS
apo AI (mg/dl)			
HDL	1,47 ± 0,02	1,41 ± 0,02	0,0452

NS: non significatif (p>0,05).

Une hétérogénéité dans la triglycéridémie a été rapportée chez des porteurs hétérozygotes pour une même mutation du gène de la LPL, suggérant qu'un ou plusieurs facteurs secondaires pourraient aussi jouer un rôle dans l'expression phénotypique de cette dyslipoprotéinémie familiale et induire une hypertriglycéridémie sévère (Wilson DE, 1990; Wilson DE, 1993; Julien P, 1995b; Minnich A, 1995). Cette possibilité est appuyée par l'observation que 12.6% des patients canadiens-français avec une triglycéridémie supérieure à 10 mM sont porteurs d'une mutation du gène de la LPL (Julien P, 1994). Les

données actuelles, que nous rapportons dans ce mémoire, démontrent maintenant qu'au moins 17% des patients lipémiques sont porteurs d'une mutation du gène de la LPL (Chapitre 2 de la présente thèse). Des facteurs secondaires tel que l'âge, l'obésité, l'hyperinsulinémie et certains médicaments (oestrogènes,  $\beta$ -bloquants...) pourraient contribuer à l'expression de l'hypertriglycémie chez ces hétérozygotes (Wilson DE, 1990; Wilson DE, 1993; Julien P, 1995b). Ainsi, l'obésité abdominale chez des hommes, associée à une déficience partielle en LPL, doublerait les niveaux plasmatiques de TG comparativement aux porteurs d'une même mutation sans obésité abdominale, et par plus de sept fois comparativement aux sujets normaux (Julien P, 1995b). De plus, l'hypertriglycémie observée chez certains hétérozygotes pourrait être due à un second défaut du métabolisme des lipoprotéines, hérité indépendamment (Chait A, 1983; Wilson DE, 1983), démontrant ainsi l'importance des interactions gène-gène et gène-environnement dans l'expression phénotypique de cette dyslipoprotéinémie. Une interaction gène-gène, altérant le profil lipidique, a récemment été rapporté entre l'allèle e2 de l'apo E et les mutations G188E et P207L du gène de la LPL. (St-Amand J, 1996).

### 1.7-La LPL chez les macrophages

On a attribué aux macrophages un rôle potentiel dans l'athérogénèse en agissant comme précurseur des cellules spumeuses présentes dans les lésions athéromateuses (Still WJS, 1963; Day AJ, 1966). Les macrophages étant, avec les cellules musculaires lisses, les principales cellules que l'on retrouve dans la plaque athérosclérotique, la possibilité que les macrophages puissent sécréter de la LPL, a suscité un grand intérêt. Ce n'est qu'au début des années 80, avec la suggestion que l'accumulation de lipides dans les lésions athérosclérotiques pourrait être facilitée par la production *in situ* de LPL, qui transformerait les lipoprotéines riches en TG en résidus plus facilement captés par les récepteurs macrophagiques (Zilvermit D, 1979), que l'implication des macrophages dans le processus athérogénique a suscité plus d'intérêt.

Le processus d'athérogénèse est initialement provoqué par l'accumulation de lipides interstitiels. L'accumulation intracellulaire de lipides est médiée par des récepteurs de surfaces cellulaires qui reconnaissent les lipoprotéines



interstitielles modifiées ou oxydées (Goldstein JL, 1979; Fogelman AM, 1980). L'accumulation de ces lipides active l'endothélium, ce qui entraîne la surexpression de plusieurs molécules d'adhésion telles ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), qui sont des molécules responsables de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et largement identifiées dans les lésions athérosclérotiques humaines (Cybulsky MI, 1991; Poston RN, 1992; Printevessa YO, 1992; O'Brien KD, 1993). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que des lipoprotéines natives ou modifiées, peuvent induire l'expression de molécules d'adhésion et l'adhésion des monocytes (Navab M, 1991; Saxena U, 1992; Marui N, 1993; Navab M, 1993). Seuls les monocytes et non les neutrophiles expriment l'antigène-4, le récepteur pour VCAM-1, à leur surface cellulaire, démontrant ainsi la sélectivité du recrutement des monocytes dans l'athérosclérose (Faruqi RM, 1993). De plus, il a été démontré que l'induction de VCAM-1 par le cholestérol précède l'infiltration par les monocytes (Li H, 1993). L'accumulation de lipides extracellulaires semble aussi induire le recrutement de monocytes (Saxena U, 1994), processus sélectif qui survient donc après l'activation de l'endothélium (Saxena U, 1994). Après la migration de ces monocytes dans la paroi artérielle, ils mûrissent en macrophages puis se convertissent en cellules spumeuses qui ont pour rôle d'éliminer, au moyen des récepteurs scavenger, les lipoprotéines extracellulaires athérogéniques en accumulant des esters de cholestérol (Saxena U, 1994).

Bien que la production de LPL par les macrophages ait un impact faible sur l'ensemble du métabolisme des lipoprotéines, l'activité enzymatique de la LPL jouerait un rôle important dans le catabolisme des lipoprotéines riches en TG pour leur captation subséquente par les macrophages (Behr SR, 1986). Deux mécanismes seraient responsables de l'accumulation des lipides dans les macrophages. Le premier consisterait en la production d'acides gras libres par la LPL à la suite de l'hydrolyse des TG lipoprotéiques puis à leur captation par les macrophages pour la synthèse *in situ* de nouvelles molécules de TG. Le second mécanisme impliquerait la captation directe via des récepteurs macrophagiques des résidus de lipoprotéines générés par l'activité catalytique de la LPL. La captation de ces résidus lipoprotéiques riches en TG et en cholestérol, pourrait aussi résulter en l'accumulation de cholestérol dans ces cellules (Lindqvist P, 1983).

Chait et collaborateurs furent les premiers à démontrer que les macrophages, dérivés de monocytes humains, peuvent synthétiser et sécréter la LPL (Chait A, 1982). La LPL a été retrouvée dans la plaque athéromateuse artérielle mais n'était pas présente dans les tissus artériels normaux, suggérant que les macrophages pourraient être la source de cette enzyme, comme le proposait initialement Zilvermit (Zilvermit D, 1979). La synthèse et la sécrétion de la LPL ont également été démontrées, dans des cultures *in vitro* utilisant une lignée macrophagique nommée J774 (Khoo JC, 1981). Une étude récente a démontré que des macrophages de plaques athéromateuses, plus particulièrement les cellules spumeuses dérivées de macrophages, peuvent synthétiser et sécréter de la LPL, corroborant ainsi les résultats *in vitro* (O'Brien KD, 1992). La présence de LPL immunoréactive et d'ARNm de la LPL a aussi été mise en évidence dans des lésions athérosclérotiques humaines (Ylä-Herttuala S, 1991). Les macrophages démontreraient clairement l'expression d'ARNm de la LPL ainsi que la présence de protéine de la LPL, suggérant dès lors que les macrophages pourraient contribuer à la production locale de LPL dans les lésions précoces et tardives d'athérosclérose. Il a été démontré que la synthèse de LPL était associée à la maturation des monocytes en macrophages (Stray N, 1990). Aussi il a été maintes fois démontré que, durant leur maturation, les macrophages sécrètent une variété de produits biologiquement actifs, incluant la LPL et l'apoE (Wang CS, 1985; Auwerx JH, 1988; Ishibashi S, 1989; Ishibashi S, 1990; Rosenfeld ME, 1993).

Il a été rapporté que les macrophages non seulement synthétisent de la LPL mais la sécrètent spontanément dans le milieu de culture, même en absence d'héparine (Khoo JC, 1981). La majorité de la LPL ainsi transcripte (>90%) est relâchée dans le milieu de culture (Chait A, 1982; Stray N, 1985; Inaba T, 1995). Il a aussi été rapporté que les macrophages sécrétant de la LPL n'ont pas besoin d'être activés pour sécréter de la LPL et que cette sécrétion est continue (Mahoney EM, 1981).

### 1.8-L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie caractérisée par un rétrécissement graduel du calibre d'une artère, dû au dépôt de lipides dans la paroi vasculaire, puis à la

prolifération de cellules musculaires lisses, à la production de collagène et parfois à la calcification de l'athérome (Ross R, 1986). Sa pathobiologie est définie comme étant l'expression anormale du processus de cicatrisation vasculaire, tel que décrit en détail par une récente revue de Sanders (Sanders M, 1994). Cette pathogénèse comporte plusieurs phases, dont une dysfonction endothéliale qui serait à l'origine du processus et qui entraînerait une prolifération des cellules musculaires lisses. L'événement initiateur de la dysfonction endothéliale est inconnu, mais pourrait être relié à l'infiltration de l'endothélium par des LDL et/ou à la production de leurs dérivés oxydés. Les LDL infiltrés dans la paroi artérielle ont un effet chémoattracteur sur les monocytes qui migrent alors vers l'espace sous-endothélial où ils mûrissent en macrophages, phagocytent ces LDL tout en se chargeant de lipides et se transforment ainsi en cellules spumeuses (Henrickson T, 1981). La lésion endothéliale est alors signalée aux cellules musculaires lisses du milieu par trois mécanismes: soit l'interaction directe cellule-cellule, la sécrétion de facteurs de croissance, ou la production de cytokines dérivées des monocytes (Sanders M, 1994). A mesure que ces macrophages repoussent l'endothélium et forment des stries lipidiques, ils peuvent causer une rupture de l'endothélium vasculaire exposant ainsi les cellules musculaires lisses à la lumière des vaisseaux sanguins. Ces lésions endothéliales induisent à leur tour l'adhérence des plaquettes aux parois endothéliales, leur agrégation et la libération d'un facteur de croissance plaquettaire qui stimule la prolifération des cellules musculaires lisses. Ce processus peut évoluer vers la formation d'une plaque fibreuse ainsi que d'un thrombus qui constitue souvent le dernier phénomène de la série qui aboutit à l'occlusion de l'artère (Grundy SM, 1990; Sanders M, 1994).

### 1.9-Le Bezafibrate et la LPL

Le Bezafibrate fait partie de la famille des fibrates qui sont des agents hypolipémiants abaissant les taux de TG plasmatiques. Les fibrates ont comme effet de réduire la lipolyse dans les tissus adipeux, de stimuler l'activation de la LPL et d'inhiber la synthèse et/ou la sécrétion hépatique de VLDL, ce qui a pour effet de réduire les concentrations plasmatiques de TG (Nikkilä EA, 1977; Heller F, 1983; Davignon J, 1994). De plus, les fibrates peuvent diminuer la

synthèse *de novo* d'acides gras dans le foie en inhibant l'acétyl CoA carboxylase (Kritchevsky D, 1979).

Plus récemment, on a démontré que les fibrates peuvent également réduire le transfert de cholestérol des HDL vers les VLDL en normalisant ainsi les profils athérogéniques (Guérin M, 1996). L'augmentation des niveaux de HDL observée chez certains patients, pourrait être due à une amélioration du transport inverse du cholestérol vers le foie (Shepherd J, 1993) puisqu'une diminution des VLDL occasionne moins de transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL.

Il semble maintenant probable que les fibrates puissent aussi augmenter l'activité de la LPL en réduisant les niveaux d'expression hépatique de l'apo CIII, l'inhibiteur de l'activité de la LPL (Haubenwallner S, 1995). Ainsi, les fibrates, en haussant l'activité de la LPL, pourraient favoriser l'élimination des lipoprotéines riches en TG.

De plus, les fibrates peuvent modifier la composition des LDL en affectant la structure secondaire de l'apoB, en améliorant l'interaction des LDL avec les récepteurs-LDL, et en permettant ainsi une meilleure élimination des LDL circulantes (Kleinman Y, 1987). Egalement, en activant la LPL, les fibrates augmentent la densité des LDL et diminuent les risques d'athérosclérose (Shepherd J, 1993; Guérin M, 1996).

Par contre, ce médicament est inefficace chez les personnes souffrant d'hyperlipoprotéïnémie de type I, puisque ces sujets ont une absence totale d'activité de la LPL. Mais, les fibrates pourraient être efficaces pour rétablir l'activité de la LPL chez des sujets porteurs d'une mutation dans le gène de la LPL (déficience partielle de l'activité de la LPL). Toutefois, on a observé, chez des patients hypertriglycéridémiques, que les niveaux de LDL-cholestérol ont tendance à augmenter légèrement lors de la prise de fibrates (Davignon J, 1994). Etant donné que les patients porteurs d'une mutation du gène de la LPL ont des LDL denses, cette augmentation non souhaitable des LDL pourrait se produire parallèlement avec la baisse des TG plasmatiques. L'effet *in vivo* des fibrates dans la déficience en LPL n'a pas encore été évaluée.

### 1.10-Problématique et hypothèses

Sachant que l'expression phénotypique de la déficience en LPL peut être très variable et même induire une lipémie ponctuelle, dans un premier volet, nous avons examiné l'incidence d'hétérozygotie pour les mutations G188E ET P207L chez des patients canadiens-français atteints d'une dyslipidémie caractérisée par la présence ponctuelle de lipémie (TG  $\geq$  10 mM). De plus, nous avons examiné l'incidence de la mutation N291S dans cette même cohorte afin de déterminer si une mutation n'affectant que partiellement l'activité de la LPL, telle la mutation N291S, pouvait aussi induire une lipémie aussi sévère que celle notée en présence des mutations G188E et P207L.

Il est maintenant connu que la LPL joue un rôle primordial dans le métabolisme des lipoprotéines riches en TG, par les macrophages (Lindqvist P, 1983). Plusieurs autres études ont examiné le rôle de la LPL dans le processus d'accumulation des TG par les macrophages (Gianturco SH, 1982; Bates SR, 1984; Von Hodenberg E, 1984; Ishibashi S, 1989) et une étude récente a démontré l'absence d'accumulation de TG dans des macrophages humains atteints de déficience complète en LPL (Skarlatos SI, 1993). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'une production réduite de LPL par les macrophages pourrait affecter l'élimination normale des lipoprotéines riches en TG des espaces interstitiels. Sachant que les macrophages peuvent synthétiser et sécréter de la LPL, l'étude de la production de la LPL par ces macrophages atteints de déficience partielle en LPL serait donc un modèle intéressant afin d'examiner l'effet des fibrates sur la régulation *in vivo* de la LPL.

Dans un second volet, la présente étude consistait à examiner la production et la sécrétion de la LPL par des macrophages en culture provenant de patients hétérozygotes pour la déficience en LPL afin de comparer la production de LPL de ces macrophages hétérozygotes à celle de macrophages normaux. L'expression de l'ARNm de la LPL, la masse immunoréactive de la LPL sécrétée, ainsi que l'activité de la LPL dans le milieu de culture ont été évaluées dans ces macrophages dérivés de monocytes. Par la suite, l'effet d'un activateur de la LPL, le bezafibrate, a été examiné, dans ces macrophages en culture. À plus long terme, cette étude vise à examiner le rôle potentiel des fibrates dans le traitement des hypertriglycériidémies et des lipémies induites par la déficience familiale en LPL.

## **CHAPITRE 2**

**L'occurrence fréquente des allèles mutés de la LPL (G188E, P207L and N291S)  
chez des patients lipémiques d'origine canadienne-française.**

## RESUME

La lipoprotéine lipase (LPL) joue un rôle central dans le métabolisme des triglycérides (TG), régulant ainsi le catabolisme des lipoprotéines riches en TG. La déficience en LPL pourrait dès lors contribuer à la manifestation de diverses dyslipoprotéïnémies ainsi qu'à la production de particules athérogéniques. Nous avons examiné 203 patients d'origine canadienne-française qui montraient un taux de TG égal ou supérieur à 10 mmol/l, afin de déterminer la fréquence des mutations G188E, P207L et N291S du gène de la LPL. Nous avons trouvé que 17% de ces patients lipémiques étaient porteurs d'un défaut dans le gène de la LPL et qu'un nombre approximativement égal de patients étaient porteurs de deux mutations majeures appelées N291S et P207L. La présente étude indique qu'une hypertriglycéridémie associée à de faibles niveaux de cholestérol HDL peut résulter d'un défaut dans l'activité catalytique de la LPL. Il a déjà été démontré que des facteurs, tant génétiques qu'environnementaux, pouvaient transformer une forme variante, apparemment inoffensive, en une forme pouvant causer une hypertriglycéridémie sévère, telle qu'observée chez des individus hétérozygotes ou homozygotes porteurs de l'allèle muté N291S. Nous suggérons que, dans certaines conditions, la mutation N291S pourrait prédisposer à une forme d'hypertriglycéridémie pouvant mener à la maladie cardiovasculaire.

**Frequent occurrence of mutant LPL alleles (G188E, P207L and N291S)  
in French-Canadian lipemic patients.**

**Agnès Pascot<sup>1</sup>, Marie-Claude Vohl<sup>1</sup>, Adi Barucha<sup>2</sup>, André Tchernof<sup>1</sup>,  
Claude Gagné<sup>1</sup>, M.R. Ven Murthy<sup>2</sup> and Pierre Julien<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Department of Medicine, Lipid Research Centre, Laval University Medical Centre,  
2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy, QC, Canada, G1V 4G2;  
Fax (418) 654-2277; E-mail Pierre.Julien@crchul.ulaval.ca*

*<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Laval University Ste-Foy, QC,  
Canada, G1K 7P4.*

**Key Words:** •lipoprotein lipase (LPL) •lipoprotein lipase deficiency  
•dyslipoproteinemia •lipemia •hypertriglyceridemia



**ABSTRACT**

Lipoprotein lipase (LPL) plays a central role in triglyceride (TG) metabolism, regulating the catabolism of TG-rich lipoproteins. LPL deficiency may then contribute to the manifestation of various dyslipoproteinemias and to the production of atherogenic particles. We have examined 203 French-Canadian patients in whom plasma TG were 10 mmol/L or greater in order to determine the occurrence of LPL gene mutations. We have found that 17% of these lipemic subjects were carrying a LPL gene defect and that an approximately equal number of them carried two major mutations called P207L and N291S. The present study indicates that hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol resulted from defective LPL catalytic activity. It has been concluded that genetic or environmental factors may transform an apparently harmless variant form of LPL allele, such as N291S, into a disease-causing mutation, as shown by the severe hypertriglyceridemia observed in heterozygote and homozygote individuals carrying the mutant allele N291S. It has been suggested that N291S variant could predispose to hypertriglyceridemia under various conditions that could then lead to coronary arteries diseases.

## INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34) is a glycoprotein enzyme that is produced by parenchymal cells and anchors to the capillary endothelial cell surface by proteoglycan links. LPL requires apolipoprotein (apo) CII, an essential cofactor, for its catalytic activity. LPL hydrolyses triglycerides (TG) of chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL) (Smith LC, 1984), generating remnants that are further hydrolysed by hepatic lipase (Jackson RL, 1983). LPL is thus involved in the maturation of plasma lipoproteins and its deficiency may contribute to the manifestation of several pathological conditions, to various dyslipoproteinemias and to the production of atherogenic particles (Murthy V, 1996).

Type I hyperlipoproteinemia is a rare autosomal recessive disorder characterized by severe fasting hypertriglyceridemia, mainly due to plasma chylomicronemia. This disorder has been reported to be also caused by primary LPL deficiency, by primary apo CII deficiency or by a circulating inhibitor of LPL activity (Brunzell JD, 1989). In the province of Québec, the disorder has been associated with a defect in the LPL gene, but not in the apo CII gene. Generally, homozygous carriers of LPL deficiency, such as LPL gene mutations G188E and P207L, express severe chylomicronemia due to the production of completely inactive LPL enzyme (for review: (Murthy V, 1996)). LPL gene mutations, inducing partial LPL deficiency, have also been described in homozygote patients without the expression of chylomicronemia (Murthy V, 1996). Recently, an individual with normal level of plasma TG but homozygote for the Asn291Ser (N291S) mutation has been reported (Funke H, 1995). In the present study, we report two homozygous chylomicronemic subjects for this N291S mutation among a cohort of 203 lipemic patients.

The heterozygote state for mutations G188E and P207L has been characterised by normal to severe hypertriglyceridemia, presence of TG-rich lipoproteins, dense LDL and cholesterol-poor HDL (Julien P, 1995a; Julien P, 1996). The heterogeneity of TG levels in these heterozygotes indicates that factor(s) other than LPL deficiency may exacerbate the phenotypic expression of hypertriglyceridemia. Recently, it has been reported that 12-20% of type IV and V hyperlipoproteinemia in the Québec population are associated with a genetic defect in plasma TG catabolism (Julien P, 1995a; Minnich A, 1995). Moreover, factors, such as age, obesity, hyperinsulinemia, apoE genotype and lipid-raising drugs have been shown to contribute to the expression of

hypertriglyceridemia in heterozygote carriers (Wilson DE, 1990; Wilson DE, 1993; Zhang H, 1995; Murthy V, 1996). The present study is intended to further characterize French-Canadian lipemic patients (plasma TG > 10 mmol/L) in order to examine the occurrence of major LPL gene mutations (G188E, P207L and N291S) previously reported in the Québec population.

## SUBJECTS & METHODS

### *Study subjects*

Subjects (n=203) seen at the Québec Lipid Research Clinic at Laval University Medical Centre were selected on the basis of their TG levels (lipemia: TG > 10 mmol/L). Control individuals (n=142) referred to our clinic for heterogeneous dyslipidemia, except for lipemia or family history of LPL deficiency, were randomly selected for the analysis of LPL gene mutations.

### *Plasma analyses*

Plasma lipoproteins fractions (Chylomicrons, VLDL, LDL and HDL) were prepared by the combined use of ultracentrifugation and heparin-manganese precipitation as previously described (Cantin B, 1992). The cholesterol and TG concentrations in plasma and lipoprotein fractions were determined enzymatically using an automated RA-1000 analyser from Technicon instruments (Tarrytown, NY, USA). Plasma apolipoprotein B (apoB) and AI (apoAI) levels were determined by rocket immunoassays (Cantin B, 1992), using standardised conditions (Moorjani S, 1987). ApoE phenotypes were determined using isoelectric focusing electrophoresis of delipidated VLDL (Moorjani S, 1989). Plasma glucose was enzymatically measured (Richter R, 1971) and plasma insulin was assessed by radioimmunoassay with polyethylene glycol separation (Desbuquois B, 1971).

### *DNA analysis*

Genomic DNA was extracted from frozen peripheral blood using a standard protocol of digestion with proteinase K (Sigma, Mi) followed by extraction with phenol and chloroform. Identification of the mutant LPL alleles was performed by polymerase chain reaction (PCR). Exon 5 of the LPL gene was amplified with 200 pmol of primers (5'-TTCCCTTTTAAGGCCTCGAT-3' and 5' AAGTCCTCTCTCTGCAATCAC-3') for the detection of point mutations G188E and P207L. Amplification conditions were adjusted, for the first cycle, at 95°C for 3 min, at 60°C for 0.5 min, at 72°C for 1 min, followed by 1 min at 95°C, 30 sec at 60°C, 1 min at 72°C for 29 cycles. Cycles ended with 10 min at 72°C. The LPL mutation P207L was detected by restriction digestion of the PCR product with DdeI enzyme (Bijvoet SM, 1992) whereas the LPL mutation

G188E was detected using Ava II enzyme (Monsalve MV, 1990). Exon 6 of the LPL gene was amplified with 200 pmol of primers (5'-GCCGAGATACAATCTTGGTA-3' and 5'-CTGCTTCTTTTGGCTCTGACTGTG-3') for the detection of point mutation N291S. Amplification conditions were 94°C, 1 min; 60°C, 30 sec; 72°C, 45 sec for 35 cycles. Mutation N291S was then detected by restriction digestion of the PCR product with Rsa I enzyme.

Figure 1 shows a normal subject for LPL N291S mutation (lane#1), a heterozygote subject for this mutation (lane#2), since the restriction enzyme cuts the abnormal allele, the presence of two bands indicates that the subject is heterozygote and a homozygote subject is characterised by one band since the two alleles were cut (lane#3).

### *Statistical analyses*

Although untransformed values are shown in tables 2 and 4, TG and cholesterol levels of the lipoproteins fraction were log<sub>10</sub> transformed in order to normalize their distribution prior to statistical analyses. Means were analysed by ANOVA. Differences in frequency for apoE isoforms, use of drugs, alcohol and cigarettes, occurrence of myocardial infarction, angina pectoris, coronary bypass surgery and diabetes mellitus, were tested by chi-square analyses. Associations among variables (TG, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol levels) were assessed by the Pearson correlation coefficient. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed with Statistical Analysis System<sup>®</sup> software (SAS Institute, Inc.).

## RESULTS

None of the 142 control patients was detected as positive for these three LPL gene mutations (Table 1). However, in the cohort of 203 lipemic patients (TG greater than 10 mmol/l) who also had no family history of LPL deficiency, 17% were carrying mutant LPL alleles. Among these carriers of LPL gene mutations, 2 patients were found to be homozygotes for mutation N291S.

Table 2 shows the clinical characteristics of noncarriers and heterozygote carriers of LPL gene mutations. Eight individuals carrying mutation G188E were identified (Table 1) but one subject was excluded because medical information were not available for the study, whereas fourteen individuals carried mutation P207L. Mutant alleles G188E and P207L lead to complete absence of LPL catalytic activity. In heterozygotes, they both induce similar LPL deficiency (Julien P, 1996); therefore, these patients were combined in group 1. Group 2 includes 10 patients carrying mutation N291S known to induce only partial LPL deficiency in mutant allele (Funke H, 1995). Sex, age, body mass index (BMI), proportion of alcohol drinkers and amount of alcohol taken, smokers or persons using lipid-lowering drugs,  $\beta$ -blockers or hormones were not statistically different between noncarriers and carriers in group 1 and 2. No individual in group 1 used diuretics or were under oestrogenic replacement therapy. Even though chi-square test demonstrated that the frequency of coronary heart disease was similar between groups, it is noteworthy that the frequency of myocardial infarction, angina pectoris and coronary bypass surgery was about three fold higher in patients carrying mutation N291S compared to noncarriers, whereas this frequency was much lower in patients carrying a mutant allele with no LPL activity. It is also of interest to note that N291S patients (group 2) had significantly higher blood pressure compared to group 1 and noncarriers ( $p < 0.03$ ). In addition, N291S patients had glycemia 23 to 27% higher than group 1 or noncarriers as well as a higher frequency of diabetes that nearly reached statistical significance ( $p = 0.056$ ).

Phenotype analysis revealed that apoE2 isoform was present among 35% of noncarriers, 15% of individuals in group 1 and 33% in group 2 (Table 2). Seven apoE2/2 homozygote patients were found among the noncarriers whereas none was found in group 1 and one was present in group 2. Analysis of the apoE allele frequency indicated that heterozygote patients carrying mutations G188E or P207L had significantly less  $\epsilon 2$  but more  $\epsilon 4$  alleles compared to noncarriers or to a group of

French-Canadian individuals randomly selected from the geographical region. Apo E2 and E4 isoforms have been associated with raised plasma TG levels (Dallongeville J, 1992). No evidence for a difference in  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  allele frequency between group 2 and control group was detected.

The results of fasting plasma total cholesterol and TG levels, as well as lipid and apolipoprotein concentrations in lipoprotein fractions are listed in Table 4. All patients had high chylomicron and VLDL cholesterol and TG concentrations, normal LDL/HDL cholesterol ratio and very elevated plasma total/HDL cholesterol ratio, indicating a dyslipidemia associated with increased concentrations of VLDL particles. However, comparisons between heterozygote carriers and noncarriers did not revealed any statistically significant difference in plasma lipid and lipoprotein composition. Correlation analyses showed a negative association between plasma TG and HDL cholesterol in all groups (Table 5). The relationship between plasma TG and HDL cholesterol showed that HDL cholesterol decreased as plasma TG increased in all three groups, but was more pronounced in heterozygotes, as indicated by higher regression slopes in carriers compared to noncarriers. A significant correlation between plasma TG and LDL cholesterol was also observed in noncarriers, but not in carriers of LPL gene mutations.

Clinical characteristics and lipoprotein profiles of two homozygote male patients for mutation N291S are presented in Table 6. Both subjects had moderately elevated BMI, no apoE2 allele, normal blood pressure and glycemia. They had no diabetes or coronary heart disease. However, subject #1 was an alcohol drinker (180 grammes of alcohol by week) whereas subject #2 was taking Clofibrate (2g per day). They both had similar lipoprotein profiles compared to the N291S heterozygote carriers (Table 4). By contrast with reported values for homozygote patients carrying mutation G188E or P207L (Gagné C, 1989; Murthy V, 1996), these N291S homozygotes had less severe hypertriglyceridemia and subject #2 responded to clofibrate treatment.

## DISCUSSION

Among French-Canadian homozygotes for LPL deficiency and expressing complete LPL activity deficiency and chylomicronemia, two major mutations, G188E and P207L, account for 91% of mutant LPL alleles (Murthy V, 1996). We have previously reported that the highest worldwide incidence of heterozygosity for these two mutations was 1 in 48 in the NorthEastern region of the province of Québec and we have estimated the frequency of heterozygosity to be of the order of 45,000 carriers (Julien P, 1994). In addition, we have documented that one of these two LPL gene mutations was present in 12.6% of the lipemic patients referred at our Lipid Clinic. It was thus suggested that LPL deficiency could play a critical role in the expression of hypertriglyceridemia in the French-Canadian population, and that other yet unidentified LPL gene mutations could be involved in the induction of lipemia.

Recently, mutation N291S expressed in COS1 cells has been shown to result in partial LPL catalytic activity (Busca R, 1995). The prevalence of mutation N291S in the Québec population is not known because remaining catalytic activity prevents the expression of chylomicronemia in homozygote patients. In an attempt to determine if mutation N291S could be involved in the expression of hypertriglyceridemia in the French-Canadian population of Québec, we have studied the incidence of this mutant allele in a cohort of 203 lipemic patients (plasma TG levels greater than 10 mmol/l) seen at our Lipid Clinic. Previously identified homozygote patients, known to carry mutations G188E and/or P207L, patients with no postheparin plasma LPL activity or patients with family history of LPL deficiency have been excluded from this study. The present report indicates that 17% of lipemic patients carried one of these LPL gene mutations and that 6% of them carried mutation N291S (Table 1). This observation supports previous findings showing that heterozygosity for LPL gene mutations was present among hypertriglyceridemic patients (Julien P, 1994; Hoffer MJV, 1995; Minnich A, 1995). Furthermore, two of these carriers were found to be homozygotes for mutation N291S. As opposed to one previous report showing a normolipidemic subject carrying two mutant N291S alleles (Funke H, 1995), we presently report the two first cases of homozygosity for mutation N291S that result in severe hypertriglyceridemia. In addition, these data indicate that mutation N291S is nearly as prevalent as mutation P207L in our cohort. These mutant alleles were not found in 142 randomly selected dyslipidemic



patients, supporting the likelihood that mutant alleles, G188E and P207L and N291S, could play a critical role in the phenotypic expression of hypertriglyceridemia.

In the fasting state, carriers of mutations P207L and G188E have been characterized by a dyslipoproteinemia resulting from LPL deficiency, and expressing mild hypertriglyceridemia, low HDL levels and presence of denser LDL particles without increase in plasma total apo B (Julien P, 1996). In addition, the presence of LPL gene defects has been reported in hypertriglyceridemic patients in the Québec population (Julien P, 1995a; Minnich A, 1995). Heterozygote subjects for mutation G188E have also been shown to express impaired TG tolerance and postprandial lipemia (Miesenböck G, 1993) a predisposing condition for atherosclerosis (Zilversmit DB, 1979).

A number of investigations have reported that low LPL activity could be an important factor responsible for low plasma HDL concentrations and hypertriglyceridemia (Babirak SP, 1992; Vega GL, 1996). Moreover, relationships between elevated plasma TG, low HDL cholesterol levels, and the risk of coronary artery diseases (CAD) have been reported in many studies (Assmann G, 1991; Manninen V, 1992; Bainton D, 1992; Castelli WP, 1992; Bengtsson C, 1993; Stensvold I, 1993; Davignon J, 1996). In the present study, the higher incidence of CAD in the N291S heterozygotes did not reach statistical significance, probably because of the small number of individuals (n=10). However, the three fold higher frequency of myocardial infarction, angina pectoris and coronary artery bypass surgery observe in N291S carriers supports the hypothesis that mutation N291S was associated with increased frequency of CAD in these French-Canadian patients (Table 2). Association between N291S LPL mutation and reduced HDL cholesterol levels has also been reported in subjects with premature atherosclerosis (Reymer PWA, 1995).

Even though mutant LPL allele N291S induced partial reduction in LPL activity (32%) (Reymer PWA, 1995) compared to P207L and G188E (100%) (Ma Y, 1991), we report that N291S mutant allele was found in lipemic patients as frequently as P207L (Table 1). Comparisons of the lipoprotein profiles of heterozygote patients carrying a mutant allele expressing complete deficiency in LPL catalytic activity (group 1) to that of patients carrying a mutant allele expressing partial deficiency (group 2) showed no statistically significant difference in their lipid and apolipoprotein

levels (Table 4). Moreover, heterozygote patients, groups 1 and 2, have similar lipemia compared to noncarriers. These findings suggest that one or more secondary factor(s) have probably exacerbated the expression of hypertriglyceridemia. As expected in lipemic patients, the decrease in HDL cholesterol was associated with increased levels of plasma TG, however, the levels of LDL cholesterol were not associated with levels of plasma TG in heterozygotes, indicating that a critical defect in the catabolism of VLDL particles could have induced the expression of hypertriglyceridemia in these heterozygotes (Table 5). In addition, factors, such as age, obesity, hyperinsulinemia, diabetes mellitus, alcohol, apoE genotype and lipid-raising drugs could have contributed to the phenotypic expression of hypertriglyceridemia in familial LPL deficiency (Wilson DE, 1990; Wilson DE, 1993; Zhang H, 1995; Murthy V, 1996).

Mutant allele N291S as been reported as a predisposing factor for the expression of type III hyperlipoproteinemia and hypertriglyceridemia (Zhang H, 1995). However, the frequency of the  $\epsilon$ 2 allele in heterozygote patients carrying the N291S was similar to that of noncarrier lipemic patients as well as to that of normolipidemic controls randomly selected from the French-Canadian population (Table 3). Moreover, heterozygotes carrying mutations P207L and G188E had significantly less  $\epsilon$ 2 allele than all other groups. It is thus apparent that apo E2 was not an important predisposing factor for the expression of hypertriglyceridemia in our cohort of French-Canadian lipemic patients.

Association between BMI and LPL deficiency in the expression of hypertriglyceridemia has been proposed in heterozygotes with mutation G188E (Wilson DE, 1990) whereas predisposition or no association was reported with mutation N291S in other studies (Fisher RM, 1995; Mailly F, 1995; Syväne M, 1996). In the present study, patients had moderately elevated BMI which was identical between groups, suggesting that BMI was not a predisposing factor in the expression of lipemia in these heterozygote patients.

It has been reported that diabetic carriers of defective LPL alleles, G188E and N291S, are at higher risk of hypertriglyceridemia (Wilson DE, 1990; Syväne M, 1996). Hyperinsulinemia has also been found closely associated with hypertriglyceridemia in heterozygotes for LPL deficiency (Julien P, 1995b) and personal communication. It is thus of interest to note that, in the present study, 44% of lipemic patients with the N291S mutant allele had diabetes as opposed to only 10

and 16 % in other heterozygotes or control lipemic subjects (Table 2). Unfortunately, data showing fasting insulin levels were not available, but fasting glycemia showed a tendency to increase in N291S patients. Taken together, these findings suggest that diabetes could play a critical role in the expression of lipemia in heterozygotes carrying the N291S mutation.

Mutation N291S has been reported in the general population and in patients without CAD (Funke H, 1995; Reymer PWA, 1995). A homozygote individual for mutation N291S has even been described with normal levels of plasma TG and HDL cholesterol (Funke H, 1995). In the present study, we report significant incidence of mutation N291S in patients with severe hypertriglyceridemia. It is thus concluded that genetic or environmental factors, such as apo E2, obesity, hyperinsulinemia and diabetes, may transform a apparently harmless variant form of LPL allele into a disease-causing mutation (Fisher RM, 1995; Julien P, 1995b; Zhang H, 1995). This is further supported by the observation that homozygotes for mutation N291S can express severe hypertriglyceridemia (Table 6). In one of these two homozygotes, alcohol drinking and low LPL activity seems to have induce the lipemic condition. Moreover, it is possible that others mutations in the LPL gene not known, could be implied in the expression of hypertriglyceridemia observed among the study subjects. But, when TG levels are above 10 mmol/l, subjects are at a higher risk of pancreatitis.

In summary, the occurrence of mutation N291S was as frequent as mutation P207L in a cohort of French-Canadian lipemic patients but these LPL mutant alleles were absent in a group of control patients. Thus, mutation N291S accounted for a large proportion of the patients in a cohort of hypertriglyceridemic patients with low HDL cholesterol and at risk for CAD. It has been suggested that LPL N291S variant could predispose to hypertriglyceridemia under various conditions, such as diabetes, and could thus lead to CAD.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

**We are grateful to the staff of the Lipid Research Centre at C.H.U.L. for their help in the analysis of lipids and lipoproteins, and to Nicole Roy for her assistance in the collection of blood samples. A.P. received studentships from the Faculty of Medicine, Laval University, and C.H.U.L. Research Centre during this work. This study was supported by grants from Canadian Diabetes Association, and the National Institutes of Health (grant R01 NS34 945-01) to P.J. and M.R.V.M.**

## REFERENCES

- Assmann G, Schulte H: Triglycerides and atherosclerosis: Results from the Prospective Cardiovascular Muenster Study. *Atheroscler Rev* 22: 51-57, 1991.
- Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD: Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb* 12: 1176-1183, 1992.
- Bainton D, Miller NE, Bolton CH, Yarnell JW, Sweetnam PM, Baker IA, Lewis B, Elwood PC: Plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol as predictors of ischaemic heart disease in British men: the Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Br Heart J* 68: 60-66, 1992.
- Bengtsson C, Björkelund C, Lapidus L, Lissner L: Associations of serum lipoproteins and obesity with mortality in women: 20-year follow-up of participants in prospective population study in Gothenburg, Sweden. *Br Med J* 307: 1385-1388, 1993.
- Bijvoet SM, Hayden MR: Mismatch PCR: a rapid method to screen for the Pro207Leu mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Human Mol Gen* 1: 541, 1992.
- Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Hill M, Eds. New York, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, 1989, p. 1165-1180.
- Busca R, Peinado J, Vilella E, Auwerx J, Deeb SS, Vilaro S, Reina M: The mutant Asn291-Ser human lipoprotein lipase is associated with reduced catalytic activity and does not influence binding to heparin. *FEBS Letters* 367: 257-262, 1995.
- Cantin B, Brun LD, Gagné C, Murthy MR, Lupien PJ, Julien P: Alterations in erythrocyte membrane lipid composition and fluidity in primary lipoprotein lipase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1139: 25-31, 1992.

- Castelli WP: Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol* 70: 3H-9H, 1992.
- Dallongeville J, Lussier Cacan S, Davignon J: Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 33: 447-454, 1992.
- Davignon J, Cohn JS: Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 124: S57-S64, 1996.
- Desbuquois B, Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 732-738, 1971.
- Fisher RM, Mailly F, Peacock RE, Hamsten A, Seed M, Yudkin JS, Beisiegel U, Feussner G, Miller G, Hunphries SE, Talmud PJ: Interaction of the lipoprotein lipase asparagine 291-> serine mutation with body mass index determines elevated plasma triacylglycerol concentrations: a study in hyperlipidemic subjects, myocardial infarction survivors, and healthy adults. *J Lipid Res* 36: 2104-2112, 1995.
- Funke H, Assmann G: The low down on lipoprotein lipase. *Nature Genetics* 10: 6-7, 1995.
- Gagné C, Brun LD, Julien P, Moorjani S, Lupien PJ: Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *Can Med Assoc J* 140: 405-411, 1989.
- Hoffer MJV, Bredie SJH, Boomsma DI, Reymer PWA, Kastelein JJP, de Knijff P, Demacker PNM, Stalenhoef AFH, Havekes LM, Frants RR: The lipoprotein lipase (Asn291-Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 119: 159-167, 1995.
- Jackson RL: Lipoprotein lipase and hepatic lipase. In *The enzymes*. Boyer P, Eds. New York, Academic Press, 1983, p. 141-181.

- Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Cantin B, Cadelis F, Moorjani S, Lupien PJ: Mutations of the lipoprotein lipase gene as a cause of dyslipidemias in the Québec population. *Can J Cardiol* 10: 54-60, 1994.
- Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Lévesque G, Moorjani S, Cadelis F, Hayden MR, Lupien PJ: Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-canadian population. *Human mutation* , 1996.
- Julien P, Savanurmath CJ, Halappanavar SP, Murthy MRV, Lévesque G, Cadelis F, Gagné C, Lupien PJ. Lipoprotein lipase gene haplotypes and dyslipoproteinemias: study of a French-Canadian cohort. *Atherosclerosis X. Proceedings of the 10th International Symposium on Atherosclerosis.*, edited by A. WJaS, Amsterdam. Elsevier, Amsterdam, 1995a, p. 254-257.
- Julien P, Vohl MC, Lévesque G, Després JP, Murthy MRV, Gagné C, Gaudet D, Brun D, Cadelis F, Moorjani S, Lupien PJ: Effect of obesity on plasma triglyceride levels in familial lipoprotein lipase deficiency. *Atherosclerosis* 115 (suppl): S8, 1995b.
- Ma Y, Henderson HE, Roederer G, Monsalve MV, Clarke LA, Normand T, Julien P, Gagné C, Lambert M, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 324: 1761-1766, 1991.
- Maily F, Tugrul Y, Reymer PW, Bruin T, Seed M, Groenemeyer BF, Asplund-Carlson A, Vallance D, Winder AF, Miller GJ, et al: A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9-Asn). Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 15: 468-478, 1995.
- Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Mänttari M, Heinonen OP, Frick MH: Joint effects of serum triglyceride and LDL and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in Helsinki Heart Study: Implications for treatment. *Circulation* 85: 37-45, 1992.

- Miesenböck G, Holz B, Foger B, Brandstatter E, Paulweber B, Sandhofer F, Patsch JR: Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest* 91: 448-455, 1993.
- Minnich A, Kessling A, Roy M, Giry C, DeLangavant G, Lavigne J, Lussier-Cacan S, Davignon J: Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patient of french canadian descent. *J Lipid Res* 36: 117-124, 1995.
- Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, Julien P, Deeb S, Kastelein JJ, Peritz L, Devlin R, Bruin T, Murthy MRV, Gagné C, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest* 86: 728-734, 1990.
- Moorjani S, Dupont A, Labrie F, Lupien PJ, Brun D, Gagné C, Giguère M, Bélanger A: Increase in plasma high-density lipoprotein concentration following complete androgen blockage in men with prostatic carcinoma. *Metabolism* 36: 244-250, 1987.
- Moorjani S, Gaudet D, Laberge C, Thibault MC, Mathieu J, Morissette J, Lupien PJ, Brun D, Gagné C: Hypertriglyceridemia and lower LDL cholesterol concentration in relation to apolipoprotein E phenotypes in myotonic dystrophy. *Can J Neurol Sci* 16: 129-133, 1989.
- Murthy V, Julien P, Gagné C: Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70(2): 101-135, 1996.
- Reymer PWA, Gagné É, Grenmeyer BE, Zhang H, Forsyth I, Jansen H, Seidell JC, Kromhout D, Lie KE, Kastelein J, Hayden MR: A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nature Genetics* 10: 28-33, 1995.



- Richter R, Dauwalder H: Zur bestimmung der plasmaglukosekonzentration mit der hexokinase-6-phosphat-dehydrogenase-method. *Schweiz Med Wochenschr* 101: 615-618, 1971.
- Smith LC, Pownall HJ: Lipoprotein lipase. In *Lipase*. Brockman BBaH , Eds. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 1984, p. 263-305.
- Stensvold I, Tverdal A, Urdal P, Graaf-Iverson G: Non-fasting serum triglyceride concentration and mortality from coronary heart disease and any cause in middle-aged Norwegian women. *Br Med J* 307: 1318-1322, 1993.
- Syv anne M, Antikainen M, Ehnholm S, Tenkanen H, Lahdenper  S, Ehnholm C, Taskinen MR: Heterozygosity for Asn291->Ser mutation in the lipoprotein lipase gene in two Finish pedigrees: effect of hyperinsulinemia on the expression of hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 37: 727-738, 1996.
- Vega GL, Grundy SM: Hypoalphalipoproteinemia (low high density lipoprotein) as a risk factor for coronary heart disease. *Curr Opinion Lipidol* 7: 209-216, 1996.
- Wilson DE, Emi M, Iverius PH, Hata A, Wu LL, Hillas E, Williams RR, Lalouel JM: Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest* 86: 735-750, 1990.
- Wilson DE, Hata A, Kwong LK, Lingam A, Shuhua J, Ridinger DN, Yeager C, Kaltenborn KC, Iverius PH, Lalouel JM: Mutations in exon 3 of the lipoprotein lipase gene segregating in a family with hypertriglyceridemia, pancreatitis, and non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 92: 203-211, 1993.
- Zhang H, Reymer PWA, Liu MS, Forsythe IJ, Groenemeyer BE, Frohlich J, Brunzell JD, Kastelein JJP, Hayden MR, Ma Y: Patients with ApoE3 deficiency (E2/2, E3/2 and E4/2) who manifest with hyperlipidemia have increased frequency of an Asn 291->Ser mutation in the human LPL gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1695-1703, 1995.
- Zilversmit DB: Atherogenesis: a postprandial phenomen. *Circulation* 3: 473-485, 1979.

## TABLES

**TABLE 1. Occurrence of LPL gene mutation among dyslipidemic patients randomly selected at the Quebec Lipid Research Clinic and among lipemic patients with documented high plasma triglycerides (>10 mmol/l).**

	Various dyslipidemia	Lipemic patients
<b>n</b>	<b>142</b>	<b>201</b>
<b>Plasma triglycerides (mmol/l)</b>	<b>&lt; 4</b>	<b>10 to 183</b>
<b>Heterozygote carriers for G188E</b>	<b>0 (0)</b>	<b>8 (4)</b>
<b>Heterozygote carriers for P207L</b>	<b>0 (0)</b>	<b>14 (7)</b>
<b>Heterozygote carriers for N291S</b>	<b>0 (0)</b>	<b>10 (5)</b>
<b>Homozygotes for N291S</b>	<b>0 (0)</b>	<b>2 (1)</b>
<b>Total carriers of a LPL gene mutation</b>	<b>0 (0)</b>	<b>34 (17)</b>
<b>Number of subjects (%)</b>		

TABLE 2. Clinical characteristics of the lipemic patients

	Noncarrier	Heterozygote carrier	
		Group 1	Group 2
		Inactive LPL allele	Partly inactive LPL allele
n	169	21*	10
Sex M/F	130/39	17/4	5/5
Age (years)	43.6 ± 0.8	40.3 ± 2.8	47.1 ± 3.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.6 ± 0.3	28.1 ± 1.0	28.7 ± 0.6
ApoE phenotype	7 E2/2, 23 E3/2, 43 E3/3, 6 E4/2 22 E4/3, 2 E4/4	2 E3/2 5 E3/3 5 E4/3, 1 E4/4	1 E2/2, 1 E3/2 3 E3/3 1 E4/3
Blood pressure (mmHg)			
systolic	134.2 ± 1.4	129.7 ± 2.9	148.0 ± 7.1***
diastolic	84.9 ± 0.8	79.6 ± 2.1	90.5 ± 3.0***
Glycemia (mM)	6.4 ± 0.2	6.6 ± 0.6	8.1 ± 1.5
Alcohol** (%)	28	33	20
Smokers (%)	44	24	30
Drugs (%)			
lipid lowering	29	24	30
β-blockers	9	10	10
diuretics	9	0	10
oral contraceptives	0	0	0
hormones†	14	0	20
Frequency (%) of:			
myocardial infarction	3.0	0	10.0
pectoris angina	6.5	4.8	20.0
bypass surgery	2.4	0	10.0
diabetes	16.0	9.5	44.4‡

The data are mean ± SD. Group 1, subjects heterozygous for mutation G188E or P207L; group 2, subjects heterozygous for mutation N291S. NA, not available.

\* Number of subjects carrying M-188 and M-207: 7 and 14 respectively; \*\* Alcohol drinkers were taking more than 75 g of alcohol per week; †Premarine, Provera, Prednisone, Synthroid or Estraderm: women only; ‡  $\chi^2$  analysis; p=0.056. \*\*\*significantly different from noncarriers group and group1 (p<0.03)

TABLE 3. Allele frequencies for apoE isoforms in normal and lipemic subjects.

Allele	Control		Heterozygote carrier	
	Random control	Noncarrier	Group 1 Inactive LPL allele	Group 2 Partly inactive LPL allele
n	178	206	24	12
e2	0.208	0.209	0.041	0.250
e3	0.652	0.636	0.667	0.667
e4	0.140	0.155	0.292	0.083

Random controls were sampled from the same region where most of the lipemic patients were found.

Random control *vs* group 1:  $\chi^2$ ;  $p < 0.05$

**TABLE 4. Plasma and lipoprotein lipid concentrations and apolipoprotein levels in lipemic patients.**

	Noncarrier	Heterozygote carrier	
		Group 1 Inactive LPL allele	Group 2 Partly inactive LPL allele
<b>Cholesterol (mmol/l)</b>			
plasma	10.95 ± 0.57 (164)	9.62 ± 0.65 (21)	10.50 ± 1.26 (10)
chylomicron	3.38 ± 0.80 (72)	5.9 ± 1.39 (8)	2.45 ± 0.73 (7)
VLDL	5.05 ± 0.40 (72)	4.11 ± 0.94 (8)	7.27 ± 1.85 (7)
LDL	1.83 ± 0.13 (72)	1.66 ± 0.48 (8)	1.16 ± 0.19 (7)
HDL	0.62 ± 0.02 (116)	0.52 ± 0.04 (17)	0.57 ± 0.04 (9)
<b>Triglyceride (mmol/l)</b>			
plasma	22.06 ± 1.57 (169)	21.21 ± 3.20 (21)	24.34 ± 5.30 (10)
chylomicron	10.81 ± 3.63 (54)	17.34 ± 8.25 (6)	10.39 ± 5.46 (6)
VLDL	10.65 ± 0.77 (69)	8.37 ± 1.33 (8)	14.37 ± 3.68 (7)
LDL	0.72 ± 0.06 (54)	0.59 ± 0.10 (6)	0.79 ± 0.16 (6)
HDL	0.74 ± 0.05 (54)	0.73 ± 0.16 (6)	0.87 ± 0.13 (6)
<b>Apo B (g/L)</b>			
VLDL	0.57 ± 0.05 (76)	0.54 ± 0.09 (9)	0.78 ± 0.18 (7)
LDL	0.78 ± 0.03 (59)	0.63 ± 0.11 (8)	0.74 ± 0.15 (7)
<b>Apo AI (g/L)</b>			
HDL	1.20 ± 0.04 (59)	1.05 ± 0.12 (6)	0.99 ± 0.07 (6)
<b>Ratio</b>			
plasma-C / HDL-C	22.06 ± 3.48 (116)	22.87 ± 3.01 (17)	19.93 ± 4.29 (9)
LDL-C / HDL-C	2.90 ± 0.18 (72)	3.29 ± 0.90 (8)	2.06 ± 0.26 (7)
LDL-C / LDL-apoB	2.25 ± 0.08 (69)	2.44 ± 0.44 (8)	1.69 ± 0.20 (7)
VLDL-C / VLDL-TG	0.47 ± 0.02 (69)	0.48 ± 0.06 (8)	0.51 ± 0.07 (7)

C indicates cholesterol; TG , triglyceride; and apo, apolipoprotein.

The data are mean ± SD (number of subjects). Group 1, subjects heterozygous for mutation G188E or P207L; group 2, subjects heterozygous for mutation N291S.

TABLE 5. Correlations between TG levels and HDL and LDL cholesterol.

Correlations	Noncarrier		Heterozygote carrier			
	r <sup>2</sup>	P	Group 1		Group 2	
			Inactive LPL allele	P	Partly inactive LPL allele	P
TG vs HDL-C	-0.40	0.0001	-0.68	0.0025	-0.77	0.0144
TG vs LDL-C	-0.30	0.0115	-0.65	NS	-0.56	NS

TG, triglycerides; C, cholesterol; NS, not significant.

**TABLE 6. Clinical characteristics and lipoprotein levels in two male homozygote patients for LPL gene mutation N291S**

	Subject 1	Subject 2
Age (years)	23.9	56.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.1	28.7
ApoE phenotype	E3/3	E4/3
Blood pressure: diastolic/systolic (mmHg)	85/130	80/130
Fasting insulinemia (pmol/l)	42	NA
Glycemia (mmol/l)	5.10	4.39
Alcohol (g/week)	180	no
Smoker (nb/day)	no	no
Drugs	no	Clofibrate
Diabetes	no	no
Coronary artery disease	no	no
Cholesterol (mmol/l)		
plasma	11.1	8.2
chylomicron	5.3	NA
VLDL	3.1	NA
LDL	2.1	NA
HDL	0.6	0.6
Triglyceride (mmol/l)		
plasma	15.8	19.4
chylomicron	9.7	NA
VLDL	4.6	NA
LDL	0.9	NA
HDL	0.6	NA
Apo B (g/L)		
VLDL	0.4	NA
LDL	1.0	NA
Apo AI (g/L)		
HDL	1.1	NA
Ratio		
plasma-C/HDL-C	18.88	NA
LDL-C/HDL-C	3.58	NA
LDL-C/LDL-apoB	2.10	NA
VLDL-C/VLDL-TG	0.67	NA

NA, not available.

**FIGURE LEGEND**

**FIGURE 1.** Detection of the LPL N291S mutation. Exon 6 of the LPL gene was PCR-amplified from genomic DNA and digested with Rsa1. DNA is from control subject (lane#1), heterozygous subject (lane#2) and homozygous subject (lane#3). Molecular weight standard (lane#4) is a Hae III digest of pBR322 plasmid.



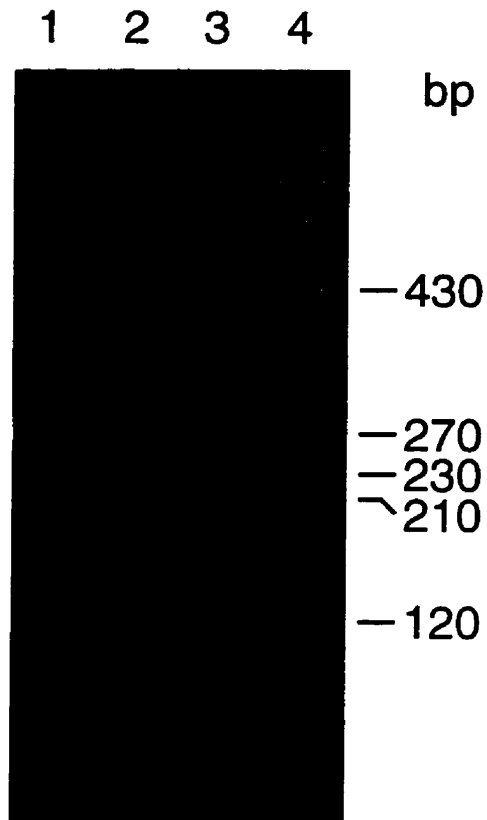


Figure 1

## CHAPITRE 3

**Etudes *in vitro* de macrophages dérivés de monocytes de  
sujets hétérozygotes pour la déficience en LPL:  
Effet du Bezafibrate.**

## RESUME

La lipoprotéine lipase (LPL) est sécrétée par les deux types cellulaires prédominants dans la plaque athérosclérotique, les macrophages et les cellules musculaires lisses. Lors d'hyperlipidémie, les monocytes pénètrent dans la paroi artérielle et mûrissent en macrophages qui sécrètent de la LPL capable d'hydrolyser les lipoprotéines riches en TG (VLDL et IDL) présentes dans l'espace interstitiel. Les lipides sont captés par des récepteurs spécifiques des macrophages, causant une accumulation de lipides intracellulaire et la formation de cellules spumeuses. Le but de la présente étude, était premièrement d'examiner la production de LPL par des macrophages dérivés de monocytes humains provenant de sujets hétérozygotes pour une mutation du gène de la LPL située au codon 207. Deuxièmement, l'effet du bezafibrate sur la production *in vitro* de LPL par ces macrophages a été investigué. Après 7 jours en culture dans du milieu D-MEM enrichi de 30% de sérum autologue, les macrophages dérivés de monocytes des sujets contrôles et hétérozygotes sont considérés matures. Les sujets contrôles et hétérozygotes avaient des niveaux similaires d'ARNm de la LPL, indiquant que la transcription de LPL n'est pas affectée en présence de la mutation 207 du gène de la LPL. Il est par ailleurs intéressant de noter que la masse immunoréactive de la LPL relâchée dans le milieu de culture par les macrophages, était significativement abaissée ( $p < 0,03$ ) dans le milieu contenant les macrophages avec une mutation du gène de la LPL, suggérant une sécrétion réduite de la protéine LPL par ces cellules hétérozygotes. Toutefois, à cause de faibles niveaux d'activité de la LPL et des variations intéressantes, aucune différence d'activité de la LPL n'a été détectée dans les milieux des cellules hétérozygotes et contrôles. Au jour 7, les macrophages ont été incubés en présence de 0.5 ou 1.0 mmol/l de Bezafibrate pendant 24 heures. Le Bezafibrate n'a eu aucun effet significatif sur les niveaux d'ARNm de la LPL ou sur l'activité de la LPL. Par contre, une augmentation quoique non significative a été observée dans la sécrétion de protéine LPL dans le milieu des cellules hétérozygotes, suggérant que le Bezafibrate pourrait augmenter la sécrétion de LPL.

*In vitro* studies of monocyte-derived macrophages of  
heterozygotes subjects for LPL deficiency:  
Effect of Bezafibrate.

Agnès Pascot<sup>1</sup>, François Cadelis<sup>1</sup>, M.R. Ven Murthy<sup>2</sup> and Pierre Julien<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Medicine, Lipid Research Centre, Laval University Medical Centre,  
2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy, QC, Canada, G1V 4G2;  
Fax (418) 654-2277; E-mail Pierre.Julien@crchul.ulaval.ca..*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Laval University Ste-Foy, QC,  
Canada, G1K 7P4.*

**Key Words:** •lipoprotein lipase (LPL) •lipoprotein lipase deficiency  
•dyslipoproteinemia •bezafibrate •monocyte-derived macrophages

## ABSTRACT

In the atherosclerotic plaque, lipoprotein lipase (LPL) is secreted by the two predominant cell types: macrophages and smooth muscle cells. In response to hyperlipidemia, monocyte-macrophages enter the vessel wall where they are involved in the formation of atheroma. LPL-modified triglyceride-rich lipoproteins present in interstitial space of the vascular wall are taken up by specific macrophage receptors, leading to intracellular accumulation of lipids and to formation of foam cells. The aims of the present study were (1) to examine the synthesis and production of LPL by human monocyte-derived macrophages obtained from heterozygote subjects carrying a LPL gene mutation at codon 207 in the mutant allele and (2) to investigate the effect of bezafibrate on the *in vitro* production of LPL by macrophages. Following a 7-day culture period in D-MEM medium supplemented with 30% of autologous serum, matured monocyte-derived macrophages from control and heterozygote subjects were found to have similar concentrations of LPL mRNA, indicating that the transcription of LPL was not affected by the presence of the LPL gene mutation. On the other hand, the level of LPL protein, based on LPL immunoreactive mass, released in the medium by macrophages, was significantly decreased ( $p < 0,03$ ) in medium containing macrophages with the LPL gene mutation, suggesting a reduced secretion of LPL protein by these heterozygote cells. However, due to low level of LPL activity and interassay variations, no difference in LPL activity was detected in media from heterozygote and control cells. At day 7, macrophages were then incubated in the presence of 0.5 or 1.0 mmol/l of Bezafibrate during 24 hours. Bezafibrate had no significant effect on LPL mRNA or on LPL activity. However, an increase, that did not reach statistical significance, was found in LPL protein secreted in the medium by heterozygote cells, suggesting that bezafibrate could increase the secretion of LPL.

## INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL, EC 3.1.1.34) is a glycoprotein which is produced by parenchymal cells and anchors to the surface of capillary endothelial cell by glycosaminoglycan links. LPL plays a key role in hydrolyzing triglycerides (TG) of chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL) (Smith LC, 1984). LPL requires apolipoprotein CII (apo CII), an essential cofactor for its catalytic activity. The lipolysis of chylomicron and VLDL TG by LPL generates chylomicron and VLDL remnants that are further hydrolyzed by hepatic lipase (Jackson RL, 1983). The enzymatic action of LPL results in the formation of mono- and diglycerides, and the release of free fatty acids which are either used as fuel for energy or re-esterified for storage in peripheral cells (Fruchart, 1989). LPL is also involved in the maturation of plasma lipoproteins and its deficiency may contribute to the manifestation of various dyslipoproteinemias and to the production of atherogenic particles (Murthy V, 1996).

Type I hyperlipoproteinemia is a rare autosomal recessive disorder characterized by severe fasting chylomicronemia. This disorder is mainly caused by primary LPL deficiency, by primary apo CII deficiency or by a circulating inhibitor of LPL activity (Brunzell JD, 1989). High incidence of familial LPL deficiency has been reported in the French-Canadian population of Québec (Murthy V, 1996). Heterozygotes for LPL deficiency are considered to be asymptomatic in regard to chylomicronemia. However, this heterozygote state is characterized by normal to severe hypertriglyceridemia, presence of TG-rich lipoproteins, denser LDL particles and cholesterol-poor HDL (Murthy V, 1996). Impaired TG tolerance and postprandial lipemia have been described in these patients (Miesenböck G, 1993).

Early atherosclerosis is characterized by the presence of monocyte-derived macrophages in the vascular wall (Inaba T, 1995). The initiating event in atherogenesis is believed to be related to the infiltration and entrapment of lipoproteins such as LDL and VLDL remnants into the arterial wall. Monocytes are then recruited which accumulate large amount of lipids and mature to macrophages and foam cells. These macrophages can secrete many proteins, including LPL, as initially described by Zilversmit (Zilversmit, 1979). It has also been shown that human monocyte-derived macrophages can synthesize and

secrete LPL *in vitro* (Khoo JC, 1981; Chait A, 1982; Lindqvist P, 1983; Stray N, 1985; Ylä-Herttuala S, 1991; O'Brien KD, 1992; Mattson L, 1993).

Fibrates, such as Bezafibrate, are lipid-lowering agents which are known to reduce plasma TG levels, through reduced hepatic synthesis of VLDL, increased LPL activity and reduced lipolysis in adipose tissue (Grundy SM, 1990). Fibrates may also modify the secondary structure of apoB of LDL, thus increasing the interaction of this particle with the LDL receptor (Davignon J, 1994). The aim of the present study was, first, to examine the synthesis and production of LPL by human monocyte-derived macrophages obtained from heterozygote subjects carrying a LPL gene mutation, and secondly, to investigate the effect of bezafibrate on this synthesis.

## SUBJECTS, MATERIALS & METHODS

### *Study subjects*

Three male carriers of mutation Pro207Leu of the LPL gene (heterozygotes), and three normolipidemic non-carrier males (controls) were selected. Each subject was screened for the presence of LPL mutations prevalent in the French-Canadian population, as previously described (Monsalve MV, 1990; Ma Y, 1992; Minnich A, 1995). All subjects were free of metabolic disorders, except for familial LPL deficiency in the carrier group. The clinical characteristics of the subjects are shown in table I.

### *DNA analysis*

DNA was extracted from white blood cells with guanidine hydrochloride, proteinase K digestion and ethanol precipitation as previously described (Jeanpierre M, 1987). Oligonucleotides were synthesized using an Applied Biosystems DNA synthesizer. Genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR). For detection of point mutations in exon 5 of the LPL gene, exon 5 was amplified with 200 pmoles of primers (5'-TTCCCTTTTAAGGCCTCGAT-3' and 5' AAGTCCTCTCTCTGCAATCAC-3'). Amplification conditions were 95°C, 3 min; 60°C, 0.5 min; 72°C, 1 min in the first cycle followed by 95°C, 1 min; 60°C, 0.5 min; 72°C, 1 min 2 sec for 29 cycles, and ending with 72°C, 10 min. The LPL mutation Pro207Leu was detected by restriction digestion of the DNA fragment with DdeI (Bijvoet SM, 1992) (figure 1). The LPL mutation Gly188Glu was detected by Ava II restriction digestion of this fragment (Monsalve MV, 1990). LPL exon 6 was amplified 94°C, 1 min; 60°C, 30 sec; 72°C, 45 sec for 35 cycles; with primers (5'-GCCGAGATAACAATCTTGGTA-3' and 5'-CTGCTTCTTTTGGCTCTGACTGTG-3'). The mutation Asp250Asn in this exon was detected by Taq I restriction digestion (Ishimura-Oka K, 1992). The LPL mutation Asn291Ser in exon 6 was detected by Rsa I restriction digestion.

Figure 1 shows a normal subject for LPL Pro207Leu mutation (lane#1), a heterozygote subject for this mutation (lane#2), an undigest DNA from heterozygote subject (lane#3) where only one band is present, since the



restriction enzyme cuts the abnormal allele, the presence of two bands indicates that the subject is heterozygote and a homozygote subject where the two alleles were cut (lane#4). LPL Gly188Glu, Asp250Asn and Asn291Ser mutations were normals for all subjects (data not shown).

### *Materials.*

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), penicillin (10 000 U/ml), streptomycin (10µg/ml), TRIzol (for RNA extraction) and Reverse Transcriptase were purchased from GIBCO BRL (Burlington, ONT). Disposable culture dishes and 6-well plates were obtained from FALCON. TAQ DNA polymerase and dNTP were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, QUE). BsaJ1 was purchased from New England Biolabs (Mississauga, ONT). Proteinase K and pBR322 Hae III digest were purchased from Sigma (St Louis, MO). dCTP<sup>32</sup> was purchased from Dupont NEN (Boston, MA). Ficoll-Paque<sup>®</sup> was purchased from Pharmacia (Baie d'urfe, QUE). Bezafibrate was generously donated by Boehringer Mannheim (Germany). All other chemicals were of analytical grade.

### *Methods.*

#### *Monocyte-derived macrophages*

Monocytes were isolated from peripheral blood of fasted normolipidemic healthy donors and heterozygote subjects using the Ficoll-Paque<sup>®</sup> (Pharmacia) gradient method. The separated cells were washed three times with sterile phosphate-buffered-saline (PBS) and resuspended in DMEM containing 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells ( $2 \times 10^6$ ) were plated in wells containing 2 ml of fresh medium and incubated for 1 hour at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-95% humidified air atmosphere to allow the monocytes to adhere to the dish. The medium and nonadherent cells were then removed and the adherent monolayer of monocytes was rinsed twice with fresh DMEM. Thereafter, the cells were maintained at 37°C in 2 ml of DMEM-antibiotics supplemented with 30% autologous serum and the medium was changed every 3 days. Pure bezafibrate was dissolved in DMSO to obtain a final concentration of 0.5 or 1 mmol/l in 0,1% DMSO in the culture medium and then added to the medium at day 7, time required for the maturation of monocytes in macrophages. Higher concentrations of Bezafibrate were tested and resulted in toxicity for cells. Media and cells were collected after

24 hours (day 8), frozen immediately ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and used to determine LPL activity, mass and mRNA. For the determination of cellular proteins, the cells were lysed with 0.5N NaOH and the total protein concentrations were determined by the method of BCA (Pierce Chemical Co), with bovine serum albumin (Sigma, St Louis, Mo, USA) as standard.

#### *LPL activity determination*

LPL activity in culture media of monocyte-derived macrophages was determined as described previously by Boivin et al (Boivin A, 1994). Briefly, samples of 100  $\mu\text{l}$  of culture medium were incubated at  $29^{\circ}\text{C}$  for 1 hour under gentle agitation with 100  $\mu\text{l}$  of a substrate mixture consisting of 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.6, which contained 10 MBq/l [*carboxyl*- $^{14}\text{C}$ ]triolein (Amersham, Oakville, Canada) and 2.52 mM cold triolein emulsified in 50 g/l gum arabic, as well as 20 g/l fatty acid-free bovine serum albumin, 10% human serum as a source of apolipoprotein CII, and either 0.2 or 2 M NaCl to obtain a final concentration of 0.1 and 1 M. 1 M NaCl was used to inactivate LPL. The reaction was stopped by adding 3.25 ml methanol-chloroform-heptane and 1.05 ml of a potassium phosphate monobasic-sodium hydroxyde buffer pH 10, 0.05 M. Free oleate released by LPL was then separated from intact triolein by centrifugation (1500 g for 15 min.) and mixed with Universol (New England Nuclear, Montreal, Canada). Sample radioactivity was determined in a scintillation counter. LPL activity was calculated by subtracting lipolytic activity determined in a final NaCl concentration of 1 M (non-LPL activity) from total lipolytic activity measured in a final NaCl concentration of 0.1 M. Lipase activity was estimated from the amount of free oleic acid that was released from [ $^3\text{H}$ ] triolein during incubation, by liquid scintillation counting. LPL activity was expressed as  $\text{mmoles of FFA.g}^{-1}\text{.hr}^{-1}$ .

#### *LPL mass determination*

The LPL enzyme mass was measured by enzyme-linked immuno-flow assay (ELIFA). The Easy-Titer<sup>TM</sup> ELIFA Apparatus (Pierce Chemical Co.) employs a sheet of nitrocellulose 0,45 mm sealed between two gaskets as the adsorptive surface. A sample application plate (96 wells) is clamped on top of the membrane under which 96 individual cannulae empty into collecting wells placed

under low vacuum. The monoclonal anti-LPL 10C3 (Cadelis F, 1996) was diluted in 0,5% phosphate buffer saline-bovine serum albumin (PBS-BSA) to get 1 µg/µl and 100 µl was pipetted into the wells and pulled through for 15 minutes. Then 200 µl of Super Block blocking buffer in PBS (Pierce) was added and pulled through for 20 minutes. After washing once with 200 µl of PBS-Tween 20 (0,05% v/v), 200 µl of antigen diluted in 0,5% PBS-BSA containing 5 mM deoxycholic acid was added into the appropriate wells and pulled through for 25 minutes. The membrane was then washed twice using 200 µl of PBS-Tween and then, 100 µl of the monoclonal anti-LPL 10C3 coupled to horseradish peroxidase diluted 1500 times in the blocking buffer was added and pulled through for 25 minutes. After three washes using 200 µl of PBS-Tween, a microtiter plate was placed into the lower chamber and 100 µl of the 1-Step Turbo TMB substrate (Pierce) was added into the wells and pulled through the membrane for 5 minutes. The reaction was stopped by adding 100 µl of 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance at 450 nm was read in an automated ELISA plate reader.

#### *LPL mRNA determination*

Adherent macrophages were released by adding 1 ml of TRIzol to each well. Total RNA was extracted according to GIBCO BRL procedures and then frozen at -80°C. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for the determination of LPL mRNA levels using interspecies mRNAs as internal standards (Levesque G, 1994). Briefly, 100 ng of human monocyte-derived macrophages mRNA and 150 ng of rat adipose tissue mRNA was reverse transcribed into cDNA with 50 ng of primer 1 (TACACCTGGTCGATCACTTC), 20 pmoles of dNTP and 0.2 U of reverse transcriptase. The mixture was incubated during 60 min at 42°C, followed by 10 min incubation at 95°C in order to denaturate the RNA-cDNA complex. Then, 50 ng of primer 2 (GCAGGAAGTCTGACCAATAAG), 0.5 U of *Taq* DNA polymerase and 20 µCi of <sup>32</sup>P-dCTP were added. The reaction mixture was denatured at 95°C for 3 min and a PCR was performed with 1 min denaturation at 94°C, 1 min primer annealing at 56°C and 1 min extension at 72°C for 30 cycles. The extension step was increased by 3 sec after each cycle. The amplified cDNA was digested during 4 hours at 60°C, with 4 U of *Bsa*I, a restriction endonuclease. The final product was analyzed after electrophoresis in a 8% acrylamide gel (200 volts, 5 hours). DNA bands were visualized by staining with

ethidium bromide. The bands of rat and human amplified products were then counted separately using a liquid scintillation counter. Ratios of rat to human LPL mRNA were calculated and used to evaluate the production rate of human LPL mRNA in macrophages.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out with Statistical Analysis System® software (SAS Institute, Inc.).

## RESULTS

### *Subject characteristics*

Clinical characteristics of the control and heterozygote subjects for mutation Pro207Leu of the LPL gene are summarized in Table I. The BMI of the control subjects was significantly higher compared to the heterozygotes. The LDL cholesterol levels of heterozygotes were significantly increased compared to the control levels.

### *Effect of Dimethyl sulfoxide (DMSO)*

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is an inducer of neutrophilic differentiation (Novak HI, 1990), but 0.1% DMSO does not appear to have any effect on the levels of LPL activity, mass or mRNA ratios after the maturation of monocytes into macrophages. The viability of the cells was also not affected in the presence of DMSO 0.1%. DMSO was specially used to dilute Bezafibrate.

### *Production of LPL mRNA by macrophages : Effect of Bezafibrate*

Figure 2 shows the results of the electrophoretic migration of the digested RT-PCR products. The middle band represents the human amplified and digested DNA fragment and the upper and lower bands represent the rat DNA fragments after amplification and digestion. All three bands were cut out. The two rat bands and the human band were placed in scintillation vials and counted separately. The human/rat ratios were calculated from this. In the absence of Bezafibrate, there was no significant difference in LPL mRNA levels between the control and the heterozygote subjects (figure 3), as already reported in COS-1 cells (Ma Y, 1991). The Pro207Leu LPL mutation does not appear to impair the synthesis of LPL RNA. The Bezafibrate treatment, does not enhance the synthesis of LPL mRNA in monocyte-derived macrophages.

### *LPL activity and mass in cell culture medium: Effect of Bezafibrate*

Figure 4 shows that in the absence of Bezafibrate treatment, the immunoreactive mass of LPL protein was significantly decreased in

heterozygote macrophage cells as compared to control cells ( $p < 0,03$ ). In COS-1 cells, the same results were observed (Ma Y, 1991). However, the addition of 0.5 mM Bezafibrate seems to have induced a four-fold increase in LPL mass in heterozygotes macrophages, even though this increase did not reach statistical significance. Higher concentration of Bezafibrate in the medium (1.0 mM) did not produce any further increase in LPL mass.

Incubation in DMSO without Bezafibrate, shows that LPL activity was similar in medium incubated with either heterozygote or control macrophages (figure 5). Moreover, 0.5 or 1.0 mM of Bezafibrate had no significant effect on the LPL activity present in medium incubated with human monocyte-derived macrophages.

## DISCUSSION

The plasma profiles of lipids and lipoproteins of heterozygotes is similar to the profiles of control subjects (Table 1). The lipids profiles of 90 carriers of LPL mutation has been reported (Julien P, 1996). The TG levels in the heterozygotes of the present study is quite low as compared to the levels reported in the cohort of 90 carriers. This may be due to the low number of patients (3) in this study.

It has been reported that low LPL activity could be an important factor responsible for low plasma HDL concentrations and hypertriglyceridemia (Julien P, 1994), two events that have been associated with atherosclerosis (Assmann G, 1992).

Recently, heterozygous LPL deficiency has been reported to be related to the incidence of familial combined hyperlipidemia (Babirak SP, 1989) or hypertriglyceridemia (Wilson DE, 1990), suggesting that this genetic disorder coupled with another metabolic disorder may be responsible for the deterioration of the lipidic profile, and subsequently the atherogenic profile.

The results obtained without the Bezafibrate treatment were similar to those obtained in COS-1 cells (Ma Y, 1991), except for the levels of LPL activity. The levels of LPL activity in the culture medium of both controls and heterozygotes cells was not significantly different (figure 5). In COS-1 cells, it has been reported that LPL activity secreted by cells transfected with the mutant Pro207Leu cDNA, was lower than in cells transfected with the normal LPL cDNA. This may be due to the low level of LPL activity and interassay variations. The LPL immunoreactive mass (figure 4) measured in the culture media of monocyte-derived macrophages derived from heterozygotes was significantly lower than the controls ( $p < 0,03$ ). The LPL mRNA ratio was found to be the same in controls and heterozygotes (figure 3).

Bezafibrate treatment has been investigated in patients with hypertriglyceridemia (Kobayashi J, 1994). Before the treatment, LPL activity and mass of heparinized serum patients was found to be lower than in the serum of normal controls. After eight weeks of treatment with Bezafibrate (200 mg/d), activity and mass of LPL of heparinized serum were significantly increased and

the increases of LPL mass were positively correlated with the decrease of TG levels.

The present study examined the effect *in vitro* of Bezafibrate on the synthesis of LPL mRNA and on the secretion (mass) and activity of LPL protein by human monocyte-derived macrophages of heterozygotes for the Pro207Leu mutation of the LPL gene and control subjects. Bezafibrate did not enhance LPL transcription as shown by the LPL mRNA ratio (figure 3). It had no effect on the production of LPL protein as confirmed by the LPL immunoreactive mass levels (figure 4) and no effect on LPL activity (figure 5).

Sniderman (Sniderman AD, 1995) has highly recommended the use of statines (inhibitors of HMG CoA reductase) and not of fibrates for the treatment of hypertriglyceridemia and hyperapo B. But the study heterozygote subjects do not exhibit any hyperapo B. Heterozygotes for LPL deficiency have a defect in the lipoprotein catabolism but not in the production of lipoproteins, so the use of fibrates is preferable.

In summary, a significantly decrease of LPL protein was observed in heterozygote cells medium and an increase, that did not reach statistical significance, was found in LPL protein secreted in the medium by Bezafibrate<sup>®</sup> treated-heterozygote cells, suggesting that bezafibrate could increase the secretion of LPL.



## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the staff of the Lipid Research Centre at C.H.U.L. for their help in the analysis of lipids and lipoproteins, and to Nicole Roy for her assistance in the collection of blood samples. This study was supported by a grant from Canadian Diabetes Association to P.J. and M.R.V. Murthy. A.P. received studentships from the Faculty of Medicine, Laval University, and C.H.U.L. Research Centre during this work.

## REFERENCES

- Assmann G, Schulte H: Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM Experience). *Am J Cardiol* 70: 733-737, 1992.
- Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD: Detection and characterization of the heterozygous state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 9: 326-334, 1989.
- Bijvoet SM, Hayden MR: Mismatch PCR: a rapid method to screen for the Pro207Leu mutation in the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Human Mol Gen* 1: 541, 1992.
- Boivin A, Montplaisir I, Deshaies Y: Postprandial modulation of lipoprotein lipase in rats with insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 267 (Endocrinol. Metab. 30): E620-E627, 1994.
- Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Hill M, Eds. New York, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, 1989, p. 1165-1180.
- Cadelis F, Julien P, Valet JP, Deshaies Y, Murthy MRV, Lupien PJ: A monoclonal antibody against human lipoprotein lipase inhibiting heparin binding without affecting catalytic activity. *Biochem Cell Biol* 74: 1-7, 1996.
- Chait A, Iverius PH, Brunzell JD: Lipoprotein Lipase Secretion by Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Clin. Invest.* 69: 490-493, 1982.
- Davignon J: Fibrates: A review of important issues and recent findings. *Can J Cardiol* 10 suppl B: 61B-71B, 1994.
- Fruchart, Shepherd: *Human Plasma Lipoproteins*. Editor, Eds. Berlin. New York, Walter de Gruyter, 1989.

Grundy SM: *Cholesterol and Atherosclerosis. Diagnosis and Treatment*. Editor , Eds. New York, Gower Medical Publishing, 1990.

Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N: Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 522-528, 1995.

Ishimura-Oka K, Semenkovich CF, Faustinella F, Goldberg IJ, Shachter N, Smith LC, Coleman T, Hide WA, Brown WV, Oka K, Chan L: A missense (Asp250Asn) mutation in the lipoprotein lipase gene in two unrelated families with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Lipid Res* 33: 745-754, 1992.

Jackson RL: Lipoprotein lipase and hepatic lipase. In *The enzymes*. Boyer P , Eds. New York, Academic Press, 1983, p. 141-181.

Jeanpierre M: A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Research* 15: 9611, 1987.

Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Cantin B, Cadelis F, Moorjani S, Lupien PJ: Mutations of the lipoprotein lipase gene as a cause of dyslipidemias in the Québec population. *Can J Cardiol* 10: 54-60, 1994.

Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Lévesque G, Moorjani S, Cadelis F, Hayden MR, Lupien PJ: Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-canadian population. *Human mutation* , 1996.

Khoo JC, Mahoney EM, Witzum JL: Secretion of Lipoprotein Lipase by Macrophages in Culture. *J. Biol. Chem.* 256: 7105-7108, 1981.

Kobayashi J, Takahashi K, Tashiro J, Shirai K, Saito Y, Yoshida S, Hashimoto H, Fukamachi I, Niihara K, Sasaki N: Effects of Treatment with

Bezafibrate on Lipoprotein Lipase Activity and Mass in Patients with Hypertriglyceridemia. *Arzneim.-Forsch. / Drug. Res.* 44 (D): 145-148, 1994.

Levesque G, Lamarche B, Murthy MRV, Julien P, Després JP, Deshaies Y: Determination of changes in specific gene expression by reverse transcription PCR using interspecies mRNAs as internal standards. *BioTechniques* 17: 738-741, 1994.

Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM, Witztum JL, Steinberg D, J.A. L: The Role of Lipoprotein Lipase in the Metabolism of Triglyceride-rich Lipoproteins by Macrophages. *J. Biol. Chem.* 258: 9086-9092, 1983.

Ma Y, Henderson HE, Roederer G, Monsalve MV, Clarke LA, Normand T, Julien P, Gagné C, Lambert M, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 324: 1761-1766, 1991.

Ma Y, Wilson BI, Bijvoet S, Henderson HE, Cramb E, Roederer G, M.R.V. M, Julien P, Bakker HD, Kastelein JJ, Brunzell JD, Hayden MR: A missense mutation (Asp250-Asn) in exon 6 of the human lipoprotein lipase gene causes chylomicronemia in patients of different ancestries. *Genomics* 13: 649-653, 1992.

Mattson L, Johansson H, Ottosson M, Bondjers G, Wiklund O: Expression of Lipoprotein Lipase mRNA and Secretion in Macrophages Isolated from Human Atherosclerotic Aorta. *J. Clin. Invest.* 92: 1759-1765, 1993.

Miesenböck G, Holzl B, Foger B, Brandstatter E, Paulweber B, Sandhofer F, Patsch JR: Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest* 91: 448-455, 1993.

Minnich A, Kessling A, Roy M, Giry C, DeLangavant G, Lavigne J, Lussier-Cacan S, Davignon J: Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein

lipase in hypertriglyceridemic patient of french canadian descent. *J Lipid Res* 36: 117-124, 1995.

Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, Julien P, Deeb S, Kastelein JJ, Peritz L, Devlin R, Bruin T, Murthy MRV, Gagné C, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest* 86: 728-734, 1990.

Murthy V, Julien P, Gagné C: Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70(2): 101-135, 1996.

Novak HI, Blauenstein P, Schubiger PA: Regulation of the cell surface expression of a nonspecific cross-reacting antigen variant during differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* 50: 7437-7443, 1990.

O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A: Lipoprotein Lipase is Synthesized by Macrophages-derived Foam Cells in Human Coronary Atherosclerotic Plaques. *J. Clin. Invest.* 89: 1544-1550, 1992.

Smith LC, Pownall HJ: Lipoprotein lipase. In *Lipase*. Brockman BBaH , Eds. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV, 1984, p. 263-305.

Sniderman AD, Julien P, Cianflone K: Peripheral triglyceride clearance, the adipsin-ASP pathway, and type IV hyperlipoproteinemia. In *Year Book of Endocrinology* Eds. St-Louis, USA, Mosby-Year Boof Inc., 1995, p. xix-xxxvii.

Stray N, Letnes H, Blomhoff JP: Synthesis and Secretion of Lipoprotein Lipase by Human Monocyte-Derived Macrophages. *Scand. J. Gastroenterol.* 20 (suppl. 107): 67-72, 1985.

Wilson DE, Emi M, Iverius PH, Hata A, Wu LL, Hillas E, Williams RR, Lalouel JM: Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest* 86: 735-750, 1990.

**Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL: Macrophages and Smooth Muscle Cells Express Lipoprotein Lipase in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10143-10147, 1991.**

**Zilversmit: Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 3: 473-485, 1979.**

## TABLES

TABLE I. Anthropometric data and plasma lipid and lipoprotein characteristics of heterozygote and control subjects.

Clinical characteristics	controls	heterozygotes	p
Age (years)	36,8 ± 1,1	39,17 ± 2,5	NS
Weight (kg)	78 ± 2,6	65 ± 1,5	0,01
Height (cm)	176,5 ± 4,8	174,8 ± 8,3	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,1 ± 0,8	21,3 ± 0,5	0,01
Waist (cm)	89,8 ± 8,1	77,1 ± 2,6	NS
Total triglyceride (mM)	1,3 ± 0,5	1,57 ± 0,3	NS
Cholesterol			
Total (mM)	4,97 ± 0,1	5,44 ± 0,4	NS
HDL(mM)	1,56 ± 0,2	1,06 ± 0,1	NS
LDL (mM)	2,83 ± 0,1	3,69 ± 0,2	0,03
Total /HDL	3,37 ± 0,6	5,2 ± 0,4	NS
Apo AI (g/L)	1,51 ± 0,1	1,33 ± 0,1	NS
Apo B (g/L)	0,91 ± 0,1	1,22 ± 0,1	NS
Fasting insulinemia (pmol/L)	60 ± 23	72 ± 9	NS

Mean ± SD, n=3. BMI, body mass index.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Detection of the LPL Pro207Leu mutation. Exon 5 of the LPL gene was PCR-amplified from genomic DNA and digested with *Dde1*. DNA is from control subject (lane#1), heterozygous subject (lane#2), undigested heterozygous subject (lane#3) and homozygous subject (lane#4). Molecular weight standard (lane#5) is a Hae III digest of pBR322 plasmid.

**Figure 2.** Autoradiogram of the products of RT-PCR of LPL mRNA in human monocyte-derived macrophages and rat adipose tissue. Mixture of human RNA (150 ng) and rat RNA (100 ng) (lane#1); and rat RNA alone (100 ng) (lane#2). All products were digested by *BsaJI*. Molecular weight standard (lane#3) is a Hae III digest of pBR322 plasmid.

**Figure 3.** LPL mRNA ratio obtained by RT-PCR of RNA synthesized by cultured human monocyte-derived macrophages of heterozygote and control subjects. Monocyte-derived macrophages were cultured during 8 d in growth medium supplemented by 30 % of autologous serum. On the seventh day, the medium was replaced by fresh medium containing 0,1% DMSO with or without 0.5 or 1 mM of Bezafibrate. The cells were incubated during 24h before the extraction of total RNA with TRIzol®. The mRNA ratio was obtained as described in the experimental procedures.

**Figure 4.** LPL mass secreted by human monocyte-derived macrophages obtained from heterozygote and control subjects. Monocyte-derived macrophages were cultured during 8 d in growth medium supplemented by 30 % of autologous serum. On the seventh day, the medium was replaced by fresh medium containing 0.1% DMSO with or without 0.5 or 1.0 mM of Bezafibrate. The cells were then incubated during 24h before the measurement of immunoreactive LPL mass released in the culture medium. LPL mass is expressed as nmoles of LPL protein per g of total cellular proteins.

**Figure 5.** LPL activity secreted by human monocyte-derived macrophages obtained from patient and control subjects. Monocyte-derived macrophages were cultured during 8 d in growth medium supplemented by 30 % of autologous serum. On the seventh day, the medium was replaced by fresh medium



containing 0.1% DMSO with or without 0.5 or 1.0 mM of Bezafibrate. The cells were then incubated during 24h before measurement of LPL activity secreted in the culture medium. LPL activity is expressed as mmoles of free fatty acids released per hour per g of cellular proteins.

## FIGURES

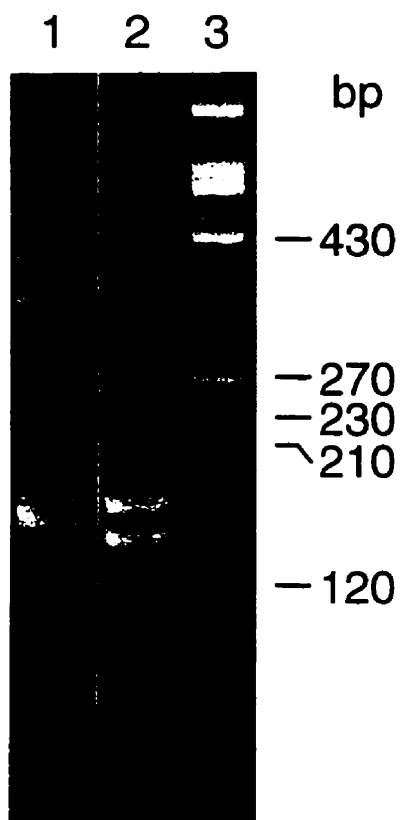


figure 1

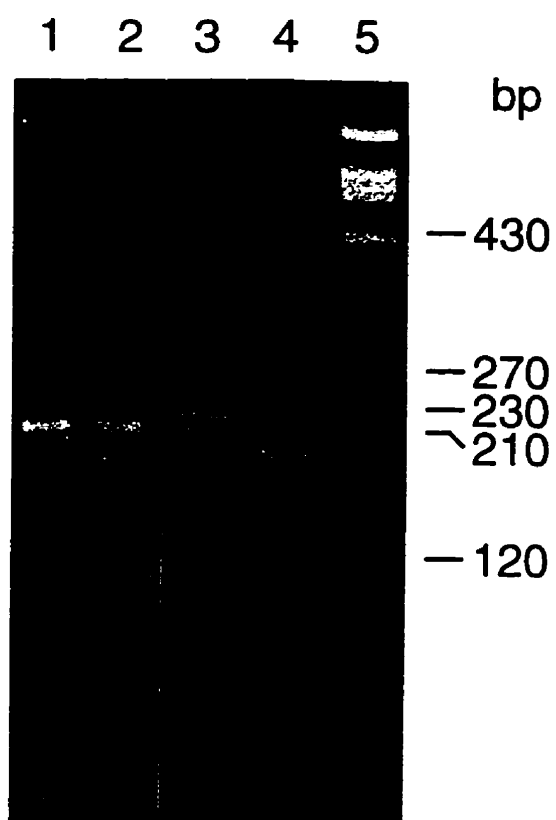


figure 2

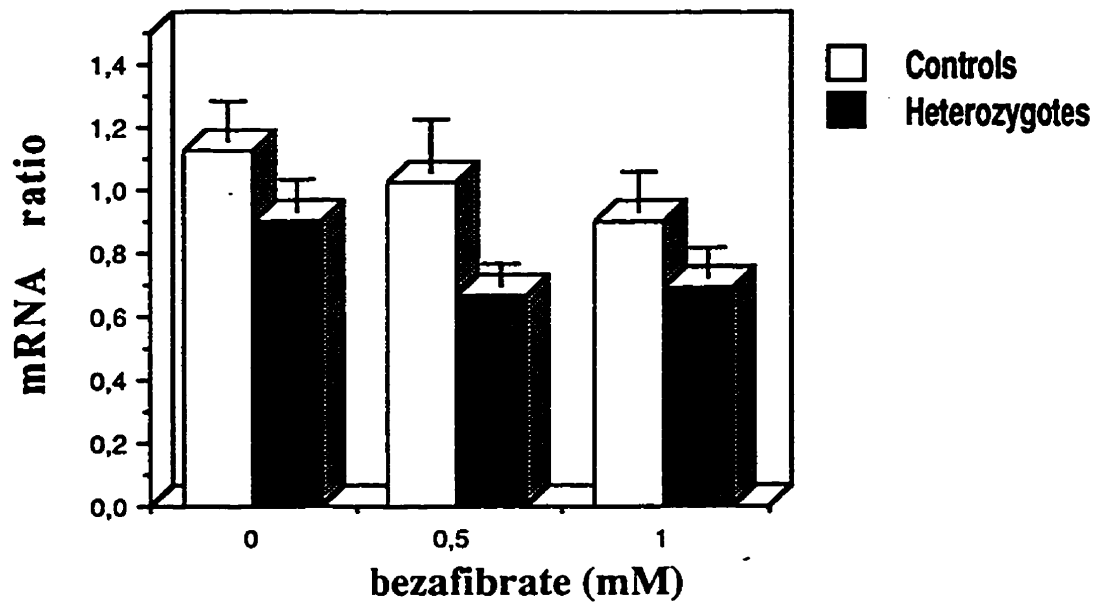


Figure 3.

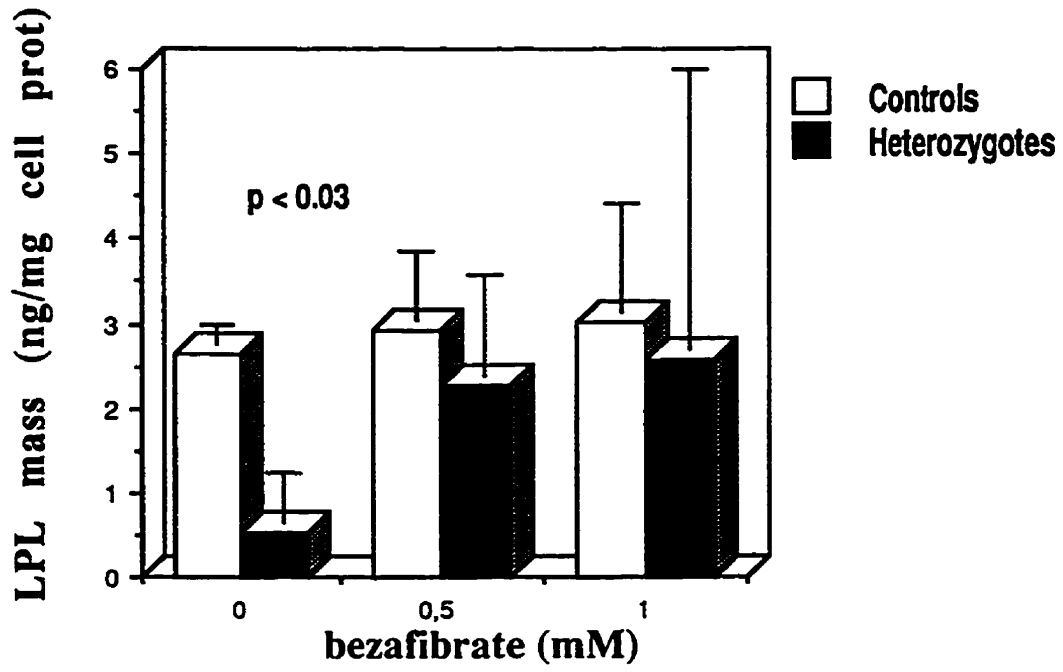


Figure 4.

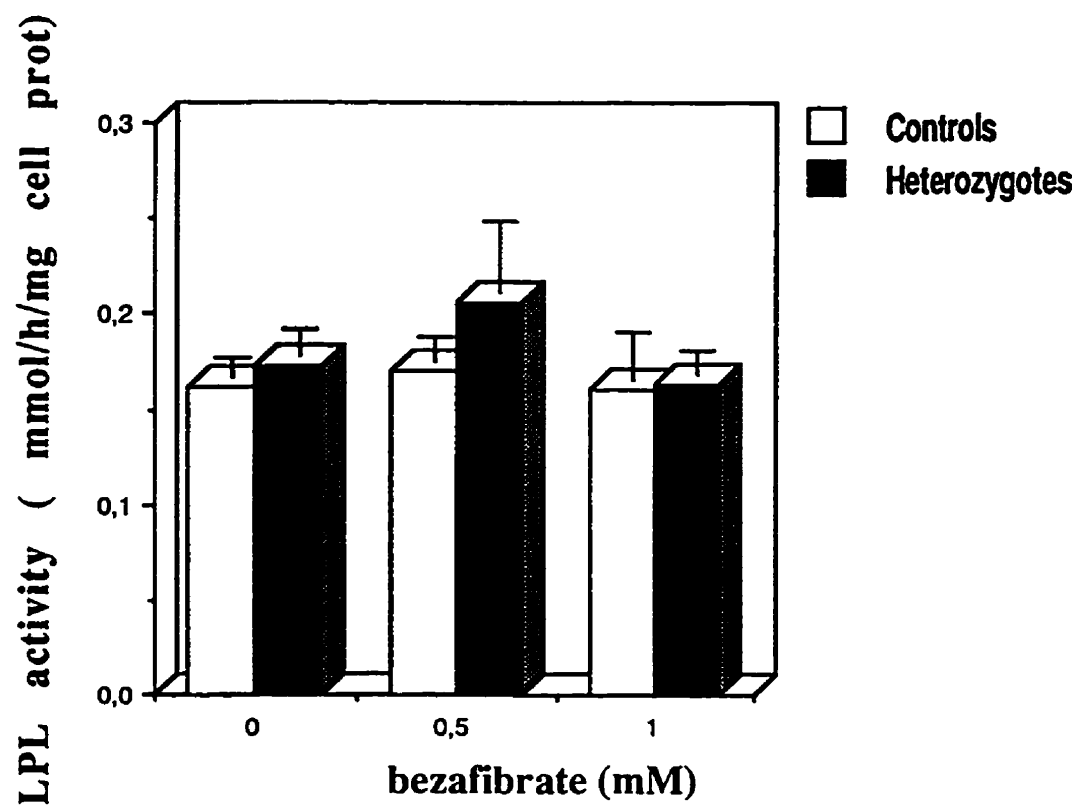


Figure 5

CHAPITRE 4

CONCLUSION

## CONCLUSION

La LPL est une enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines. Une déficience, même partielle de cette enzyme, est susceptible d'induire des anomalies dans le métabolisme des lipoprotéines et éventuellement de conduire à des profils lipidiques athérogéniques.

L'athérogénèse, fil conducteur des maladies cardio-vasculaires, se développe sournoisement, à l'insu des futurs malades. Plusieurs facteurs de risque de cette pathogénèse ont déjà été identifiés, tels que l'hypertension artérielle, le tabagisme, un taux de cholestérol total élevé, un taux de cholestérol-LDL élevé, un taux de HDL-cholestérol bas, l'hyperinsulinémie et plusieurs autres. L'athérosclérose est visible initialement par la présence d'une strie lipidique qui est directement reliée à l'infiltration des LDL et des monocytes sous l'endothélium. La maturation des monocytes en macrophages est associée à la sécrétion de LPL par les macrophages. La LPL aurait donc un rôle important dans le processus athérogénique comme le proposait Zilversmit en 1979.

Une corrélation directe entre l'athérosclérose ou la maladie cardio-vasculaire et la déficience partielle en LPL n'a toujours pas été démontrée jusqu'à ce jour. Les patients porteurs d'une mutation dans le gène de la LPL ont par contre un profil lipidique altéré avec des TG légèrement plus élevés que ceux retrouvés dans la population en générale, des LDL plus denses et des HDL pauvres en cholestérol, facteurs tous reconnus comme étant athérogéniques.

La première étude du présent mémoire visait à déterminer la prévalence de la déficience partielle en LPL chez des patients lipémiques de la clinique des lipides de Québec et de caractériser cliniquement ces patients. L'incidence des mutations dans le gène de la LPL de ces patients lipémiques était de 17%. Cette étude nous a permis d'identifier deux sujets homozygotes pour la mutation N291S et de décrire l'état d'homozygocité pour cette mutation. La mutation N291S, chez l'homozygote, présente une activité résiduelle de la LPL, puisque c'est uniquement la formation du dimère qui est altérée et non pas l'activité catalytique de l'enzyme.



La seconde étude visait à déterminer la synthèse, la sécrétion et l'activité de la LPL chez des macrophages en culture provenant de sujets hétérozygotes pour la mutation P207L du gène de la LPL et de sujets contrôles. Il a été observé que plus de masse immunoréactive de LPL était présente dans le milieu de culture des macrophages normaux que ceux provenant de sujets mutés (P207L). Suggérant qu'il y aurait une plus grande sécrétion de LPL par les macrophages normaux, sans toutefois que cette LPL ait une activité plus élevée, qui pourrait être expliquée par l'instabilité de la LPL dimérique en milieu de culture. Cette étude tentait également de démontrer l'effet d'un médicament, le Bezafibrate, un hypolipidémiant reconnu pour stimuler l'activité de la LPL, sur la synthèse, la sécrétion et l'activité de LPL par ces macrophages en culture. Le Bezafibrate n'a pas eu d'effet significatif sur la synthèse d'ARNm, ni sur l'activité et la masse de LPL, tant chez les macrophages de sujets contrôles que sur ceux provenant de porteurs de la mutation P207L du gène de la LPL.

Une perspective intéressante afin d'évaluer l'action du Bezafibrate sur l'activité de la LPL des hétérozygotes pour une mutation du gène de la LPL, serait d'administrer ce médicament à ces sujets afin de déterminer l'effet *in vivo* du fibrate sur le métabolisme des lipoprotéine riches en TG dans la déficience partielle en LPL. De plus, suite à l'étude de la cohorte de patients lipémiques, il serait intéressant de faire l'étude des profils lipoprotéiques des membres des familles de porteurs de la mutation N291S du gène de la LPL afin d'identifier le ou les facteurs induisant la lipémie à jeun observée chez ces sujets.

Au Québec, la déficience en LPL touche plus de 45 000 personnes. Quelques études publiées récemment démontrent l'implication de défauts du gène de la LPL dans l'expression phénotypique de dyslipidémies. Les interactions gène-gène et gène-environnement impliquées dans les dyslipoprotéinémies ne sont pas encore toutes connues. Grâce à l'avancement de la science et des techniques de biologie moléculaire pour l'identification des défauts génétiques, une meilleure connaissance de l'implication de cette enzyme dans le métabolisme des lipides aidera à prévenir et/ou guérir des milliers de personnes touchées par ce défaut métabolique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Addison T, Gull W: On a certain affection of the skin, vitiligoidea (a) plana, (b) tuberosa, with remarks. *Guy's Hosp Rep* 7: 265, 1851.
- Anfinsen C, Boyle E, Brown R: The role of heparin in lipoprotein metabolism. *Science* 115: 583-586, 1952.
- Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K: Lipoprotein Lipase: Recent Contributions from Molecular Biology. *29*: 243-268, 1992.
- Auwerx JH, Deeb S, Brunzell JD, Peng R, Chait A: Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Am Chem Soc* 27: 2651-2655, 1988.
- Babirak S, Fujimoto WY, Brunzell JD: Is the heterozygote state for LPL deficiency a subset of familial combined hyperlipidemia ? *Atherosclerosis* 7: 538a, 1987.
- Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD: Detection and characterization of the heterozygous state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 9: 326-334, 1989.
- Bates SR, Murphy PL, Feng Z, Kanazawa T, Getz GS: Very Low Density Lipoproteins promote triglyceride accumulation in macrophages. *Arteriosclerosis* 4: 103-114, 1984.
- Behr SR, Kraemer FB: Effects of Activation on Lipoprotein Lipase Secretion by Macrophage. *J. Exp. Med.* 164: 1362-1367, 1986.
- Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagné, SE, Hayden M: Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med* 335: 848-854, 1996.
- Ben Zeev O, Doolittle MH, Davis RC, Elovson J, Schotz MC: Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose

- trimming but not translocation to the cis-Golgi compartment. *J Biol Chem* 267: 6219-6227, 1992.
- Ben Zeev O, Stahnke G, Liu G, Davis RC, Doolittle MH: Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res* 35: 1511-1523, 1994.
- Bergeron J, Julien P, Murthy VMR: Expression de la lipoprotéine lipase humaine: mutations et physiopathologie. *m/s* 7: 1061-1068, 1991.
- Borensztajn J: In *Lipoprotein lipase* Eds. Chicago, Evener Publishers Inc, 1987, p. 336.
- Braun JEA, Severson DL: Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287: 337-347, 1992.
- Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A, Poapst M: Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. *N Engl J Med* 298: 1265, 1978.
- Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Hill M, Eds. New York, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, 1989, p. 1165-1180.
- Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* Eds. New York,, 1995, p. 1913-1932.
- Bürger M, Grütz O: Über hepatosplenomegale lipoidose mit xanthomaten veränderungen in haut und schleimhaut. *Arch Dermatol Syph* 166: 542, 1932.
- Busca R, Peinado J, Vilella E, Auwerx J, Deeb SS, Vilaro S, Reina M: The mutant Asn291-Ser human lipoprotein lipase is associated with reduced

catalytic activity and does not influence binding to heparin. *FEBS Letters* 367: 257-262, 1995.

Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T: Lipoprotein Lipase: Cellular Origin and Functional Distribution. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 258: C673-C681, 1990.

Cantin B, Boudriau S, Bertrand M, Brun LD, Gagné C, Rogers PA, Murthy MRV, Lupien PJ, Julien P: Hemolysis in primary lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism* 44: 652-658, 1995.

Chait A, Brunzell JD: Severe hypertriglyceridemia: role of familial and acquired disorders. *Metab Clin Exp* 32: 209-213, 1983.

Chait A, Brunzell JD: Chylomicronemia syndrome. *Adv Intern Med* 37: 249-273, 1992.

Chait A, Iverius PH, Brunzell JD: Lipoprotein Lipase Secretion by Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Clin. Invest.* 69: 490-493, 1982.

Chajek T, Stein O, Stein Y: Lipoprotein Lipase of Cultured Mesenchymal Rat Heart Cells.I. Synthesis, Secretion and Releasability by Heparin. *Biochim. Biophys. Acta* 528: 456-465, 1978.

Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK: Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor in vitro. *J Biol Chem* 268: 14168-14175, 1993.

Cybulsky MI, Gimbrone MAJ: Endothelial Expression of a Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecule During Atherogenesis. *Science* 251: 788-791, 1991.

Davignon J: Fibrates: A review of important issues and recent findings. *Can J Cardiol* 10 suppl B: 61B-71B, 1994.

- Day AJ, Fidge NH, Wilkinson GN: Effect of cholesterol in suspension on the incorporation of phosphate into phospholipid by macrophages in vitro *J Lipid Res* 7: 132-140, 1966.
- Deckelbaum RJ, Ramakrishnan R, Eisenberg S, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G: Triacylglycerol and phospholipid hydrolysis in human plasma lipoproteins: role of lipoprotein and hepatic lipase. *Biochemistry* 31: 8544-8551, 1992.
- Demacker PNM: Diets and postandrial lipoproteins. *Curr Opin Lipid* 6: 43-47, 1995.
- Dolphin PJ: Lipolytic enzymes and the role of apolipoproteins in the regulation of their activity. In *Structure and function of apolipoproteins*. M. R , Eds. Boca Raton, CRC Press Inc, 1992, p. 295-362.
- Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG: The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 265: 4570-4577, 1990.
- Dugi KA, Dichek HL, Brewer HBJ, Santamarina Fojo S: New insights into the structural basis for the different substrate specificities of hepatic lipase and lipoprotein lipase (abstract). *Circulation* 88: I-178, 1993.
- Dugi KA, Dichek HL, Talley GD, Brewer HBJ, Santamarina-Fojo S: Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem* 267: 25086-25091, 1992.
- Eckel RH: Lipoprotein Lipase. A Multifunctional Enzyme Relevant to Common Metabolic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 320: 1060-1068, 1989.
- Eisenberg S, E. S, Olivecrona T, Vlodavsky I: Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest* 90: 2013-2021, 1992.

- Faruqi RM, Dicolerto PE: Mechanisms of Monocyte Recruitment and Accumulation. *Br Heart J* 69: 519-529, 1993.
- Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 2214-2218, 1980.
- Fredrickson DS, Lees RS: *Familial hyperlipoproteinemia*. Editor , Eds. New York, McGraw-Hill, 1966.
- Fredrickson G, Stralfors P, Nilsson NO, Belfrage P: Hormono-sensitive lipase of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 256: 6311-6320, 1981.
- Fruchart, Shepherd: *Human Plasma Lipoproteins*. Editor , Eds. Berlin. New York, Walter de Gruyter, 1989.
- Gagné C, Brun D, Moorjani S, Lupien PJ: Hyperchylomicronémie familiale: Etude de l'activité lipolytique dans une famille. *Union Med Can* 106:333, 1977.
- Gagné C, Brun LD, Julien P, Moorjani S, Lupien PJ: Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *Can Med Assoc J* 140: 405-411, 1989.
- Gianturco SH, Bradley WA, Gotto AMJ, Morrisett JD, Peavy DL: Hypertriglyceridemic Very Low Density Lipoproteins Induce Triglyceride Synthesis and Accumulation in Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Clin. Invest.* 70: 168-178, 1982.
- Goldstein JL, Ho YD, Basu SK, Brown MS: Binding site on Macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 333-337, 1979.

- Green PHR, Glickman RM: Intestinal lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 22: 1153-1173, 1981.
- Grundy SM: *Cholesterol and Atherosclerosis. Diagnosis and Treatment*. Editor , Eds. New York, Gower Medical Publishing, 1990.
- Guérin M, Bruckert E, Dolphin PJ, Turpin G, Chapman MJ: Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 763-772, 1996.
- Hahn PF: Establishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science* 98: 19-20, 1943.
- Haubenwallner S, Essenburg AD, Barnett BC, Pape ME, DeMattos RB, Krause BR, Minton LL, Auerbach BJ, Newton RS, Leff T, Bisgaier CL: Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein C-III expression: a potential physiologic basis for their mode of action. *J Lipid Res* 36: 2541-2551, 1995.
- Havel R, Gordon RSJ: Idiopathic hyperlipemia: Metabolic studies in an affected family. *J Clin Invest* 39: 1777, 1960.
- Heller F, Harveng C: Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 25: 57-63, 1983.
- Henrickson T, Mahoney EM, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoproteins previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6499-6503, 1981.
- Hide WA, Chan L, Li WH: Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33: 167-178, 1992.



- Inaba T, Kawamura M, Gotoda T, Harada K, Shimada M, Ohsuga J, Shimano H, Akanuma Y, Yazaki Y, Yamada N: Effects of platelet-derived growth factor on the synthesis of lipoprotein lipase in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 522-528, 1995.
- Ishibashi S, Mori N, Murase T, Shimano H, Gotohda T, Kawakami M, Akanuma Y, Takaku F, Yamada N: Enhanced Lipoprotein Lipase Secretion from Human Monocyte-derived Macrophages Caused by Hypertriglyceridemic Very Low Density Lipoproteins. *Arteriosclerosis* 9: 650-655, 1989.
- Ishibashi S, Yamada N, Shimano H, Mori N, Mokuno H, Gotohda T, Kawakami M, Murase T, Takaku F: Apolipoprotein E and lipoprotein lipase secreted from human monocyte-derived macrophages modulate very low density lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 265: 3040-3047, 1990.
- Jensen J: The story of xanthomatosis in England prior to the first world war. *Clio Med* 2: 289, 1967.
- Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Cantin B, Cadelis F, Moorjani S, Lupien PJ: Mutations of the lipoprotein lipase gene as a cause of dyslipidemias in the Québec population. *Can J Cardiol* 10: 54-60, 1994.
- Julien P, Gagné C, Murthy MRV, Lévesque G, Moorjani S, Cadelis F, Hayden MR, Lupien PJ: Dyslipidemias associated with heterozygous lipoprotein lipase mutations in the French-canadian population. *Human mutation*, 1996.
- Julien P, Savanurmah CJ, Halappanavar SP, Murthy MRV, Lévesque G, Cadelis F, Gagné C, Lupien PJ. Lipoprotein lipase gene haplotypes and dyslipoproteinemias: study of a French-Canadian cohort. *Atherosclerosis X. Proceedings of the 10th International Symposium on Atherosclerosis.*, edited by A. WJaS, Amsterdam. Elsevier, Amsterdam, 1995a, p. 254-257.
- Julien P, Vohl MC, Lévesque G, Després JP, Murthy MRV, Gagné C, Gaudet D, Brun D, Cadelis F, Moorjani S, Lupien PJ: Effect of obesity on plasma

- triglyceride levels in familial lipoprotein lipase deficiency. *Atherosclerosis* 115 (suppl): S8, 1995b.
- Khoo JC, Mahoney EM, Witzum JL: Secretion of Lipoprotein Lipase by Macrophages in Culture. *J. Biol. Chem.* 256: 7105-7108, 1981.
- Khoo JC, Steinberg D: Hormono-sensitive lipase from rat adipose tissue. In *Methods in enzymology*. JM L , Eds. New York, Academic Press, 1975, p. 181-189.
- Kirchgessner TG, Leboeuf RC, Langner CA, Zollman S, Chang CH, Taylor BA, Schotz MC, Gordon JI, Lusic AJ: Genetic and Developmental Regulation of the Lipoprotein Lipase Gene: Loci Both Distal and Proximal to the Lipoprotein Lipase Structural Gene Control Enzyme Expression. *J. Biol. Chem.* 264: 1473-1482, 1989.
- Kleinman Y, Oschry Y, Eisenberg S: Abnormal regulation of LDL receptor activity and abnormal cellular metabolism of hypertriglyceridemic low density lipoprotein: normalization with bezafibrate therapy. *Eur J Clin Invest* 17: 538-543, 1987.
- Kobayashi J, Nishida T, Ameis D, Stahnke G, Schotz MC, Hashimoto H, Fukamachi I, Shirai K, Saito Y, Yoshida S: A heterozygous mutations (the codon for Ser447-a stop codon) in lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 70-77, 1992.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Storey JA: Influence of procetofen on lipid metabolism in normocholesterolemic rats. *Pharmacol Res Commun* 11: 635-641, 1979.
- Kuksis A: *Fat Absorption*. Editor , Eds. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1986.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MAJ, Libby P: An Atherogenic Diet Rapidly Induces VCAM-1, a Cytokine-Regulatable Mononuclear Leukocyte

- Adhesion Molecule, in Rabbit Aortic Endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 13: 197-204, 1993.
- Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM, Witztum JL, Steinberg D, J.A. L: The Role of Lipoprotein Lipase in the Metabolism of Triglyceride-rich Lipoproteins by Macrophages. *J. Biol. Chem.* 258: 9086-9092, 1983.
- Lookene A, Bengtsson Olivecrona G: Chymotryptic cleavage of lipoprotein lipase. Identification of a unique patient homozygote for two separate mutations in the LPL gene. *Arterioscler Thromb* 11: 1415 (Abstract), 1993.
- Ma Y, Henderson HE, Roederer G, Monsalve MV, Clarke LA, Normand T, Julien P, Gagné C, Lambert M, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 324: 1761-1766, 1991.
- Ma Y, Wilson BI, Bijvoet S, Henderson HE, Cramb E, Roederer G, M.R.V. M, Julien P, Bakker HD, Kastelein JJ, Brunzell JD, Hayden MR: A missense mutation (Asp250-Asn) in exon 6 of the human lipoprotein lipase gene causes chylomicronemia in patients of different ancestries. *Genomics* 13: 649-653, 1992.
- Mahoney EM, Khoo JC, Steinberg D: Lipoprotein Lipase Secretion by Human Monocytes and Rabbit Alveolar Macrophages in Culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1639-1642, 1981.
- Marui N, Offeman MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 1866-1874, 1993.
- Miesenböck G, Holzl B, Foger B, Brandstatter E, Paulweber B, Sandhofer F, Patsch JR: Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense

mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest* 91: 448-455, 1993.

Minnich A, Kessler A, Roy M, Giry C, DeLangavant G, Lavigne J, Lussier-Cacan S, Davignon J: Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patient of french canadian descent. *J Lipid Res* 36: 117-124, 1995.

Monsalve MV, Henderson H, Roederer G, Julien P, Deeb S, Kastelein JJ, Peritz L, Devlin R, Bruin T, Murthy MRV, Gagné C, Davignon J, Lupien PJ, Brunzell JD, Hayden MR: A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest* 86: 728-734, 1990.

Mulder M, Lombardi P, Jansen H, Van Berkel TJC, Frants RR, Havekes LM: Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 268: 9369-9375, 1993.

Murthy V, Julien P, Gagné C: Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70(2): 101-135, 1996.

Navab M, Hama SY, Van Lenten BJ, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM: A new anti-inflammatory compound, leumedin, inhibits modification of low density lipoprotein and the resulting monocyte transmigration into subendothelial space of cocultures of human aortic wall cells. *J Clin Invest* 91: 1225-1230, 1993.

Navab M, Imes SS, Hough GP, Hama SY, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM: Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to the induction of monocyte chemotactic protein-1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 88: 2039-2046, 1991.

- Nikkila EA:** Familial lipoprotein lipase deficiency and related disorders of chylomicron metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, Eds. New York, Stanbury JB, Wyngarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL and Brown MS., 1983, p. 622-642.
- Nikkilä EA, Huttunen JK, Ehnholm C:** Effect of clofibrate on postheparin plasma triglyceride lipase activities in patients with hypertriglyceridemia. *Metabolism* 26: 179-186, 1977.
- Nykjaer A, Bengtsson Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U, Gliemann J:** The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J Biol Chem* 268: 15048-15055, 1993.
- O'Brien KD, Alen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JH, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE:** Vascular Cell Adhesion Molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 92: 945-951, 1993.
- O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A:** Lipoprotein Lipase is Synthesized by Macrophages-derived Foam Cells in Human Coronary Atherosclerotic Plaques. *J. Clin. Invest.* 89: 1544-1550, 1992.
- Olivecrona T, Bengtsson G:** Lipoprotein Lipase. The Adipocyte and Obesity: Cellular and Molecular Mechanisms: 117-126, 1983.
- Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G:** Lipoprotein lipase from milk - The model enzyme in lipoprotein lipase research. In *Lipoprotein lipase*. J B, Eds. Chicago, Evener Publishers Inc, 1987, p. 15-58.
- Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G:** Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol* 4: 187-196, 1993.

- Osborne JCJ, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T: Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24: 5606-5611, 1985.
- Peterson J, Bihain BE, Bengtsson-Olivecrona G, Deckelbaum RJ, Carpentier YA, Olivecrona T: Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 909-913, 1990.
- Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR: Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140: 665-673, 1992.
- Printevesa YO, Peclo MM, Gown AM: Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. *Am J Pathol* 140: 889-896, 1992.
- Querfeld U, Ong JM, Prehn J, Carty J, Saffari B, Jordan SC, Kern PA: Effects of cytokines on the production of lipoprotein lipase in cultured human macrophages. *J Lipid Res* 31: 1379-1386, 1990.
- Redgrave TG: Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J Clin Invest* 49: 465-471, 1970.
- Redgrave TG, Small D: Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *J Clin Invest* 64: 162-171, 1979.
- Reymer PWA, Gagné É, Grenmeyer BE, Zhang H, Forsyth I, Jansen H, Seidell JC, Kromhout D, Lie KE, Kastelein J, Hayden MR: A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nature Genetics* 10: 28-33, 1995.

- Rizek RL, Welsh SO, Martson RM, Jackson EM: Levels and sources of fat in the US food supply and in diets individuals. In *Dietary Fats and Health*. WJ PEaV , Eds. Champaign, American Oil Chemists' Society, 1983, p. chap. 2.
- Rosenfeld ME, Butler S, Ord VA, Lipton BA, Dyer CA, Curtiss LK, Palinski W, Witztum JL: Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb* 13: 1382-1389, 1993.
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Engl J Med* 314: 448-456, 1986.
- Sanders M: Molecular and cellular concepts in atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* 61: 109-153, 1994.
- Saxena U, Goldberg IJ: Endothelial cells and atherosclerosis: lipoprotein metabolism, matrix interactions, and monocyte recruitment. *Curr Opin Lipidol* 5: 316-322, 1994.
- Saxena U, Kulkarni NM, Ferguson E, Newton RS: Lipoprotein lipase mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1653-1658, 1992.
- Schaefer EJ: *Lipoprotéines de haute densité et insuffisance coronarienne*. Editor , Eds. New York, Gower Medical Publishing, 1991.
- Schaefer EJ, Jenkins LJ, Brewer HBJ: Human chylomicron apolipoprotein metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 80: 405-412, 1978.
- Shepherd J: Mechanism of action of fibrates. *Postgrad Med J* 83 (suppl 5B): 9-20, 1993.
- Sherrill BC, Innerarity TL, Mahley RW: Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. *J Biol Chem* 255: 1804-1807, 1980.

- Siemans HW: Zur kenntnis der xanthoma. *Arch Dermatol Syph* 136: 159, 1921.
- Skarlatos SI, Dichek HL, Fojo SS, Brewer HB, Kruth HS: Absence of Triglyceride Accumulation in Lipoprotein Lipase-Deficient Human Monocyte-Macrophages Incubated with Human Very Low Density Lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 793-796, 1993.
- Sniderman AD, Julien P, Cianflone K: Peripheral triglyceride clearance, the adipsin-ASP pathway, and type IV hyperlipoproteinemia. In *Year Book of Endocrinology* Eds. St-Louis, USA, Mosby-Year Boof Inc., 1995, p. xix-xxxvii.
- St-Amand J, Gaudet D, Julien P, Moorjani S, Lupien PJ, Gagné C, Després JP. Gene-gene interaction between apolipoprotein E2 and lipoprotein lipase on plasma lipoprotein-lipid levels. *Experimental Biology 96*, edited by Journal TF, Washington, DC, 1996, p. abstract 3174.
- Stahnke G, Davis RC, Doolittle MH, Wong H, Scholtz MC, H. W: Effect of N-linked glycosylation on hepatic lipase activity. *J Lipid Res* 32: 477-484, 1991.
- Still WJS: An electron microscope study of cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Exptl. Mol. Pathol.* 2: 491-502, 1963.
- Stray N, Letnes H, Blomhoff JP: Synthesis and Secretion of Lipoprotein Lipase by Human Monocyte-Derived Macrophages. *Scand. J. Gastroenterol.* 20 (suppl. 107): 67-72, 1985.
- Stray N, Letnes H, Blomhoff JP: Intracellular Regulation of Lipoprotein Lipase in Human Monocyte-derived Macrophages. *Bioch. Biophys. Acta* 1045: 280-284, 1990.
- Tall AR, Green PHR, Glickman RM, Riley JW: Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apolipoproteins in the rat. *J Clin Invest* 64: 977-989, 1979.

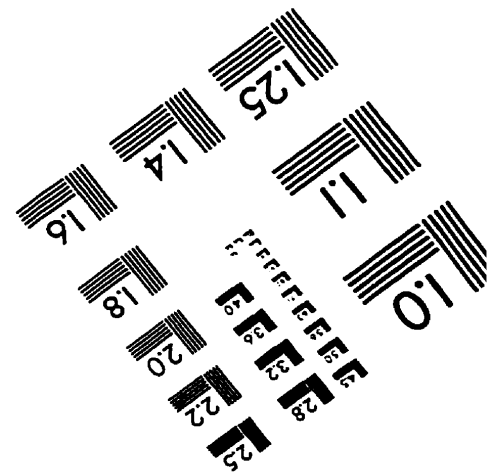
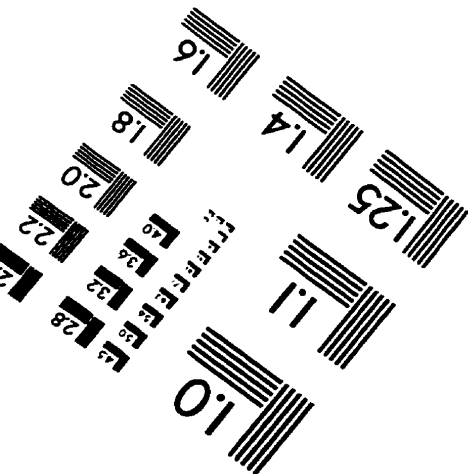
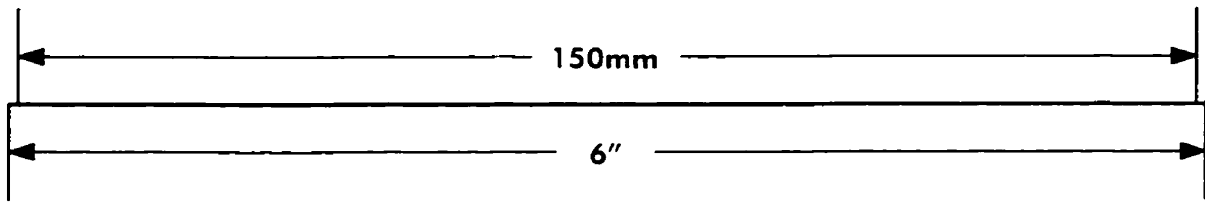
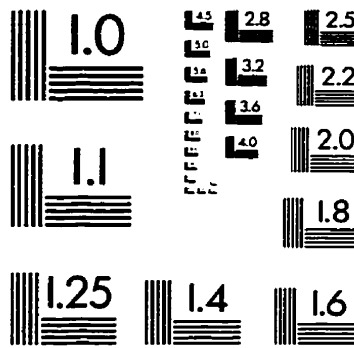
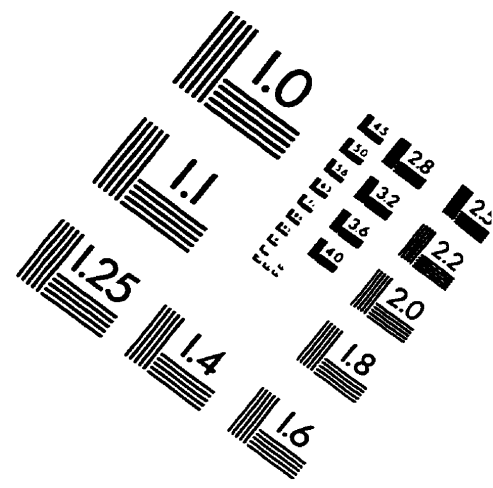
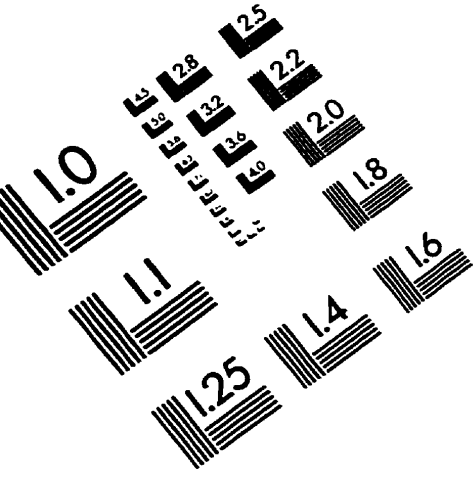


- Tashiro J, Kobayashi J, Shirai K, Saito Y, Nakamura H, Morimoto Y, Yoshida S: Trypsin treatment may impair the interfacial activation of lipoprotein lipase. *J Biochem Tokyo* 111: 509-514, 1992.
- Thannhauser SJ: Lipidoses. In *Diseases of the Intracellular Lipid Metabolism, 3d Ed* Eds. New York, Grune & Stratton, 1985, p. 296.
- The Lipid Research Clinics: The prevalence study - Nutrient intake. In *Population studies data book*. Public Health Service UDoHaHS , Eds. Washington, DC, National Institutes of Health. NIH Publ., 1982.
- Thuren T, Weisgraber KH, Sisson P, Waite M: Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* 31: 2332-2338, 1992.
- Van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C: Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase X-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem* 269: 4626-4633, 1994.
- Verger R: *Pancreatic lipases*. Editor , Eds. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1984.
- Vilaro S, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T: Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization properties of then enzyme by immunofluorescence. *Biochem. J.* 249: 549-556, 1988.
- Vilella E, Joven J: Lipoprotein lipase binding to plasma lipoproteins. *Med Sci Res* 19: 111-112, 1991.
- Von Hodenberg E, Khoo JC, Jensen D, Witztum JL, Steinberg D: Mobilization of Stored Triglycerides from Macrophages as Free Fatty Acids. *Arteriosclerosis* 4: 630-635, 1984.

- Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ: Structure and Functional Properties of Lipoprotein Lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 1-17, 1992.
- Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P: Modulation of lipoprotein lipase by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein CIII. *J Clin Invest* 75: 384-390, 1985.
- Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL: Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267: 13284-13292, 1992.
- Wilson DE, Edwards CQ, Chan IF: Phenotypic heterogeneity in the extended pedigree of a proband with lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism* 32: 1107-1114, 1983.
- Wilson DE, Emi M, Iverius PH, Hata A, Wu LL, Hillas E, Williams RR, Lalouel JM: Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J Clin Invest* 86: 735-750, 1990.
- Wilson DE, Hata A, Kwong LK, Lingam A, Shuhua J, Ridinger DN, Yeager C, Kaltenborn KC, Iverius PH, Lalouel JM: Mutations in exon 3 of the lipoprotein lipase gene segregating in a family with hypertriglyceridemia, pancreatitis, and non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 92: 203-211, 1993.
- Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL: Macrophages and Smooth Muscle Cells Express Lipoprotein Lipase in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10143-10147, 1991.
- Zilversmit DB: Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 3: 473-485, 1979.

Zilversmit DB: Lipid transfer proteins. *J Lipid Res* 25: 1563-1569, 1984.

# IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc  
1653 East Main Street  
Rochester, NY 14609 USA  
Phone: 716/482-0300  
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved