Régulation épigénétique de la lipolyse intravasculaire des triglycérides

Cyrielle Pinkele

▶ **To cite this version:**

Cyrielle Pinkele. Régulation épigénétique de la lipolyse intravasculaire des triglycérides. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10216 . tel-01281354

HAL Id: tel-01281354
https://theses.hal.science/tel-01281354

Submitted on 2 Mar 2016

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

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

N°216-2015 Année 2015

THESE

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

Diplôme de Doctorat
Spécialité Biochimie

Par

Cyrielle PINKELE épouse CAUSSY

Régulation épigénétique de la lipolyse intravasculaire des triglycérides

Directeur de Thèse : Professeur Philippe MOULIN
Co-encadrant : Docteur Sybil CHARRIERE

Soutenue le 27 octobre 2015

JURY

Monsieur le Professeur Philippe MOULIN	Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Marc LACORTE	Rapporteur
Monsieur le Docteur Laurent YVAN-CHARVET	Rapporteur
Monsieur le Professeur Bart STAELS	Examinateur
Monsieur le Professeur Charles THIVOLET	Examinateur
Madame le Docteur Sybil CHARRIERE	Examinateur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

A notre directeur de thèse, le Professeur Philippe MOULIN,

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche. Je vous suis également reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon internat. J'ai apprécié travailler à vos côtés aussi bien dans le cadre de l'exercice clinique que dans celui de la recherche expérimentale. Vous avez su me transmettre votre intérêt pour la recherche en lipidologie. Votre rigueur scientifique et votre ouverture d'esprit représentent un exemple que je m'efforcerai de suivre à l'avenir. Je vous remercie enfin pour vos conseils et votre bienveillance en particulier pour la suite de mon parcours.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au Docteur Sybil CHARRIERE,

Je te remercie très sincèrement d'avoir encadré ce travail avec une grande disponibilité et ta rigueur scientifique. Tu as su me guider et m'accompagner tout en me laissant une autonomie très appréciable qui a assurément contribué à renforcer mon goût pour la recherche scientifique. Je te remercie également pour tes précieux conseils.
Sois assurée de toute ma reconnaissance, de mon respect et de mon amitié.

Aux rapporteurs,

les Professeurs Bertrand CARIOU et Jean-Marc LACORTE et le Docteur Laurent YVAN-CHARVET. Je vous remercie d'avoir accepté de prendre le temps de juger ce travail à travers votre expertise dans le domaine des dyslipidémies. Je vous remercie également de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'en être rapporteurs.
Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aux membres du jury,

Le Professeur Bart STAELS, pour l'intérêt porté à ce travail et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.
Veuillez croire en mon profond respect.

Le Professeur Charles THIVOLET, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse. Je souhaite également vous remercier de la confiance que vous m'accordez en me donnant l'opportunité de rejoindre votre équipe. Je suis également reconnaissante de votre soutien et de votre implication dans la préparation de ma mobilité post-doctorale.
Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas pu être possible,

Au Docteur Christophe MARCAIS, je te remercie d'avoir participé à l'encadrement de ce travail translationelle entre lipidologie et biologie moléculaire et pour ton aide précieuse dans la rédaction des articles.
Sois assuré de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

Au Docteur Hubert VIDAL, directeur du laboratoire CarMeN, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire avec beaucoup de bienveillance. Tout au long de ces années au sein du laboratoire j'ai pu compter sur vos conseils et votre soutien.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au **Professeur Jean DALLONGEVILLE** et au **Docteur MEIRHAEGHE**, pour leur collaboration.

A toute l'équipe du laboratoire CarMen pour leur accueil et leur sympathie et plus particulièrement
Au Docteur Sophie ROME pour avoir encadré mes débuts au laboratoire et de m'avoir transmis ses connaissances sur les microARNs.
Au Docteur Etienne LEFAI pour sa disponibilité et ses précieux conseils.
A Vanessa EUTHINE, pour avoir eu la gentillesse et la patience d'encadrer mes débuts dans le laboratoire et pour sa précieuse aide technique, merci également pour ta disponibilité et ton accueil toujours chaleureux.

A toute l'équipe de Biochimie et Biologie Moléculaire du Centre de Biologie Sud, et plus particulièrement au **Professeur Claire RODRIGUEZ-LAFRASSE** pour m'avoir permis de poursuivre mes travaux à l'occasion d'un stage hors fillière dans son service, **à Micheline MERLIN** pour m'avoir appris avec toute sa bienveillance les bases de la biologie moléculaire et à **Mireille DELAY** pour avoir repris le flambeau.

Aux Docteurs Mathilde DI FILIPPO et **Oriane MARMONTEL,** et à **Marine DANCER** pour votre implication dans l'étude des dyslipidémies ainsi qu'aux praticiens hospitaliers les **Docteurs Myriam MORET et Laure GROISNE.**

Aux internes de l'unité 10 : **Margaux, Sarah, Pauline, Hélène, Cécile, Audrey, Camille**, pour tous ces jeudis…Aux docteurs **Corinne LANGRAND** et **Myriam MORET** pour leur soutien et les CV du jeudi soir.

A ma famille,

A Ravi, merci de ton soutien indéfectible et de continuer l'aventure! Merci pour tous ces moments de bonheur et de joie. Merci de savoir m'épauler comme tu le fais si bien dans les moments les plus difficiles. Avec toute ma gratitude et tout mon amour.

A Neel et Madeleine, vous êtes mes petits amours et assurément notre plus bel accomplissement. Vous êtes ce que nous avons de plus cher, je serai toujours fière de vous.

A mes parents, Papa et Maman, vous m'avez appris à toujours donner le meilleur de moi-même. Merci pour votre soutien dans mes choix. Merci également pour votre aide précieuse avec les enfants. Avec toute mon affection.

A Franck et Nathan, merci tout particulièrement pour ces vacances, c'est promis les prochaines seront moins studieuses !

A ma belle-famille, la distance et le manque de temps ne me permettent pas toujours de partager autant que je le souhaiterai, mais soyez assurée de toute mon affection.

A mes amis, et tout particulièrement

Aux Poupou : **Pascale, Thomas, Gaël et Valentin** merci pour votre havre de paix craurois. Surtout ne changez pas je vous adore !

A Caro, Louis-Charles et Maximillien mes lyonnais préférés !

A Rozemarijn, Sébastien et Charlie mes jalioromains préférés !

Aux thésards de CarMeN et plus particulièrement mes camarades du bureau : **Pierre, Caroline, Vanessa, Emmanuel, Sabrina** et aussi **Jujub** pour leur bonne humeur.

Régulation épigénétique de la lipolyse intravasculaire des triglycérides

Résumé

La Lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme essentielle de la lipolyse intravasculaire dont la régulation est complexe. La découverte des miRs, régulateurs de l'expression post-transcriptionnelle des gènes via leurs interactions avec les régions 3' non traduite (3'UTR), apporte de nouvelles perspectives pour la compréhension de la régulation de la LPL et de ses gènes régulateurs. Nous présentons à travers deux études, l'implication des microARNs (miRs) dans la régulation de la *LPL* et d'un de ses gènes activateurs *APOA5*. Dans le premier travail, nous avons mis en évidence la création d'un site de liaison fonctionnel du miR-485-5p par l'allèle rare C du polymorphisme c.*158C>T (rs22667882) du gène *APOA5*. Nous expliquons ainsi le mécanisme potentiellement impliqué dans l'association de ce polymorphisme aux hypertriglycéridémies sévères et modérées en population générale.

Dans un second travail, nous avons identifié un haplotype de la LPL, incluant la mutation p.Ser474Ter (rs328) et sept single nucleotide polymorphisme (SNPs) de la région 3'UTR, significativement associés à une diminution des triglycérides (TG) plasmatiques en population générale. Nous avons ensuite démontré la fonctionnalité des sept SNPs de la région 3'UTR par la suppression de sites de liaison de plusieurs miRs. Ainsi ces résultats suggèrent que l'association du variant p.Ser474Ter (rs328) à la triglycéridémie pourrait au moins partiellement être liée à son déséquilibre de liaison avec les sept SNPs fonctionnels de la région 3'UTR.

Nos travaux sont parmi les premiers à mettre en évidence l'implication des miRs dans la régulation de la *LPL* et de ses gènes régulateurs chez l'homme. Ils permettent ainsi d'accroitre la connaissance des mécanismes impliqués dans la régulation de la lipolyse intravasculaire. Enfin, ils éclairent les mécanismes fonctionnels mis en jeu par deux polymorphismes significativement associés à la triglycéridémie.

Mots clés : LPL, microARN, lipolyse intravasculaire, triglycérides, polymorphisme, APOA5

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

Unité 1060 INSERM CarMeN/INRA 1397 (H. VIDAL)

Faculté de Médecine LYON SUD- BP 12

F - 69921 OULLINS CEDEX

Epigenetic regulation of intravascular triglyceride lipolysis

Summary

The lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme which regulates plasma triglycerides (TG) intravascular lipolysis involving a complex regulation. The microRNAs (miR) are implicated in gene post-transcriptional regulation through their interaction with the 3'untranslated region (3'UTR). Their discovery provides new insights in the understanding of the *LPL* regulation and its regulator genes. We present two works regarding the implication of miRs in the regulation of the *LPL* and one of its activator *APOA5*.

First, we identified a functional miR-485-5p binding site creation induced by the minor C allele of the c.*158C>T (rs22667882) located in *APOA5* 3'UTR.We therefore provide an explanation of the mechanism potentially involved in this polymorphism association with both mild and severe hypertriglyceridemia in general population.

In a second work, we identified a LPL haplotype harboring p.Ser474Ter (rs328) polymorphism and seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 3'UTR. This haplotype is significantly associated with lower plasma triglycerides (TG) concentration in general population. We demonstrated that the SNPs located in the 3'UTR induce several functional miRs binding-site suppressions that could lead to an increase of LPL expression. Finally, p.Ser474Ter association with triglyceridemia could be at least partially explained by its strong linkage disequilibrium with these functional 3'UTR SNPs.

These works are amongst the first studies to bright to light the miRs implication in the regulation of LPL or its regulator genes in human. They provide a better knowledge of the mechanisms involved in intravascular lipolysis. Finally, they also explain the functional mechanisms of two polymorphisms, significantly associated with the plasma TG concentration.

Key words : LPL, microRNA, intravascular lipolysis, triglyceride, polymorphisms, APOA5

Table des matières

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION **16**

1 PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET ENJEUX DU TRAVAIL **18**

1.1 RAPPEL DU METABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES 19

1.1.1 Synthèse et métabolisme des chylomicrons *19*

1.1.1.1 Synthèse des chylomicrons 20

1.1.1.1.1 Absorption, synthèse et sécrétion des composants des chylomicrons dans les entérocytes 20

1.1.1.1.2 Formation des chylomicrons 20

1.1.1.2 Métabolisme des chylomicrons 21

1.1.2 Synthèse et métabolismes des VLDL *21*

1.1.2.1 Synthèse des VLDL 21

1.1.2.2 Métabolisme des VLDL 22

1.2 LIPOLYSE INTRAVASCULAIRE DES LIPOPROTEINES RICHES EN TRIGLYCERIDES 24

1.2.1 Lipoprotéine lipase (LPL) *24*

1.2.1.1 Expression de la LPL 24

1.2.1.2 Structure de la LPL 25

1.2.1.3 Domaines fonctionnels de la LPL 27

1.2.1.4 Régulation l'expression de la LPL 28

1.2.1.4.1 Régulation de la LPL dans le tissu adipeux 28

1.2.1.4.1.1 Régulation nutritionnelle de la LPL 29

1.2.1.4.1.1.1 Régulation transcriptionelle de la LPL 29

1.2.1.4.1.1.2 Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle 29

1.2.1.4.1.2 Autres facteurs de régulation dans le tissu adipeux 29

1.2.1.4.2 Régulation de la LPL dans le muscle squelettique 30

1.2.1.4.2.1 Régulation nutritionnelle 30

1.2.1.4.2.2 Régulation par l'exercice 30

1.2.1.4.3 Régulation dans les autres tissus 30

1.2.1.5 Polymorphismes de la LPL associés à la triglycéridémie 31

1.2.1.5.1 Mutations délétères du gène la LPL 31

1.2.1.5.2 Polymorphismes associés à la triglycéridémie 32

1.2.1.5.2.1 Polymorphismes des régions codantes de la LPL 32

1.2.1.5.2.1.1 c.106G>A (D9N, rs1801177) 32

1.2.1.5.2.1.2 c.953A>G (N291S, rs268) 33

1.2.1.5.2.1.3 c.1421C>G (p.Ser474Ter, S447X, rs328) 34

1.2.1.5.2.2 Polymorphismes des régions non codantes de la LPL 36

1.2.1.5.2.2.1 Région promotrice 36

1.2.1.5.2.2.2 Régions introniques 37

1.2.1.5.2.2.2.1 c.1322+483T>G (HindIII, rs320) 37

1.2.1.5.2.2.2.2 c.1323-90T>G (rs327) 38

1.2.1.5.2.2.2.3 c.*1671T>C (rs13702) 39

1.2.1.5.2.2.2.4 c.*1742T>C rs1059611 39

1.2.1.5.2.2.2.5 NG_008855.1:g.34792G>A rs2197089 39

1.2.2 Protéines régulatrices de la LPL et leurs déterminants génétiques *42*

1.2.2.1 Lipase Maturation Factor 1 LMF1 ... 43
1.2.2.1.1 Polymorphismes de LMF1 ... 44
1.2.2.2 GPIHBP1 ... 46
1.2.2.2.1 Polymorphismes de GPIHBP1 ... 47
1.2.2.2.2 Mutations délétères de GPIHBP1 ... 48
1.2.2.2.3 Polymorphismes de GPIHBP1 associés à la triglycéridémie ... 48
1.2.2.2.3.1 c.-469G>A ... 48
1.2.2.2.3.2 c.41G>T (C14F) ... 49
1.2.2.2.3.3 c.106 C>T L11F et c.352 A>G I93V ... 49
1.2.2.3 Les Apolipoprotéines ... 51
1.2.2.3.1 Apolipoprotéine A-V (ApoA-V) ... 51
1.2.2.3.1.1 Polymorphismes d'APOA5 ... 52
1.2.2.3.1.1.1 Polymorphismes communs d'APOA5 ... 53
1.2.2.3.1.1.1.1 Haplotype APOA5*3 ... 54
1.2.2.3.1.1.1.2 Haplotype APOA5*2 ... 54
1.2.2.3.1.1.2 Mutations rares associées aux hypertriglycéridémies ... 55
1.2.2.3.1.1.2.1 Mutations non-sens d'APOA5 ... 55
1.2.2.3.1.1.2.2 Les délétions partielles d'APOA5 ... 56
1.2.2.3.1.1.2.3 Mutations faux-sens d'APOA5 ... 57
1.2.2.3.1.1.2.4 Mutations des sites d'épissage ... 58
1.2.2.3.2 Apolipoprotéine C-III (ApoC-III) ... 59
1.2.2.3.2.1 Polymorphismes d'*APOC3* ... 61
1.2.2.3.2.1.1 Mutations perte de fonction ... 61
1.2.2.3.2.1.2 Polymorphismes associés aux hypertriglycéridémies ... 63
1.2.2.3.2.1.3 Haplotype et déséquilibre de liaison ... 64
1.2.2.3.3 Apolipoprotéine C-II (ApoC-II) ... 65
1.2.2.3.3.1 Polymorphismes d'*APOC2* ... 65
1.2.2.3.3.1.1 Mutations délétères d'APOC2 ... 65
1.2.2.3.3.1.2 Mutations associées aux hypertriglycéridémies ... 66
1.2.2.3.4 Apolipoprotéine C-I (ApoC-I) ... 68
1.2.2.3.4.1 Polymorphismes d'*APOC1* ... 68
1.2.2.3.5 La famille des protéines angiopoïétine like (ANGPTL) ... 69
1.2.2.3.5.1 Angiopoietin proteine-like 4 (ANGPTL4) ... 69
1.2.2.3.5.1.1 Polymorphismes d'*ANGPTL4* ... 70
1.2.2.3.5.1.1.1 Mutation délétère c.118G>A (E40K) ... 70
1.2.2.3.5.1.1.2 Mutations rares ... 70
1.2.2.3.5.1.1.3 Polymorphismes associés à la triglycéridémie ... 71
1.2.2.3.5.2 Angiopoietin proteine-like 3 (ANGPTL3) ... 71
1.2.2.3.5.2.1 Polymorphismes d'ANGPTL3 ... 72
1.2.2.3.5.2.1.1 Mutations perte de fonction ... 72
1.2.2.3.5.2.1.2 Mutations rares ... 73
1.2.2.3.5.2.1.3 SNPs associés à la triglycéridémies ... 73
1.2.2.3.5.3 Angiopoietin proteine-like 8 (ANGPTL8) ... 74
1.2.2.3.5.3.1 Polymorphismes d'*ANGPTL8* ... 75
1.2.3 Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière des capillaires ... 75
1.2.4 Margination des LRTG ... 76
1.2.5 Hydrolyse des LRTG ... 76
1.2.6 Défaut de lipolyse intravasculaire et hyperchylomicronémies ... 76
1.3 REGULATION EPIGENETIQUE ... 78
1.3.1 La méthylation de l'ADN ... 79
1.3.2 Modification des histones (chromatine) ... 79
1.3.3 Interaction avec les ARN non codants ... 80
1.3.3.1 Les MicroARNs ... 81
1.3.3.1.1 Classification et nomenclature des microARNs. ... 81

1.3.3.1.2 Les gènes des microARN 82
1.3.3.1.3 Biogénèse des miRNA 82
1.3.3.1.3.1 La transcription du microARN primaire 82
1.3.3.1.3.2 Maturation nucléaire en pré-microARN 83
1.3.3.1.3.3 Maturation cytoplasmique 83
1.3.3.1.4 Régulation de l'expression des microARNs 85
1.3.3.1.4.1 Régulation transcriptionnelle 85
1.3.3.1.4.2 Régulation épigénétique 85
1.3.3.1.4.3 Les isoformes de miR 86
1.3.3.1.4.4 Stabilité des miRs 87
1.3.3.1.5 Rôle et mécanisme d'action des miRs 87
1.3.3.1.5.1.1 Liaison sur ARNm cible 87
1.3.3.1.5.1.2 Mécanisme d'action des miRs 89
1.3.3.1.5.1.2.1 Inhibition de la traduction 89
1.3.3.1.5.1.2.1.1 Inhibition de l'initiation de la traduction 89
1.3.3.1.5.1.2.1.2 Inhibition de l'élongation de la traduction. 90
1.3.3.1.5.1.2.2 Activation de la traduction des ARNm par les miRs 90
1.3.3.1.5.1.3 Localisation de l'activité des miRs : la compartimentation 91
1.3.3.2 Rôles physiologiques des miRNA et leur implication dans le métabolisme lipidique 92
1.3.3.2.1 Rôles physiologiques des miRs 92
1.3.3.2.2 MicroARN et métabolisme lipidique 93
1.3.3.2.2.1 Métabolisme du HDL cholestérol 93
1.3.3.2.2.1.1 microARN et efflux du cholestérol 93
1.3.3.2.2.1.2 Recapture hépatique des HDL 95
1.3.3.2.2.1.3 Synthèse du cholestérol et oxydation des AG hépatique 95
1.3.3.2.2.2 MicroARN régulant la LPL 96
1.3.3.3 Implication des polymorphismes dans l'interaction miR avec leur gène cible 96
1.4 CONCLUSION DE LA REVUE DE LA LITTERATURE ET ENJEUX DU TRAVAIL 98

2 DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DES TRAVAUX 100
2.1 ARTICLE 1 : " AN APOA5 3'UTR VARIANT ASSOCIATED WITH PLASMA TRIGLYCERIDES TRIGGERS *APOA5* DOWNREGULATION BY CREATING A FUNCTIONAL MIR-485-5P BINDING SITE" 101
2.2 ARTICLE 2 : "MULTIPLE MICRORNA REGULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE GENE ABOLISHED BY 3'UTR POLYMORPHISMS IN A TRIGLYCERIDE-LOWERING HAPLOTYPE WITH P.SER474TER" 116

3 DISCUSSION 153
3.1 IMPORTANCE DES POLYMORPHISMES DES GENES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA LIPOLYSE INTRAVASCULAIRE 153
3.2 AUTRES GENES OU POLYMORPHISMES POTENTIELLEMENT REGULES PAR LES MICROARNS 154
3.2.1 APOC3 ..... *154*
3.2.2 ANGPTL 3 et 4 ..... *154*
3.2.3 GPIHBP1, LMF1, APOC2, APOC3 ..... *155*
3.3 IMPLICATION DES POLYMORPHISMES DANS L'ACCESSIBILITE DES MIRS POUR LEURS CIBLES 155
3.3.1 Hypothèse de régulation de l'APOA5 par plusieurs microARN *156*
3.3.2 Implication des structures secondaires de l'ARNm dans la liaison des miRs. *157*
3.4 REGULATION PHYSIOLOGIQUE DE LA LPL PAR LES MICROARNS 160
3.4.1 Différentiation et régulation tissu-spécifique de la LPL par de multiples microARNs. *160*
3.4.2 Les miRs : possibles acteurs de la régulation nutritionnelle de l'activité LPL ? *160*
3.4.3 miR-29a, LPL et insulino-résistance *162*
3.5 PERSPECTIVES DE THERAPEUTIQUE ANTI-MIR 162
3.5.1 Exemple de traitement anti-miR : miravirsen *162*
3.5.2 Anti-miR-33 et HDL-cholestérol *163*

3.5.3 Perspectives de traitement anti-miR des hypertriglycéridémies 163
3.5.3.1 Inhibition du miR-29 163
3.5.3.2 Inhibition du miR-410 164
3.5.3.3 Inhibition du miR-485-5p 164
4 CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 165
5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 167
6 ANNEXES 194

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Métabolisme des lipoprotéines riche en triglycérides d'après (4)..... 23

Figure 2 Structure de la LPL adaptée de (35)..... 26

Figure 3 Régulation physiologiquede l'activité de la LPL dans différents tissus d'après (3)..... 31

Figure 4 Polymorphismes de la LPL significativement associés à la triglycéridémie 40

Figure 5 Protéines régulatrices de la Lipoprotéines Lipase..... 42

Figure 6 Structure et mutations délétères de LMF1 d'après (157)..... 44

Figure 7 Polymorphismes de LMF1 associé aux hypertriglycéridémies d'après (159) 45

Figure 8 Structure de GPIHBP1 d'après (163)..... 47

Figure 9 Polymorphismes de GPIHBP1 associés à la triglycéridémie..... 49

Figure 10 Structure d'ApoA-V d'après (197) 52

Figure 11 Mutations du gène APOA5 adaptée de (253) 59

Figure 12 Mutations perte de fonction APOC3 adapté de (281)..... 63

Figure 13 Mutations du gène ANGPTL4 associées à la triglycéridémie d'après (384)..... 71

Figure 14 Mutations rares d'ANGPTL3 associées à la triglycéridémie d'après (388). 73

Figure 15 Régulation épigénétique adaptée de (425)..... 78

Figure 16 Séquence du pré-miR-29a et séquence des miRs matures issus de ce pré-miR. 82

Figure 17 Biogénèse des microARNs adaptée de (468)..... 84

Figure 18 Séquence de liaison d'un microARN sur son ARNm cible ou séquence « seed »..... 88

Figure 19 Inhibition de la traduction par les miRs adaptée d'après (514)..... 91

Figure 20 Exemple de modification du site de liaison du miR-410 induite par le SNP rs13702 (140) 97

Figure 21 Hypothèse de régulation de l'haplotype 2 d'APOA5 par les microARNs..... 157

Figure 22 Prédictions des structures secondaires de l'ARN des Haplotype 1 et 4 de la LPL. 159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Polymorphismes intergéniques de la LPL associés à la concentration de triglycérides 41

Tableau 2 Mutations délétères de GPIHBP1 responsable d'hyperchylomicronémies 50

Tableau 3 Principaux haplotypes du gène APOA5 53

Tableau 4 Polymorphismes d'APOA5 associés aux hypertriglycéridémies 54

Tableau 5 Polymorphismes d'APOC3 associés aux hypertriglycéridémies..... 64

Tableau 6. Mutation du gène APOC2 associé aux hypertriglycéridémies 67

Tableau 7 Mutation d'ANGPTL3 engendrant une hypolipémie combinée familiale. 72

Tableau 8 SNPs associés d'ANGPTL3 associés à la triglycéridémie 74

Tableau 9 Les microARNs impliqués dans la régulation du HDLc 94

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminé

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ADAR : Adenosine Deaminase Acting on RNA

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANGPTL : Angiopoïétine like

Apo : Apolipoprotéine

Apobec-1 : ApoB editing complex catalytic subunit 1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ATP : Adénosine tri-phosphate

C : Cytosine

CAA : Glutamine

CETP : Cholesteryl Ester Transfert Protein

CPT : Carnitine palmitoyl transferase

DAG : Diacyglycérol

DNMT : DNA méthyltransférases

DsRBD : Double-strand RNA-Binding Domain

EMSA : Electrophoretic mobility shift assay

FABP : Fatty Acids Binding Protein

GPIHBP1 : Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1

GTP : Guanosine triphosphate

GWAS : Genome Wide Asssociation Study

HDL : High Density Lipoprotein

HDL-c : Cholestérol des HDL

HGVS : Human Genome Variation Society

HSPG : Héparane sulfate protéoglycanes

HTG : Hypertriglycéridémie

IC : Intervalle de confiance

IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire

INSIG1 : Insulin-induced gene 1

ko : knock out

LDL : Low density lipoprotein

LDL-c : LDL cholestérol

LDL-R : Récepteur de LDL

LH : Lipase hépatique

LPL : Lipoprotéine Lipase

LMF1 : Lipoprotein Maturation Factor 1

LRP : Low density lipoprotein receptor-related protein

LRTG : Lipoprotéines riches en triglycérides

miR : MicroARN

miRISC : MiRNA-mediated-Silencing-Complex

MTTP : Microsomal Triglyceride Transfert Protein

NTG : Normo-triglycéridémique

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptors

PG-VTV : Post TGN VLDL transport vesicle

SR-BI : Scavenger receptor B-I

SREBP : Sterol regulatory element-binding proteins

SNP : Single nucleotide polymorphism

RE : Réticulum endoplasmique

TG : Triglycéride

TNF : Tumor Necrosis Factor

TUT : Terminal uridylyltransferase

U : Uracile

UTR : Région non traduite (untranslated region)

VHC : Virus de l'hépatite C

VLDL : Very low density lipoprotein

WT : Wild type

Introduction

La lipoprotéine lipase est une enzyme essentielle du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) correspondant aux chylomicrons et VLDL (very low density lipoprotein ou lipoprotéines de très basse densité). Elle est responsable de la lipolyse intravasculaire permettant l'hydrolyse des triglycérides (TG) contenus dans les LRTG dans la circulation périphérique pour la libération des acides gras libres ensuite utilisés comme source d'énergie dans les tissus périphériques ou stockés dans le tissu adipeux (1). Cette enzyme est soumise à des processus de régulation complexes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Plusieurs protéines inhibitrices ou activatrices telles que ApoC-II, ApoC-III, ApoA-V, GPIHBP1, LMF1 ou encore ANGPTL 3, 4 ou 8, régulent également la LPL (2,3). Les mutations délétères de la LPL ou de ces gènes activateurs sont responsables d'hyperchylomicronémies liées à un défaut d'activité LPL (4). D'autres variants ou SNPs (single nucleotide polymorphism), de la LPL ou de ces gènes régulateurs, sont également significativement associés aux concentrations de TG plasmatiques suggérant leur implication dans la régulation de l'activité LPL et donc de la lipolyse intravasculaire (5,6). Cependant les mécanismes expliquant ses associations sont rarement élucidés. Nous avons émis l'hypothèse d'une possible implication des microARNs (miRs) dans la fonctionnalité de certains de ces polymorphismes.

Les miRs sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides capables de se lier aux séquences 3'non traduite (3'UTR) des ARN messager (ARNm). Ils en régulent ainsi l'expression de manière post-transcriptionnelle par clivage de l'ARN ou par répression de leur traduction (7). Le mécanisme de reconnaissance entre le miR et son ARNm cible implique une petite séquence complémentaire d'environ 7 nucléotides seulement (8). En raison de la petite taille de cette séquence, un SNP localisé dans le site de reconnaissance du miR ou de l'ARNm peut induire soit une suppression ou une création de site de liaison de miR (9).

Ainsi, les miRs sont des régulateurs potentiels de l'expression de la LPL ou de ses gènes régulateurs. L'étude de l'interaction entre les miRs et SNPs de ces gènes, significativement associés à la triglycéridémie, nous a semblé être un moyen pertinent de déterminer l'implication des miRs dans la régulation de la lipolyse intravasculaire. Nous présentons à travers deux études, l'implication des miRs dans la régulation de la LPL et d'un de ses gènes activateurs *APOA5*.

Ce travail présentera dans une première partie, des rappels bibliographiques détaillant la lipolyse intravasculaire ainsi que la revue de la littérature des variants de la *LPL* et de ses régulateurs significativement associés à la triglycéridémie. Nous détaillerons également la régulation épigénétique médiée par les miRs. La deuxième partie comportera la présentation des travaux expérimentaux à travers deux études consacrées à l'interaction des SNPs d'*APOA5* et *LPL* avec les sites de liaison de miRs. Nos résultats seront ensuite discutés dans une troisième partie.

1 Première partie :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ET

ENJEUX DU TRAVAIL

1.1 RAPPEL DU MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES RICHES EN TRIGLYCÉRIDES

Les triglycérides (TG) représentent l'une des principales réserves d'énergie de l'organisme. Afin de permettre le transport des TG non solubles dans la circulation périphérique, ces derniers sont associés à des phospholipides et des apolipoprotéines qui sont des protéines amphipathiques. Il est ainsi formé des particules solubles : les lipoprotéines ayant pour rôle d'assurer le transport des lipides (TG et cholestérols) non solubles depuis leurs sites de synthèse ou production jusqu'aux tissus périphériques. Les lipoprotéines riches en triglycérides (LRTG) sont constituées principalement des chylomicrons et des VLDL. Les chylomicrons sont synthétisés dans l'intestin et assurent le transport des TG d'origine alimentaire ou exogène. Les VLDL sont synthétisées et sécrétées dans le foie et assurent le transport des TG d'origine endogène (10). La triglycéridémie est le reflet des concentrations des LRTG circulantes résultant de la balance entre leur synthèse et leur dégradation.

Nous rapellerons brièvement les différentes étapes de la synthèse et du métabolisme des LRTG ; puis, nous développerons en détails les mécanismes de leur catabolisme lors de la lipolyse intravasculaire des LRTG qui fait l'objet de nos travaux.

1.1.1 Synthèse et métabolisme des chylomicrons

Les chylomicrons sont les plus grosses lipoprotéines de la circulation périphérique (100-500 nm de diamètre) mais elles ont une faible densité (<0,93 g/ml). Ils sont constitués principalement de TG, environ 90%, et d'une faible quantité d'esters de cholestérols, seulement 1 à 3%. Ils contiennent également des phospholipides et sont entourés d'une enveloppe constituée de plusieurs apolipoprotéines : ApoB-48, ApoA-I, ApoA-IV. Ils acquièrent secondairement l'apoE et les apoC-I, C-II, C-III, ApoA-V provenant des HDL dans la circulation périphérique. Ils permettent le transport des lipides apportés par l'alimentation.

1.1.1.1 Synthèse des chylomicrons

1.1.1.1.1 Absorption, synthèse et sécrétion des composants des chylomicrons dans les entérocytes

Les lipides d'origine alimentaire sont hydrolysés par la lipase pancréatique après leur émulsification par les sels biliaires produits par la vésicule biliaire dans la lumière intestinale. Les acides gras libres ainsi libérés rentrent dans la cellule intestinale selon deux mécanismes distincts. Ils peuvent diffuser à travers la membrane des entérocytes lorsque leur concentration intracellulaire est inférieure à leur concentration extracellulaire. Dans le cas contraire, leur absorption est médiée par des protéines membranaires spécifiques de la famille des FABP (Fatty Acids Binding Protein). Dans le réticulum endoplasmique (RE) des entérocytes, les monoacylglycérols sont estérifiés avec les acides gras par la monoacylglycérol transférase en diacylglycérol (DAG) (11) (Figure 1).

1.1.1.1.2 Formation des chylomicrons

La synthèse des chylomicrons dans les cellules épithéliales intestinales est complexe et se compose de plusieurs étapes. Elle dépend également de la capacité des entérocytes à synthétiser l'ApoB-48. En effet, l'ApoB est synthétisée sous forme d'ApoB-100 dans le foie et d'ApoB-48 dans l'intestin. Ainsi chaque particule de chylomicrons, issue des entérocytes, contient une molécule d'ApoB-48 alors qu'une particule de VLDL, synthétisée par les hépatocytes, contient une molécule d'ApoB-100. L'ApoB-48 et l'ApoB-100 sont codés par un le même gène *APOB* et issu d'un ARNm identique. Dans les entérocytes, cet ARNm subit un processus original d'édition : une cytosine (C) sur le codon CAA (Glutamine) de l'ARNm est transformé par désamination en uracile (U) par un complexe enzymatique contenant l'apobec-1 (ApoB editing complex catalytic subunit 1). Ce changement induit la formation d'un codon STOP responsable d'une ApoB tronquée ne contenant que 48% des acides aminés (AA) soit les 2152 premiers AA de l'apoB-100 (4536 AA) (10,12).

L'assemblage des chylomicrons débute dans le réticulum endoplasmique des entérocytes (13,14). Il dépend de l'enzyme MTTP (Microsomal Triglyceride Transfert Protein) qui permet l'expansion du « core » de lipoprotéines et interagit avec l'ApoB-48. L'ajout de l'ApoA-IV à la surface des particules contenant l'ApoB48, maintient les pre-chylomicrons dans le RE et facilite ensuite son transport en dehors du RE vers le Golgi (15).

Dans le Golgi, l'ApoB-48 des chylomicrons est glycosylée, la composition des lipides est modifiée, l'ApoA-I est incorporée (16–18). Puis les chylomicrons sont sécrétés dans la lamina propria intestinale par exocytose de la membrane basolatérale des entérocytes (13,14) (Figure1).

1.1.1.2 Métabolisme des chylomicrons

En période post-prandiale, l'absorption des lipides d'origine alimentaire conduit à la sécrétion des chylomicrons par l'intestin grêle (duodénum et jéjunum) dans la circulation lymphatique mésentérique qui rejoint ensuite la circulation générale. La demi-vie des chylomicrons est très courte de l'ordre de quelques minutes. Les TG des chylomicrons sont ensuite hydrolysés par la lipoprotéine lipase libérant des chylomicrons appauvris en TG ou remnants de chylomicrons. Les remnants de chylomicrons sont alors captés par le foie après liaison de l'apoE au LRP1 ou au récepteur des LDL (LDL-R) (Figure 1) (10,19).

1.1.2 Synthèse et métabolismes des VLDL

Les VLDL sont des lipoprotéines de 30 à 80 nm de diamètre, composées d'une molécule d'ApoB-100 et de multiples copies d'autres apolipoprotéines (ApoE, ApoC). La quantité de TG et de cholestérol des VLDL est variable et dépend de la taille des particules. Les VLDL sont synthétisées par le foie en incorporant les triglycérides provenant soit de la capture des acides gras liés à l'albumine ou des acides gras des triglycérides issu des remnants de chylomicrons et de VLDL, ou bien de la lipogénèse ou synthèse de novo hépatique (20).

1.1.2.1 Synthèse des VLDL

Les mécanismes de la synthèse des VLDL sont mal connus, les données actuelles sont en faveur de deux étapes distinctes dont la première débute dans le RE des hépatocytes (21–23). Cette étape correspond à la lipidation de l'ApoB qui se poursuit ensuite indépendamment d'ApoB par la fusion avec une gouttelette lipidique contenant l'ApoC-III qui est la source principale des lipides pour l'assemblage des VLDL (23,24). Lorsque la lipidation et le repliement des VLDL sont corrects, les particules peuvent être exportées vers le Golgi sous

forme de VLDL2 où la maturation des VLDL se poursuit (22). L'ApoB100 y subit une glycosylation, une phosphorylation, et un changement de conformation (25–27). L'ApoE et l'ApoA-1 sont également ajoutées aux VLDL dans ce compartiment (26,28). Les VLDL2 peuvent être sécrétées directement, ou subirent une nouvelle étape de lipidation. Elle conduit à la formation de VLDL1, plus riches en triglycérides, en particulier en présence d'acides gras et d'acide oléique (29). Les VLDL sont enfin exportées vers la membrane plasmique (transport antérograde) dans des vésicules spécifiques les PG-VTV (post TGN VLDL transport vesicle) dont la formation est dépendante de la présence de GTP (28).

1.1.2.2 Métabolisme des VLDL

En période post prandiale, la production hépatique de VLDL est stimulée par les acides gras libres captés par le foie après un repas riche en lipides. Ces acides gras peuvent également être libérés par le tissu adipeux à jeun. Les VLDL ainsi formées sont constituées de TG, de cholestérol, de l'ApoB-100, de l'ApoE et de faibles quantités d'ApoC. Au cours de leur métabolisme, elles vont acquérir à partir des HDL des ApoC et de l'ApoE mais aussi des esters de cholestérol, échangés contre des TG sous l'action de la CETP (Cholesteryl Ester Transfert Protein). Dans la circulation, les VLDL sont rapidement hydrolysées par la LPL pour libérer des IDLs contenant de l'ApoB-100, de l'ApoE mais peu d'ApoC. Ces IDLs sont ensuite transformées en LDL par la lipase hépatique. Pendant la conversion des IDL en LDL, la majorité de l'apoE et de l'apoC vient s'associer aux HDL. Les LDL ainsi formées contiennent alors majoritairement l'apoB-100. Environ 50 % des VLDL sont transformées en LDL ; le reste est capté par le foie sous forme de remnants de VLDL ou d'IDL grâce à la liaison de l'apoE au LDL-R ou au LRP1 (Figure 1) (10).

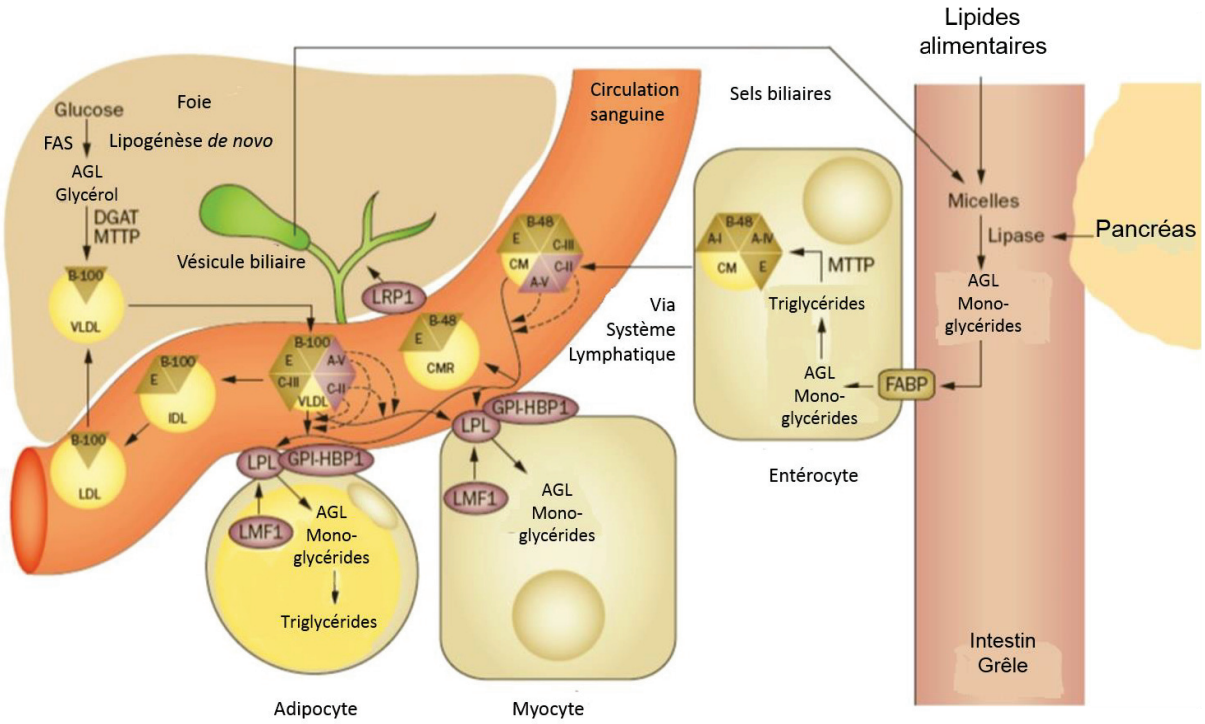


Figure 1 Métabolisme des lipoprotéines riche en triglycérides d'après (4)

AGL : acides gras libres, CM : chylomicrons, B-100 : ApoB-100, B-48 : ApoB-48, E : ApoE, A-V : ApoA-V, C-II : ApoC-II, C-III : ApoC-III.

1.2 LIPOLYSE INTRAVASCULAIRE DES LIPOPROTÉINES RICHES EN TRIGLYCÉRIDES

Le catabolisme des LRTG (chylomicrons et VLDL) a lieu dans la circulation périphérique. Il s'agit de la lipolyse intravasculaire médiée par la LPL. Le substrat préférentiel de la LPL est l'une des liaisons ester primaires des triglycérides. L'hydrolyse de ces substrats génère des acides gras libres et du 2-monoacylglycérol qui seront utilisés de différente manière en fonction des tissus périphériques. Dans le tissu adipeux blanc, ils seront re-estérifiés pour être stocker sous forme d'énergie en triglycérides, ils peuvent être oxydés pour être utilisés comme source d'énergie dans le cœur et les muscles squelettiques ou encore servir de régulateurs de thermogénèse dans le tissu adipeux brun (1).

1.2.1 Lipoprotéine lipase (LPL)

La lipoprotéine lipase représente l'enzyme principale de la lipolyse intravasculaire. Elle est un membre de la « superfamille des lipases » qui inclut la lipase hépatique, la lipase pancréatique, la lipase endothéliale et les Drosophilia yolk protéines 1, 2 et 3 (30).

Le gène *LPL* est localisé sur le chromosome humain 8p22. Ce gène est composé de 10 exons, correspondant à environs 30kb. Le premier exon code pour la région 5'UTR (untranslated region), le peptide signal correspondant aux 27 premiers acides aminés et les 2 premiers acides animés de la protéine mature. Les huit exons suivant codent pour les 446 acides aminés restant. Le dernier et dixième exon code pour la région 3'UTR qui est relativement longue : 1948 nucléotides (31).

La LPL (glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.34) est ainsi composée de 475 acides aminés et la LPL mature de 448 acides aminés après la perte du peptide signal. Elle correspondant à une protéine mature de 55 kDa.

1.2.1.1 Expression de la LPL

La LPL est synthétisée dans de nombreux tissus principalement par les adipocytes et les myocytes et plus accessoirement par la glande mammaire, les macrophages, les ovaires,

les glandes surrénales, certaines cellules neurologiques, l'aorte thoracique, la rate, l'intestin, et les testicules (1,32). Les poumons ne synthétisent pas la LPL mais sont capables de la capter depuis la circulation (33).

L'expression de la LPL dépend également du stade de développement. Par exemple la LPL est synthétisée par les hépatocytes uniquement durant la période fœtale, puis sa synthèse hépatique est interrompue après la naissance. Des études ont également montré une modification de l'expression de la LPL au sein d'un tissu en fonction du stade de développement. Par exemple, chez le rat, la LPL est majoritairement exprimée dans les cellules mésenchymateuses cardiaques en période néonatale, alors que les cardiomyocytes sont la principale source de LPL chez les adultes (32).

La forme active de la LPL est localisée à la surface de l'endothélium où elle est liée par GPIHBP1 et les héparane sulfate protéoglycanes (HSPG) (2).

1.2.1.2 Structure de la LPL

La structure tridimensionnelle de la LPL a été déduite de celle de la lipase pancréatique (34). La LPL est organisée en deux régions structurellement distinctes : la partie N-terminale de la protéine mature, correspondant aux résidus 28 à 339* premiers acides aminés et le domaine C-terminal, plus court, correspondant aux résidus en position 340 à 475*. Ces deux régions sont connectées par un peptide flexible (35). La partie amino-terminale (N-terminale) contient le domaine catalytique constituée de la triade catalytique Ser^{159}-Asp^{183}-His^{268}* responsable de la lipolyse. Le domaine C-terminal est impliqué dans la liaison spécifique avec les substrats lipidiques. Il contient également un domaine de liaison à l'héparine (résidus en position 430-434*), situé en aval du site de liaison au substrat lipidique (résidus 319 à 331*) (35) (Figure 2). La LPL est sécrétée sous sa forme active qui correspond à un homodimère constitué de deux monomères de LPL avec une orientation « en tête-bèche » (Figure 2).

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

La liaison de l'homodimère est non covalente, et la capacité des cellules à sécréter les homodimères de LPL dépend d'une protéine située sur la membrane du réticulum endoplasmique : Lipase maturation factor 1 (LMF) (36). En l'absence de LMF1, la LPL ne peut former d'homodimère et elle est dégradée dans la cellule (37) détaillé ci-après (*cf* 1.2.2.2.1.1).

La LPL est une protéine N-glycosylée sur les résidus Asn^{70}* et Asn^{286}*. L'Asn^{70}* est crucial pour la sécrétion de la LPL, alors que l'Asn^{286*} l'est moins (38,39). Ces résidus N-glycosylés pourraient jouer un rôle de stabilisateur de l'homodimère de la LPL mais d'autres séquences sont également nécessaire (40,41). La séquence permettant la liaison directe entre les monomères de LPL est à ce jour non élucidée. Les monomères de LPL interagissent de manière coopérative pour l'hydrolyse des triglycérides. L'activité LPL est donc déterminée par l'interaction du substrat présenté par le domaine de liaison aux lipides d'un monomère et le site catalytique du monomère partenaire (42,43) (Figure 2). La dissociation des dimères conduit à une inactivation irréversible de l'enzyme (44) et une modification de la conformation du monomère. Cette inactivation est prévenue par la présence d'héparane sulfate et d'héparine (45).

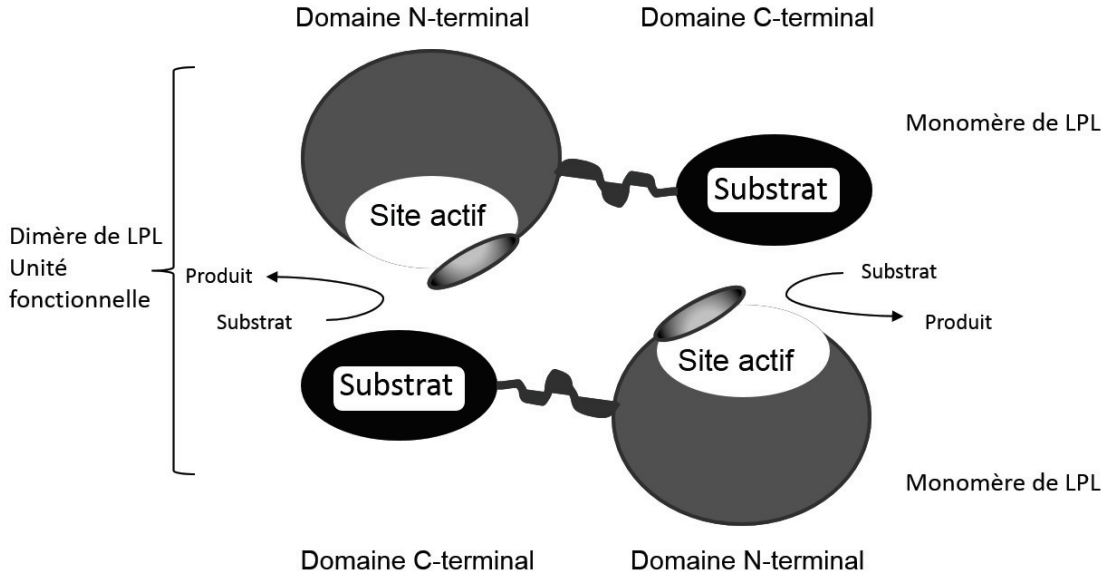


Figure 2 Structure de la LPL adaptée de (35)

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

1.2.1.3 Domaines fonctionnels de la LPL

Plusieurs domaines fonctionnels ont été identifiés et permettent de relier la structure de la LPL à ses fonctions (revus dans (1,46)). Le site actif de la LPL humaine est localisé dans la région N-terminale et comprend la triade catalytique composé des résidus Ser^{159}-Asp^{183}-His^{268}*, un trou oxyanion (Trp^{82}, Leu^{160*}), et une structure boucle (résidus 81 à 91*) /couvercle (résidus 243 à 266*) (34,35,38). Lorsque le substrat lipidique se lie au domaine C-terminal d'un des monomères, il est présenté au centre catalytique du monomère partenaire pour être hydrolysé. Le substrat ainsi lié induit une modification conformationnelle responsable de l'ouverture du couvercle qui recouvre le site catalytique et active ainsi la catalyse (35).

Plusieurs sites de liaison au substrat ont été identifiés dans le domaine C-terminal. Deux régions sont cruciales pour la liaison au substrat : trois tryptophanes (Trp^{417}-Trp^{420}-Trp^{421*}) (47) et les résidus 442-465* correspondant respectivement à deux étirements de 3 et 6 résidus hydrophobes. Cette région est également impliquée dans la stabilité des homodimères de LPL (41). Plus récemment, Goulbourne *et al*. a démontré que le domaine de liaison au substrat lipidiques est également impliqué dans la marginalisation des LRTG à la surface des capillaires endothéliaux (48). L'interaction de la LPL avec les apolipoprotéines fait intervenir l'extrêmité N-terminale de la LPL et L'Apo-B (49–51). L'héparine et les glycosaminoaglycanes inhibent cette liaison LPL-ApoB ce qui modulerait *in vivo* le métabolisme de la LPL (51). Les héparanes sulfates, chargés positivement, de lient à la LPL sur quatre sites chargés fortement positivement. Les deux principaux sites correspondent aux résidus Arg^{290}-Arg^{306}-Lys^{307}-Arg^{309}* et Arg^{321}-Lys^{323}-Arg^{324}-Lys^{327}*, et il existe deux sites secondaires Lys^{174}-Lys^{175}-Arg^{178}* et Lys^{346}-Lys^{430}-Arg^{432}-Lys^{434}-Lys^{440}-Lys^{441}* (34,42). L'héparine peut entrer en compétition avec la liaison des HSPG (52). Le site de liaison à l'héparine est situé de manière opposée au site actif suggérant que l'héparine ne joue pas de rôle direct dans l'activité catalytique de la LPL (42). La forme dimérique a une affinité 6000 fois plus importante pour l'héparine et les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycan) que la forme monomérique. Ceci explique la plus grande abondance de la forme dimérique à la surface de l'endothélium vasculaire.

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

Enfin, la LPL jouerait d'autres rôles que la lipolyse des triglycérides des LRTG. La LPL qui facilite la capture des lipoprotéines est capable d'assurer une fonction non-catalytique de pontage moléculaire. Elle permet ainsi de lier de façon simultanée des lipoprotéines et des surfaces cellulaires spécifiques telles que les HSPG, le LRP, le LDL récepteur, le récepteurs aux VLDL, le récepteur de l'apoE (53,54). La LPL serait capable de former des ponts en se liant aux HSPG exprimés à la fois sur les monocytes et les cellules endothéliales (55). Elle est également impliquée dans l'activation des macrophages, la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, et possède des effets pro ou anti-inflammatoires en fonction de différents agents stimulant (3,56–58).

1.2.1.4 Régulation l'expression de la LPL

Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'expression et de l'activité de la LPL : une régulation transcriptionnelle, une régulation post-transcriptionnelle ainsi que des protéines activatrices et inhibitrices modulant l'activité LPL après sa traduction (revus dans (3)). Nous allons détailler la régulation de la LPL dans ces principaux tissus d'expression (tissu adipeux et muscles squelettiques), les protéines régulatrices et inhibitrices de la LPL seront détaillées dans la partie 1.2.6.2.2.

1.2.1.4.1 Régulation de la LPL dans le tissu adipeux

Le tissu adipeux constitue le site de stockage principal des acides gras. Ces acides gras peuvent être issus de la synthèse *de novo* ou lipogénèse dans les adipocytes ou issus des acides gras libres circulant. La principale source des acides gras provient de la lipolyse des LRTG ce qui explique la forte expression de la LPL dans le tissu adipeux. En fonction du statut nutritionnel, le tissu adipeux peut être alternativement un organe de stockage en période post-prandiale ou un organe libérant les acides gras alors utilisés comme source d'énergie en période de jeûne ou post-absorptives. Les mécanismes mis en jeu dans cette régulation nutritionnelle concernent aussi bien la lipolyse intracellulaire que la lipolyse extracellulaire médiée par la LPL (revue dans (2)).

1.2.1.4.1.1 Régulation nutritionnelle de la LPL

La clairance des LRTG dans le tissu adipeux augmente en période post-prandiale comparée aux périodes de jeûne (59). Ceci implique la régulation de l'expression de la LPL qui intervient à différents niveaux (Figure 3).

1.2.1.4.1.1.1 Régulation transcriptionelle de la LPL

Les quantités d'ARNm et de la protéine LPL sont diminuées en période de jeûne (60,61)**.** L'insuline sécrétée en période post-prandiale contribue à l'augmentation de l'activité LPL (62). Le rôle des glucocorticoïdes est moins clair : chez le rat, ils induisent une diminution des ARNm de la LPL (63), alors que chez l'homme une augmentation de l'ARNm et de l'activité de la LPL est observée dans le tissu adipeux en présence de glucocorticoïdes (64,65). Enfin la diminution d'expression des facteurs de transcription PPARγ, PPARα et SREBP-1 dans le tissu adipeux en conditions de jeun, pourrait contribuer à régulation nutritionnelle de la LPL (3).

1.2.1.4.1.1.2 Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle

Les fluctuations de l'ARNm et de la protéine LPL sont relativement faible en comparaison au degré de modulation de l'activité LPL observée entre la période post-prandiale et le jeun. Ceci suggère une régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de la LPL. De nombreux facteurs de régulation post-transcriptionnelle ont été identifiés et ont été revus par Mead *et al*. (1). Parmi eux, la modification de la stabilité de l'ARNm, peut être induite par l'insuline (66). Enfin, ANGPTL4 est un facteur important de la régulation de l'activité nutritionnelle de la LPL post-traduction détaillée ci-après (*cf* 1.2.6.2.2.2.1) (67,68).

1.2.1.4.1.2 Autres facteurs de régulation dans le tissu adipeux

L'activité de la LPL est également modulée dans le tissu adipeux par d'autres facteurs que l'état nutritionnel. L'hypoxie chronique de manière intermittente inhibe l'activité LPL, les cathécholamines dans les situations de stress diminuent également l'activité LPL à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (69,70). Enfin les cytokines inhibent également l'expression de la LPL par des mécanismes impliquant le TNFα (71).

1.2.1.4.2 Régulation de la LPL dans le muscle squelettique

Les myocytes acquièrent les acides gras directement depuis le plasma ou bien via la clairance de LRTG (59).

1.2.1.4.2.1 Régulation nutritionnelle

Contrairement au tissu adipeux, l'expression de la LPL est augmentée lors des périodes de jeun dans le muscle squelettique (61,72,73). Les mécanismes impliqués sont peu connus, ils impliqueraient une augmentation de la transcription de la LPL via les facteurs de transcription Foxo1 (74,75). Paradoxalement, l'expression d'ANGPTL4 est augmentée dans le muscle squelettique en période de jeun ce qui pourrait contribuer à diminuer l'activité de la LPL (67,68). Ainsi, la variation de l'activité LPL en fonction du statut nutritionnel apparaît moins claire que dans le tissu adipeux.

1.2.1.4.2.2 Régulation par l'exercice

Plusieurs études démontrent que la réalisation d'une activité physique même occasionnelle entraîne une augmentation de l'activité LPL, de l'ARNm et de la protéine LPL dans le muscle mis en jeu par l'exercice (61,76–81). Physiologiquement cette augmentation servirait à augmenter l'apport d'acides gras pour générer l'ATP durant l'exercice. Cela favoriserait aussi la restauration de la réserve de TG utilisés pendant l'exercice en période de récupération. Les mécanismes mis en jeu sont peu connus et impliqueraient la régulation de la LPL via les catécholamines (82,83). La réalisation d'un exercice lors d'entraînements réguliers en endurance permet également de stimuler l'activité LPL dans le muscle et inversement, l'inactivité musculaire prolongée induit une diminution de l'activité LPL (84–86). Là encore les processus impliqués demeurent peu connus (Figure 3).

1.2.1.4.3 Régulation dans les autres tissus

L'activité LPL dans le muscle cardiaque est régulée par l'état nutritionnel. En situation de jeun, l'activité LPL après infusion d'héparine augmente dans les cardiomyocytes de rongeurs (87–89). Inversement, l'insuline induit une diminution l'activité LPL post-héparinique cardiaque (90). Les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés, ANGPTL4 pourrait jouer un rôle dans cette régulation. Dans le tissu adipeux brun,

l'exposition au froid induit une stimulation de l'activité LPL chez les rongeurs. Cette stimulation est médiée par des facteurs de transcription et de traduction via une stimulation β-adrénergique (91–93). Enfin, l'activité LPL est diminuée dans les macrophages en situation d'inflammation faisant intervenir les lipopolysaccharides et différentes cytokines tel que TNFα (94–98) (Figure 3).

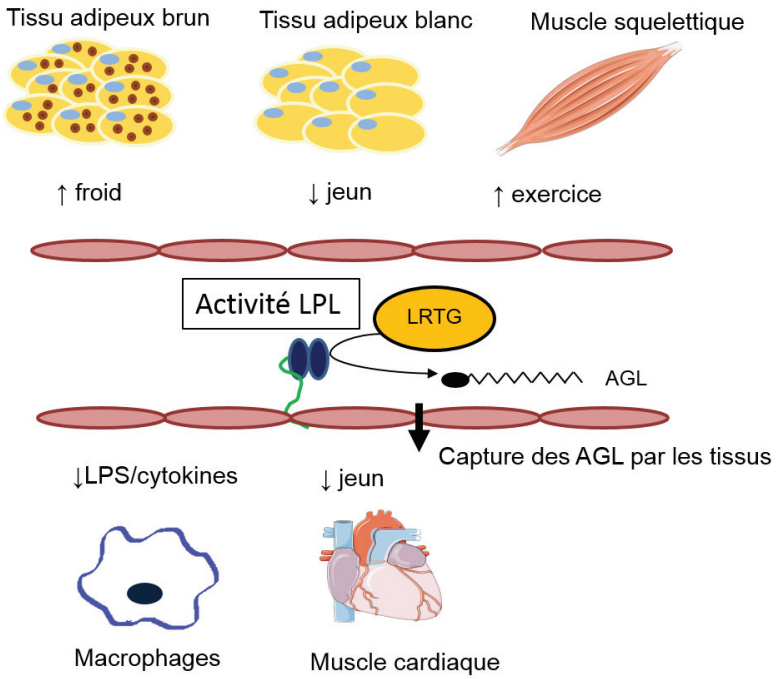


Figure 3 Régulation physiologiquede l'activité de la LPL dans différents tissus d'après (3)
LPS : lipopolysaccharides, LRTG : lipoprotéines riches en TG, AGL : acides gras libres, LPL : lipoprotéine lipase

1.2.1.5 Polymorphismes de la LPL associés à la triglycéridémie

1.2.1.5.1 Mutations délétères du gène la LPL

Plus de 220 mutations différentes du gène *LPL* affectant plus de 500 patients ont déjà été décrites chez l'homme (99). Une délétion hétérozygote de la LPL n'entraîne le plus souvent pas d'anomalie du bilan lipidique, cependant une hypertriglycéridémie mineure à modérée est parfois constatée. Un phénotype d'hypertriglycéridémie sévère peut être observé chez ces sujets en présence d'autres facteurs hypertriglycéridémiant tels qu'un déséquilibre de diabète, un éthylisme ou une grossesse (2). La fréquence des mutations homozygotes est environ de 1/1million. Elles affectent la quantité ou la stabilité des transcrits, empêchent la

sécrétion ou la stabilité de l'homodimère ou la liaison LPL-GPIHBP1 ou bien encore favorisent la dégradation de la LPL (2). Ces mutations sont responsables d'hyperchylomicronémie ou hyperlipoprotéinémie de type I par un défaut de lipolyse intravasculaire (détaillé ci après *cf 1.2.6*).

1.2.1.5.2 Polymorphismes associés à la triglycéridémie

D'autres polymorphismes de la LPL sont associés significativement à la triglycéridémie bien qu'ils n'engendrent pas de défaut complet de la fonction de la LPL. Certains sont localisés en régions codantes et la majorité est localisée dans les régions non-codantes de la LPL.

1.2.1.5.2.1 Polymorphismes des régions codantes de la LPL

Trois polymorphismes de la LPL significativement associés à la triglycéridémie sont localisés en région codante (Figure 4). Ils ont fait l'objet de nombreuses études de fonctionnalité *in vivo et in vitro* visant à déterminer leur impact sur l'expression ou l'activité catalytique de la LPL

1.2.1.5.2.1.1 c.106G>A (D9N, rs1801177)

Ce polymorphisme est une mutation relativement fréquente, retrouvée chez 1.5 à 5 % des sujets sains et localisée dans l'exon 2 du gène de la LPL. Il correspond à la transition d'une guanine en adénosine induisant la substitution de l'acide aminé acide aspartique en asparagine du codon 9 de la protéine mature (p.Asp36Asn selon la nouvelle nomenclature) (100,101). Il est associé à une augmentation significative d'environ 20% de la concentration des TG chez les porteurs du polymorphisme (102). Cette augmentation dépendrait de l'âge et du sexe avec une pénétrance accentuée chez les sujets âgés (103). Ces données sont renforcées par la méta-analyse de Sagoo *et al*. qui montre une augmentation significative de 0.14 mmol/L de la concentration des TG plasmatiques chez les porteurs du variant (101). Il s'agit, néanmoins d'une augmentation relativement modeste, contrastant avec la diminution bien plus importante de la concentration de la LPL et de son activité lipolytique observée chez les porteurs du polymorphisme. En effet, les différentes études de l'activité catalytique post-héparine de la LPL réalisées in vitro montrent une diminution de 8 à 34 % de celle-ci chez les porteurs du variant, ainsi qu'une diminution de 11 à 30 % de la masse de LPL (101). Les

études in vivo, quant à elles, montrent en majorité une diminution non significative de l'activité LPL chez les porteurs du polymorphisme probablement par manque de puissance (104,105), puisque la méta-analyse de Wittrup *et al*. met en évidence une diminution de 30% de l'activité LPL chez les porteurs du polymorphisme in vivo (102).

Les différentes études réalisées pour tenter d'expliquer les effets moléculaires du D9N sont non informatives. L'étude de la structure de la LPL ne montrait pas de différence du ratio des formes monomériques sur les formes dimériques entre les sujets mutés ou sauvages. La stabilité et l'affinité de la LPL semi-purifiée étaient identiques chez les porteurs et non-porteurs du polymorphisme (106). De plus, l'étude de la conformation tri-dimensionnelle de la protéine mutée ne met pas en évidence de modification du site catalytique. En revanche, la mutation pourrait modifier un site d'interaction entre protéines. Toutefois, l'hypothèse d'une modification d'interaction entre LPL et ApoC-II, cofacteur indispensable de la LPL, n'a pas été confirmée (107). Enfin, la mutation pourrait être responsable d'un modeste défaut de sécrétion de LPL puisqu'une diminution de la masse de la LPL sécrétée dans le milieu extra cellulaire in vitro est observée (100). Cette hypothèse n'a pas été confirmée in vivo.

En somme, le polymorphisme D9N est associé à une augmentation significative de la concentration des TG plasmatiques qui s'expliquerait par une diminution de l'activité lipolytique de la LPL dont le mécanisme précis n'est pas élucidé à ce jour.

1.2.1.5.2.1.2 c.953A>G (N291S, rs268)

Ce polymorphisme correspond à la transition d'une arginine en guanine du second nucléotide du codon 291 de la protéine mature (p.Asn318Ser selon la nouvelle nomenclature), localisé dans l'exon 6 du gène de la LPL (108). Il en résulte, lors de la synthèse protéique, une substitution d'un acide aminé asparagine par une sérine. La fréquence allélique moyenne de ce variant est d'environ 4% chez les sujets sains allant de 0 à 6.7% selon différentes études de population (100). On observe, chez les porteurs de ce polymorphisme, des concentrations de TG significativement plus élevées de 31% comparées à celles des sujets non porteurs (102). Ces données sont confirmées par la méta-analyse de Hu *et al*. montrant une augmentation similaire de 32.3% de la concentration des TG chez les porteurs du variant avec une augmentation plus importante en fonction de l'âge et du poids (109).

Les études de fonctionnalité in vivo montrent une diminution d'environ 30% de l'activité catalytique de la LPL post-héparine chez les porteurs du polymorphisme comparée à

celle des sujets contrôles (100). De plus, une diminution significative de 27% de la concentration de LPL post-héparine est mise en évidence chez les porteurs du variant (110). Ces données sont concordantes avec les études in vitro observant une diminution significative de 50% de la concentration et de l'activité catalytique de la LPL (100). Cette diminution d'activité de la LPL serait due à une dissociation plus rapide de la LPL active dimérique en forme inactive monomérique. Chez les porteurs du polymorphisme, on observe une diminution des formes dimériques et une augmentation des formes monomériques. Par ailleurs, la mesure isolée de l'activité catalytique des formes dimériques de l'enzyme muté S291 est identique à l'enzyme sauvage (111). Cette dissociation plus rapide s'expliquerait par des modifications tridimensionnelles induites par la mutation. En effet, le variant N291S est localisé dans une région de liaison à l'héparine et de formation d'homodimères de LPL.

Ainsi la fonctionnalité du polymorphisme S291 s'expliquerait par des modifications conformationnelles de la LPL, responsables d'une altération du site de liaison à l'héparine favorisant alors la dissociation accélérée des dimères actifs de la LPL en monomères inactifs (107,109).

1.2.1.5.2.1.3 c.1421C>G (p.Ser474Ter, S447X, rs328)

Cette mutation non-sens est localisée au sein de l'exon 9 en position 1595 du gène de la LPL. Ce changement de nucléotide introduit un codon stop prématuré de l'ARNm, induisant une protéine mature tronquée de seulement deux acides aminés en position C-terminale : une sérine et une glycine. Cette mutation a été découverte fortuitement chez un patient présentant un déficit familial en LPL mais cohérité avec une autre mutation responsable de la perte d'activité de la LPL (112). Il s'agit d'une mutation relativement fréquente, présente chez environ 10 à 20% des individus dans les études de population générale (101,113). Cette mutation est retrouvée aussi bien dans les populations caucasiennes (102,114,115) que chez les asiatiques (116) avec une fréquence légèrement inférieure dans les populations noires (117).

Elle est associée à un profil lipidique potentiellement bénéfique associant une diminution des TG et une augmentation du HDL-c et considéré comme protecteur contre les maladies cardio-vasculaires (102,118,119). Dans une revue consacrée au polymorphisme S447X, Rip *et al*. répertorient toutes les études publiées jusqu'en 2005 associant le variant S447X au métabolisme lipidique. La majorité des études citées (20/39) observe une

diminution significative de la concentration des TG chez les porteurs du polymorphisme (120). Ces études concernent majoritairement la mesure de la concentration des TG à jeun, or l'action de la LPL est particulièrement active après un repas riche en lipides. Les quelques publications étudiant l'effet du variant S447X sur le métabolisme post-prandial des lipoprotéines riches en TG sont contradictoires ; probablement en raison des faibles effectifs de ces études et de la variabilité inter et intra individuelle du dosage de TG.

Le mécanisme moléculaire expliquant les effets du variant S447X sur le métabolisme lipidique est non élucidé à ce jour, en revanche plusieurs études de l'activité catalytique et de la concentration de la LPL permettent de formuler des hypothèses. Les études in vitro de l'activité catalytique de la LPL sauvage comparée à la LPL mutée pour S447X sont contradictoires : certaines mettent en évidence une augmentation d'activité (121), d'autre l'absence de différence (122,123) ou même une réduction de l'activité catalytique de la LPL mutée (124). Ces disparités de résultats pourraient être dues aux méthodologies employées dépendant du type cellulaire, de la présence d'héparine ou non dans le milieu de culture, des conditions de manipulations et des techniques de mesure de l'activité de la LPL.

Contrairement aux études in vitro, les études réalisées in vivo chez des porteurs de la mutation S447X comparés à des sujets contrôles mettent en évidence une augmentation significative de l'activité LPL chez les porteurs du variant S447X (120). Cependant, un nombre important de sujets était nécessaire pour démasquer cet effet. Ces études utilisaient toutes une mesure post-héparine. Une seule étude, utilisant une mesure pré-héparine, a mis en évidence une augmentation de 60% de l'activité de la LPL chez les porteurs de la mutation comparée aux sujets non porteurs (125).

Les différentes études relatives à la concentration de la LPL chez les porteurs du variant S447X dépendent de la technique de dosage utilisée. La majorité des études utilisent des techniques d'immunofixation par ELISA. Les dosages sont réalisés sur plasma post-héparine ou pré-héparine avec des résultats discordants. En effet, les études utilisant une mesure sur plasma post-héparine ne montrent pas de différence significative de concentration de LPL, alors que les mesures sur plasma pré-héparine montrent une augmentation de la concentration de LPL deux fois plus importante chez les porteurs de S447X comparée à celles des sujets non porteurs (126). L'interprétation de ces différences est complexe car les dosages

pré-héparine prennent en compte les monomères inactifs de la LPL, pouvant représenter le turn-over de dimères actifs liés à la surface de l'endothélium.

Enfin, une étude récente suggère une possible implication du polymorphisme dans la régulation post-transcriptionnelle de la LPL. En effet, in vitro, les ARNm de la LPL incluant le polymorphisme sont moins sensibles à l'inhibition de la traduction induite par l'épinéphrine que les ARNm n'incluant pas le variant (127).

En somme, les sujets porteurs du polymorphisme S447X ont des concentrations de TG plus basses, de HDL-c plus élevées et un risque cardiovasculaire moindre comparés aux sujets porteurs de l'allèle sauvage. Bien que les mécanismes moléculaires sous-tendant ce caractère fonctionnel bénéfique ne soient pas élucidés, les données de la littérature montrent une augmentation de l'activité catalytique de la LPL chez les porteurs de ce polymorphisme associée à une augmentation des concentrations de la LPL pré-héparine. Ainsi, cette mutation « gain de fonction » est utilisée dans le développement de thérapie génique destinée au traitement du déficit en LPL (128).

1.2.1.5.2.2 Polymorphismes des régions non codantes de la LPL

Parmi les polymorphismes de la région non codante de la LPL, la majorité est localisée dans des régions «intergéniques» en aval du gène de la LPL en région 3'. Ils sont considérés comme reliés à la LPL dans les études GWAS (Tableau 1). Parmi eux, seul le rs2197089 a fait l'objet d'étude de sa fonctionnalité. Les variants localisés dans le promoteur, les introns ou de la région 3'UTR ont été plus étudiés (Figure 4).

1.2.1.5.2.2.1 Région promotrice

Le polymorphisme c.-281T>G, (T-93G, rs1800590) est localisé à proximité de la région promotrice du gène de la LPL. Il correspond à la transition d'une thymine en guanine 93 paires de bases en amont du codon d'initiation de traduction ATG. C'est un variant relativement rare avec une fréquence allélique d'environ 1.6% mais cette fréquence est très variable selon les ethnies (101). La méta-analyse de Sagoo *et al*. met en évidence une modeste diminution non significative de la concentration des TG plasmatiques de 0.02 mmol/L (IC 95% -0.17-0.21) chez les porteurs de l'allèle muté comparés aux sujets sauvages (101). L'étude de la fonctionnalité propre de ce polymorphisme est difficile en raison d'un fort déséquilibre de liaison avec le polymorphisme D9N dans les populations caucasiennes. Ce

dernier, localisé en région codante, est lui-même associé à une augmentation de la concentration des TG en particulier dans les populations caucasiennes et a été décrit précédemment. Dans les populations afro-américaines et noires sud-africaines, le variant rare de T-93G est plus fréquent et non systématiquement associé au D9N. Ainsi, deux études réalisées sur ces populations ont permis d'identifier le rôle spécifique du polymorphisme et son influence propre sur le métabolisme des lipides (129,130). Ces deux études observent une concentration de TG significativement plus basse chez les porteurs du polymorphisme comparée à celles des sujets non porteurs. De plus, la concentration de TG postprandiale, après un repas riche en lipides, était également significativement diminuée (129).

La diminution de la triglycéridémie chez les porteurs du polymorphisme est en accord avec l'augmentation d'expression d'un gène rapporteur soumis à la régulation du promoteur muté comparé au promoteur sauvage observée in vitro. En effet, l'expression du gène rapporteur luciférase régulé par le promoteur muté a une expression augmentée de 24% dans des cellules musculaires lisses et de 18% dans les cellules surrénaliennes humaines, comparé au promoteur sauvage (131). Cependant ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Yang *et al*. qui observent une diminution d'environ 50 à 60% de l'activité du promoteur -93G de la LPL in vitro dans des monocytes et des myoblastes (132). Une des hypothèses pouvant expliquer cette discordance serait l'existence d'une régulation d'expression spécifique de la LPL selon les tissus.

Ainsi les données expérimentales obtenues in vitro complètent les données obtenues lors des études de population et apportent des arguments en faveur d'un effet spécifique du polymorphisme T-93G par une augmentation de l'activité du promoteur de la LPL.

1.2.1.5.2.2.2 Régions introniques

1.2.1.5.2.2.2.1c.1322+483T>G (HindIII, rs320)

Ce polymorphisme, localisé dans l'intron 8 de la LPL, correspondant à une suppression de site de restriction de l'enzyme HindIII. Ce variant a une fréquence allélique d'environ 29% et est associé à une diminution modeste de la triglycéridémie : -0.09 mmol/L (IC95% : 0.05-0.14) chez les porteurs de l'allèle mineur comparé aux sujets sauvages (101). L'association de HindIII avec la diminution de la concentration de TG pourrait être liée à sa forte association avec le polymorphisme S447X, lui-même fortement associé à une diminution des TG plasmatiques (115). Cependant, l'étude de Chen et al. suggère une fonctionnalité spécifique de HindIII (133). En effet, ce polymorphisme se lierait à un facteur

de transcription TBP mis en évidence par une technique de migration par électrophorèse (EMSA, Electrophoretic mobility shift assay) avec une affinité plus faible pour l'allèle muté que pour le sauvage. Cette donnée est renforcée par l'étude de la transcription in vitro de l'intron 8 couplé à un promoteur de la LPL et à un gène rapporteur luciférase. Dans cette étude, l'allèle muté avait une diminution significative d'activité luciférase d'environ 23% comparé à celle de l'allèle sauvage dans des cellules musculaires et COS-1. Néanmoins, cette publication en faveur d'une diminution de l'expression de la LPL en présence du variant rare est contradictoire avec la baisse des TG plasmatiques observée chez les porteurs du polymorphisme. Chez ces sujets, peu de données sont disponibles concernant l'activité de la LPL. Une seule étude montre une augmentation non significative de l'activité LPL post-héparine chez les porteurs du variant mais repose sur seulement sur 15 sujets par groupe (134).

Enfin, il est également possible que le polymorphisme HindIII soit le marqueur de polymorphisme d'autres régions peu explorées telle que la région 3'UTR, ou les régions distales du promoteur qui pourraient être requises pour l'expression spécifique de la LPL. Fisher et al. évoque également la possibilité d'une altération de l'épissage de l'ARNm mais aucune publication n'a pu démontrer cette hypothèse à ce jour (100).

1.2.1.5.2.2.2.2c.1323-90T>G (rs327)

Ce polymorphisme est lui aussi localisé dans l'intron 8 de la LPL. Il s'agit d'un variant non rare dont la fréquence allélique est d'environ 41%. Il est associé à une diminution significative de la concentration des TG plasmatiques (135,136).

L'étude de Smith *et al*., décrite précédemment, a montré une différence potentielle de liaison avec un facteur de transcription, entre le variant sauvage et muté de rs327 en présence d'extraits nucléaires de cellules hépatiques humaines (HUH7) et de cellules musculaires lisses humaines. Cette différence est renforcée par une étude d'expression in vitro qui observe une expression significativement plus importante en présence de l'allèle mineur G comparé à l'allèle sauvage T (137). Finalement, à l'aide d'une expérience complémentaire d'EMSA (multiplexed-competitor-EMSA), Smith et al. a mis en évidence la liaison du facteur de transcription FOXA2 avec l'allèle sauvage T du rs327 mais pas avec l'allèle mineur G (137).

L'hypothèse avancée par les auteurs serait que la liaison de l'allèle majeur T avec le facteur FOXA2 permettrait de modifier la structure de la chromatine rendant accessible l'intron 8 à un complexe protéique inhibiteur de la transcription responsable de la diminution de l'expression de l'allèle T comparé à l'allèle G.

*1.2.1.5.2.2.2.3c.*1671T>C (rs13702)*

Il s'agit d'un polymorphisme localisé dans l'exon 10 correspondant à la région 3'UTR du gène de la LPL. Ce polymorphisme, fortement associé à une diminution de la concentration des TG plasmatiques, a une fréquence allélique d'environ 30% (137–141).

Chez les porteurs de ce polymorphisme, il a été observé une augmentation significative de l'activité LPL post-héparine comparée à celle des sujets sauvages (142). Richardson *et al*. ont démontré la fonctionnalité du polymorphisme rs13702 *in vitro*, en mettant en évidence la suppression de site de liaison du microARN 410 (miR-410) induite par l'allèle mineur C et responsable d'un gain de fonction avec une augmentation de l'expression de la LPL (140).

*1.2.1.5.2.2.2.4c.*1742T>C rs1059611*

Ce polymorphisme, également localisé en région 3'UTR avec une fréquence allélique d'environ 8%, est caractérisé par la transition d'une thiamine en cytosine. Il est associé à une diminution significative de la concentration des TG plasmatiques (143,144).

Il a été observé chez les porteurs de l'allèle mineur C, une augmentation significative de la quantité d'ARNm et de la protéine de la LPL dans la population chinoise Han (144). De plus, un modèle in vitro, étudiant l'expression des variants de rs1059611, à l'aide d'un gène rapporteur luciférase montre une expression de l'activité luciférase de l'allèle mineur C significativement supérieure à l'allèle majeur T (144).

1.2.1.5.2.2.2.5NG_008855.1:g.34792G>A rs2197089

Ce polymorphisme est localisé en position 34792 sur le gène de la LPL. Il s'agit d'un polymorphisme relativement fréquent dans les populations européennes et moins fréquent chez les africains avec respectivement 40% et 15% de fréquences alléliques (136,145). Il est associé à une diminution significative de la concentration de TG plasmatiques dans diverses ethnies (chinoise, africaine, européenne) (136,139,146). Smith *et al*. a étudié la liaison

potentielle de facteurs de transcription avec plusieurs SNP associés aux taux de TG dans des études GWAS utilisant l'EMSA. Parmi eux, le rs2197089 montrait une différence potentielle de liaison entre le variant sauvage et muté en présence d'extraits nucléaires de cellules hépatiques humaines (HUH7), cependant cette différence n'a pas été confirmée en présence d'extraits nucléaires de cellules musculaires lisses humaines. De plus une étude in vitro comparant l'expression du variant rs2197089 et de l'allèle sauvage n'a pas montré de différence significative (137). Enfin, une étude réalisée chez les chinois Han, suggère l'implication du polymorphisme dans la régulation de l'expression de la LPL dans cette population. En effet, on observe une augmentation significative ($p<0.0243$) de la quantité d'ARNm de la LPL chez les porteurs homozygotes de l'allèle muté comparée à celle des sujets homozygotes sauvages, suggérant donc une augmentation de l'expression de la LPL (147).

Ainsi le polymorphisme rs2197089 semble être impliqué dans l'augmentation de l'expression de la LPL, par un mécanisme non encore élucidé. Il pourrait s'agir de liaison à des éléments régulateurs tels que des facteurs de transcription ou miR. On ne peut néanmoins pas exclure également la possibilité d'un déséquilibre de liaison avec un autre SNP fonctionnel.

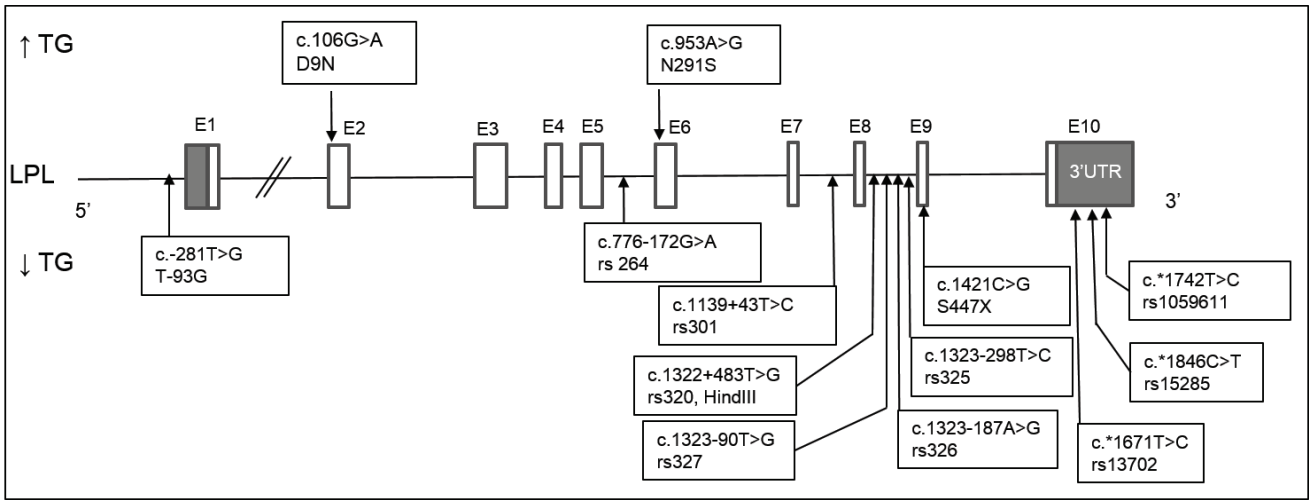


Figure 4 Polymorphismes de la LPL significativement associés à la triglycéridémie

E : Exon représenté par des rectangles et région transcrites en blanc, TG : triglycérides, références : c.-281T>G (101,129,130), *c.106G>A* (101,102), *c.776-172G>A* (137,148), *c.953A>G* (102,109,137), *c.1139+43T>C* (135,137), *c.1322+483T>G* (101), *c.1323-90T>G* (135,136), *c.1323-187A>G* (138,145,149), *c.1323-298T>C* (135,145,150), *c.1421C>G* (102,118,119,151,152), *c.*1671T>C*(137–141), *c.*1846C>T* (139), *c.*1742T>C* (143,144)

Position du SNP selon nomenclature HGVS	Numéro rs	AM/ Am	Effet de Am (score), *p ou IC95%*	Références
NC_000008.11:g.19968862G>A	rs2197089	G/A	↓ TG (-0.18), *p*=1.6E(-9)	(139)
			↓ TG (-1.38) *p*=1.1E(-12)	(146)
			↓ TG (0.037), *p*<0.01	(137)
			↓ TG (-0.028), *p*=0.0006	(144)
NC_000008.11:g.19986711A>G	rs12678919	A/G	*p*=2E(-41)	(153)
NC_000008.11:g.19994534T>A	rs17489268	T/A	*p*=5.2E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.19994799C>G	rs17411031	C/G	↓ TG, *p*=5.2E(-13)	(135)
			↓ TG (-0.14), IC95% :(-0.18,-0.11)	(154)
NC_000008.11:g.19995007C>T	rs17489282	C/T	*p*=5.2E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.19995075T>C	rs4922117	T/C	*p*=5.2E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.19997761T>C	rs17411126	T/C	*p*=5.2E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.19999028T>C	rs4523270	A/G	↑ TG (0.073), *p*=7.79E(-9)	(148)
NC_000008.11:g.20007664A>G	rs2083637	A/G	↓ TG, *p*=5.5E(-18)	(148)
			p=9.3E(-13)	(135)
			↓ TG, *p*=1.42E(-43)	(140)
NC_000008.11:g.20009934C>G	rs11986942	C/G	*p*=6.5E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.20011460T>C	rs4406409	T/C	*p*=4.4E(-4)	(145)
NC_000008.11:g.20012165G>A	rs1919484	G/A	*p*=9.3E(-13)	(135)
NC_000008.11:g.20017589C>T	rs2410630	A/G	↑ TG (0.080), *p*=1.32E(-9)	(148)
NC_000008.11:g.20019235G>C	rs7016880	G/C	↑ TG (0.32), *p*=2E(-7)	(5)
NC_000008.11:g.20041535C>T	rs4244457	C/T	*p*=0.00014	(146)

Tableau 1 Polymorphismes intergéniques de la LPL associés à la concentration de triglycérides

Ces polymorphismes sont localisés en amont du gène de la LPL en 3'. Ils sont classés en fonction de leur position par rapport à la fin de la région 3'UTR de la LPL du plus proche au plus éloigné. SNP : single nucleotide polymorphism, AM : allèle majeur, Am : allèle mineur, score : score de corrélation statistique de l'effet de l'allèle mineur, considéré comme significatif pour $P<0.05$*, (IC 95%) : intervalle de confiance à 95%*

1.2.2 Protéines régulatrices de la LPL et leurs déterminants génétiques

Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la LPL. On distingue les protéines impliquées dans la sécrétion et le transport de la LPL et celles modulant l'activité LPL en interation avec les substrats lipidiques (Figure 5). De nombreux polymorphismes des gènes codant pour ces protéines sont associés à des variations de la triglycéridémie.

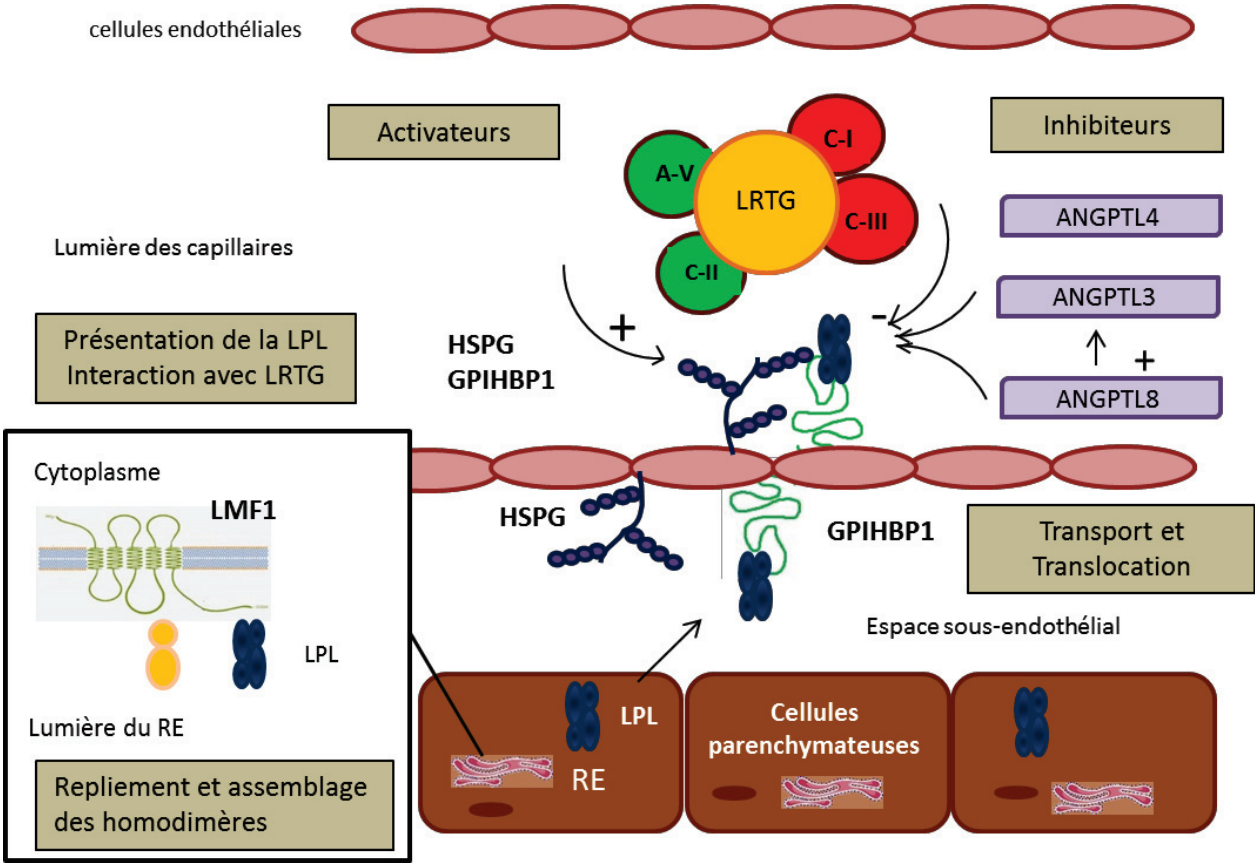


Figure 5 Protéines régulatrices de la Lipoprotéines Lipase

LPL : Lipoprotéine Lipase, A-V : ApoA-V, C-I, ApoC-I, C-II : ApoC-II, C-III : ApoC-III, LRTG : Lipoprotéines riches en Triglycérides, HSPG : Héparane sulfate protéoglycanes, RE : Réticulum endoplasmique.

1.2.2.1 Lipase Maturation Factor 1 LMF1

La Lipase Maturation Factor 1 LMF1 joue un rôle essentiel dans la maturation (repliement et assemblage) des lipases en particulier la LPL dans le réticulum endoplasmique (RE). LMF1 a été identifiée pour la première fois en 1983 chez des souris présentant une mutation naturelle du gène responsable d'une hyperchylomicronémie sévère et létale après 2 à 3 jours de vie. Cette mutation altère à la fois l'activité de la LPL et celle de la lipase hépatique (LH). Elle a donc été appelée *cld* (combined lipase deficiency) pour déficit combinée en lipase (155). Péterfy et al. ont finalement identifié le gène contenant cette mutation en 2007 codant pour une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique : transmembrane protein 112 (Tmem112) capable de restaurer l'activité LPL après transfection dans des cellules porteuses de la mutation *cld*. Ainsi cette protéine a été renommée LMF1 (36). Le gène LMF1 humain est localisé sur le bras court du chromosome 16. Il comprend 11 exons et code pour une protéine de 567 acides-aminés avec un poids moléculaire de 65kDa (36).

LMF1 est une protéine membranaire localisée dans le RE, lieu d'assemblage et de repliement de la LPL et de la lipase hépatique. LMF1 est constituée de 5 régions transmembranaires. Plusieurs boucles sont ainsi formées : les boucles B et D orientées vers le cytoplasme avec la partie amino-terminale, les boucles A et C orientées dans la lumière du RE avec la partie C-terminale (156). La fonction de maturation des lipases est attribuée au domaine DUF1222 correspondant à 65% de la partie C-terminale (36) (Figure 6). La troncature de ce domaine, induite par la mutation *cld*, engendre la suppression du domaine C-terminal localisé dans la lumière du RE et l'incapacité de LMF1 à procéder à la maturation des lipases. La boucle C contient un site de liaison des lipases et serait directement impliqué dans liaison avec les lipases. La proximité des 2 sites suggèrent une coopération dans le processus de maturation (37). Enfin, le phénotype des sujets humains ou souris présentant des mutations délétères de LMF1 suggère un rôle lipase-spécifique de LMF1. Cependant l'expression de LMF1 est ubiquitaire ne se limite pas au site de synthèse de la LPL et de la lipase hépatique. Ceci suggère que LMF1 pourrait avoir d'autres fonctions non connues à ce jour (36).

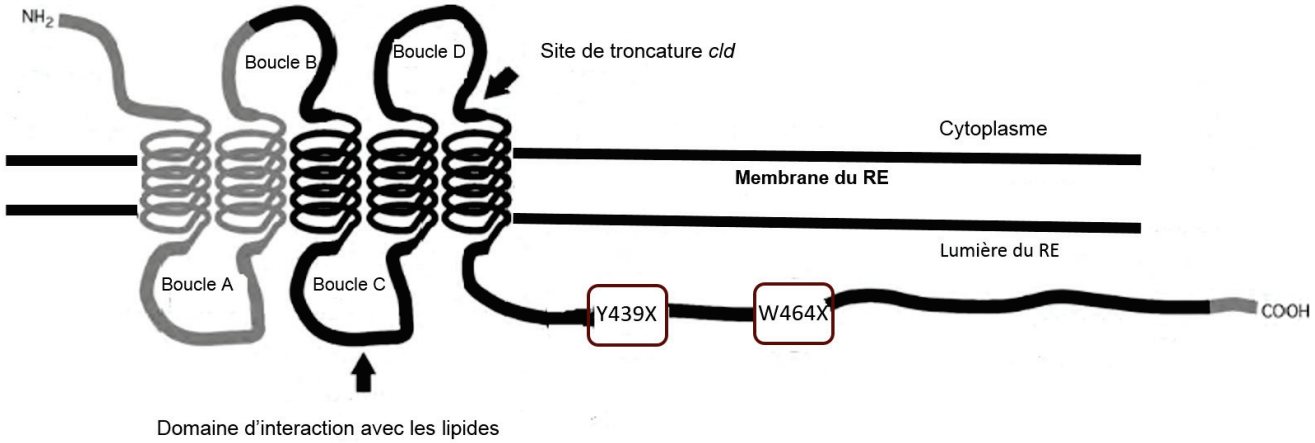


Figure 6 Structure et mutations délétères de LMF1 d'après (157)

Le domaine DUF1222 est indiqué en noir, la localisation des mutations délétères est indiquée dans les rectangles rouges.

1.2.2.1.1 Polymorphismes de LMF1

Deux mutations homozygotes du gène LMF1 ont été identifiées à ce jour chez des patients présentant des hypertriglycéridémie sévères (Figure 6).

La première, localisée dans l'exon 9 est une mutation non-sens NM_022773.2:c.1317C>G, NP_073610.2:p.Tyr439Ter (Y439X) résultant d'une protéine tronquée de 127 acides aminés. La suppression du domaine C-terminal de LMF1 est responsable d'une perte complète d'activité LPL engendrant une hyperchylomicronémie sévère compliquée de pancréatite aiguë (36).

La seconde mutation non-sens de LMF1, c.1391G>A, p.Trp464Ter (W464X), a été identifiée chez un patient présentant une hypertriglycéridémie sévère associée à des épisodes de pancréatite aiguë récidivante et un diabète de type 2. Cette mutation est responsable d'une troncature moins importante de 102 acides aminés. Chez le patient porteur de cette mutation, l'activité LPL est conservée mais diminué de 76% et la LPL masse est abaissée de 50% comparé à des sujets normo-lipidiques. Le fils du cas index est porteur hétérozygote avec un profil lipidique normal. In vitro, la protéine LMF1 tronquée présente une expression moindre ainsi qu'une diminution de son activité in vitro (158).

LMF1 n'est pas un gène identifié dans les GWAS, mais des variants ont été mis en évidence avec une distribution significativement différente entre des sujets présentant une hypertriglycéridémie sévères ou les sujet témoins normo-lipidiques (159–161). Johansen *et al*. ont mis en évidence sept mutations non-sens ayant une fréquence extrêmement faible (<1%) et retrouvée uniquement chez des sujets hypertriglycéridémiques. Seulement trois d'entre elles sont potentiellement fonctionnelles et aucune validation in vitro n'a été réalisée (Figure 6). Enfin, Surendran *et al*. ont mis en évidence huit nouvelles mutations non-sens de LMF1, dont trois (c.689G>A et c.790C>T et c.1568G>A) retrouvées uniquement chez des sujets hypertriglycéridémiques sévères. Cependant, l'activité LPL en présence de ces mutations n'était pas altérée in vitro, l'activité LPL post-héparinique des sujets porteurs était également normale (160). Ceci suggère que la fonction de LMF1 ne pourrait être altérée qu'en présence de mutation non-sens homozygote responsable d'une interruption complète du domaine C-terminal.

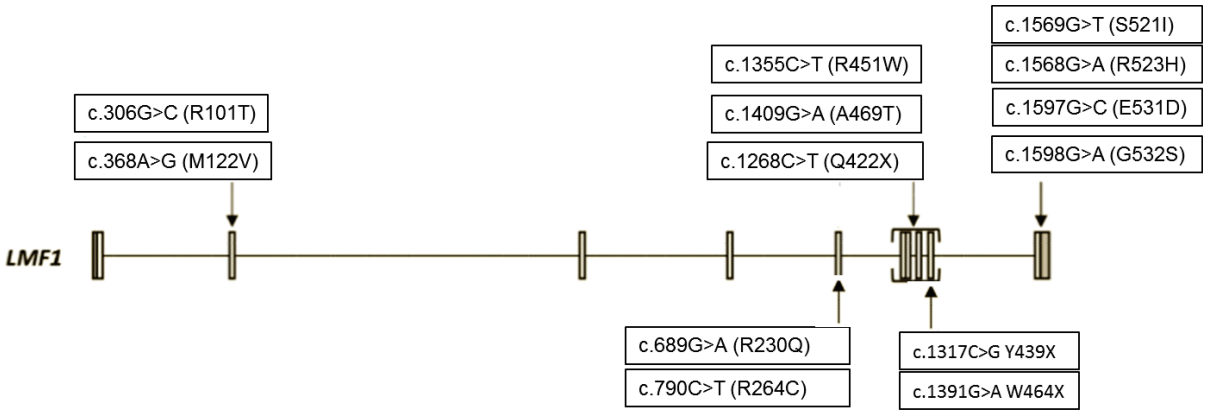


Figure 7 Polymorphismes de LMF1 associé aux hypertriglycéridémies d'après (159)
Nomenclature internationale HGVS séquence de référence NM_022773.2

1.2.2.2 GPIHBP1

Gpihbp1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1) est une protéine de 228 acides aminés, codée à partir du gène localisé sur le chromosome 8q24.3. Elle appartient à la famille des protéines Ly6 et a été découverte par Ioka *et al*. en 2003 du fait de sa capacité à se lier aux HDL (162). Gpihbp1 est exprimé exclusivement sur la face endoluminale des cellules endothéliales capillaires du tissu adipeux brun, du cœur, des muscles squelettiques (163,164).

Cette protéine est structurée en différents domaines : un peptide signal, un domaine acide (amino-terminal), un motif Ly6 riche en cystéine (lymphocyte antigen) un domaine C-terminal hydrophobe et une l'ancre GPI (GPI anchor). Le peptide signal est clivé dans le RE, et le domaine C-terminal hydrophobe est retiré lorsque l'ancre GPI est ajoutée (163). Ainsi la protéine mature est constituée de 184 acides aminés et contient 2 domaines principaux : le domaine acide et Ly6 domaine, tous deux impliqués dans la liaison de Gpihbp1 à la LPL (163,165,166). Le domaine acide est également impliqué dans la liaison aux chylomicrons et ApoA-V (166). Le Ly6 domaine est constitué de 10 résidus Cystéine (Cys65 à Cys136), relié par des ponts disulfures et formant une structure à trois doigts essentielle pour la liaison à la LPL (163) (Figure 8). Enfin le domaine Ly6 contient 2 sites N-glycosylés (Asn-78 et Asn-82) essentiels pour le trafic de Gpihbp1 à la surface endothéliale (167). Les travaux de Reimund et al suggèrent que les 2 domaines de liaison de Gpihbp1 interagissent de manière indépendante avec la LPL, seule la LPL lié au domaine acide interagit avec les lipoprotéines (168) (Figure 8).

L'implication de Gpihbp1 dans la lipolyse intravasculaire et dans le transport de la LPL à la lumière des capillaires endothéliaux a été revue par Young *et al*, Adeyo *et al* (169,170). Le rôle de GPIHP1 dans le métabolisme lipidique a été étudié à partir de souris ko. Les souris *Gpihbp1* $^{-/-}$ adultes présentent des hypertriglycéridémies majeures par accumulation de chylomicrons et de VLDL ainsi qu'une diminution de l'activité LPL post héparinique. Les souris *Gpihbp1* $^{+/-}$ présentent des concentrations de triglycérides similaires aux souris sauvages, le phénotype d'HTG apparaît à partir de 4 ou 5 semaines de vie (165,171). La quantité de LPL tissulaire des souris *Gpihbp1* $^{-/-}$ est normale mais mal localisée (164,165,171,172). En l'absence de GPIHBP1, la LPL est piégée dans l'interstitium entre les cellules parenchymateuses et n'est pas disponible pour la lipolyse des LRTG circulantes

(164). Gpihbp1 joue donc un rôle crucial dans le transport de la LPL depuis les cellules endothéliales vers la lumière des capillaires. La liaison de Gpihbp1 à la LPL constitue également une « plateforme de lipolyse » (164,165). Elle stabilise la LPL et la protège contre la désactivation par ANGPTL3 et ANGPTL4 (173). Enfin le complexe GPIHBP1-LPL est responsable de la margination des lipoprotéines riches en triglycérides dans les capillaires (48).

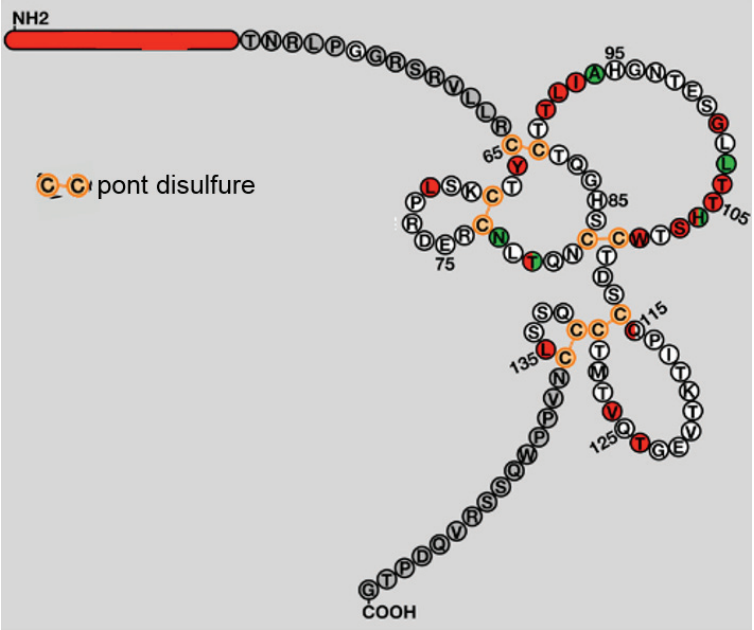


Figure 8 Structure de GPIHBP1 d'après (163)

Les couleurs des résidus indiquent leur importance dans la liaison de GPIHBP1 à la LPL en fonction de la diminution de liaison induite si muté pour une Alanine : en rouge >70%, vert 20 à 70%, blanc sans effet, les gris n'ont pas été testé.

1.2.2.2.1 Polymorphismes de GPIHBP1

Plusieurs mutations délétères sont responsables d'hyperchymomicronémies (Tableau 2) et la revue de la littérature a identifiée seulement quatres polymorphismes significativement associés à la triglycéridémie (Figure 9).

1.2.2.2.2 Mutations délétères de GPIHBP1

La découverte relativement récente de GPIHBP1 a conduit à rechercher des mutations chez des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère ou hyperchylomicronémie et non porteurs de mutations sur les gènes classiques (*LPL*, *APOC2*, *APOA5)*. Une vingtaine de mutations a ainsi été identifiées. Elles correspondent soit à des délétions partielles ou complètes de GPIHBP1 ou à des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites des domaines fonctionnels (Tableau 2). La plupart de ces mutations délétères concernent les exons 3 et 4 qui codent pour le domaine Ly6 qui est essentiel pour la liaison de Gpihbp1 à la LPL (163). Ainsi les délétions ou mutations faux-sens localisées dans ce domaine altèrent la liaison avec la LPL. Gpihbp1 se lie à la LPL sous forme de monomère et des mutations faux-sens du domaine Ly6 induisent sa dimérisation ou polymérisation empêchant la liaison à la LPL (174). L'activité LPL post héparinique des sujets homozygotes ou hétérozygotes composites est extrêmement basse. En revanche, l'activité et la masse de la LPL dans le tissu adipeux et dans le lait maternel de patientes hétérozygotes composites sont normales (175). La transmission se fait selon un mode récessif, les hétérozygotes ont presque tous un profil lipidique normal.

1.2.2.2.3 Polymorphismes de GPIHBP1 associés à la triglycéridémie

1.2.2.2.3.1 c.-469G>A

Ce polymorphisme est localisé dans le promoteur de GPIHBP1. Il est relativement fréquent (50% chez les Européen selon HapMap) et est significativement associé à une hypertriglycéridémie modéré (> 2 mmol/L) chez les porteurs hétérozygotes (p=0.025) et les homozygotes (p=0.004) dans une étude (176). De plus il augmenterait le risque d'hypertriglycéridémie chez les patients porteurs d'allèles de la LPL, eux-mêmes associés à l'hypertriglycéridémie. Aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour étudier l'impact de ce polymorphisme sur l'expression de GPHBP1 à ce jour. Enfin il serait en déséquilibre complet avec 4 autres SNP (r^2=1) : trois sont localisés en région intergénique en 5' (c.-283G>C (rs67963553), c.-1318C>T (rs57709849), c.-1233C>A et le quatrième est un SNP localisé dans l'exon1 (c.12C>T, rs61747644) (176).

1.2.2.2.3.2 c.41G>T (C14F)

Cette mutation est localisée dans le peptide signale de GPIHBP1. Elle est significativement associé aux hypertriglycéridémies sévères (159,177–179). Il induit une diminution de la capacité de transfert de la LPL à la surface endothéliale (177,179).

1.2.2.2.3.3 c.106 C>T L11F et c.352 A>G I93V

Ces deux mutations ont une fréquence allélique extrêmement faible (0.07% environ). Ils ont été identifiés par une stratégie de re-séquençage de GPIHBP1 chez des sujets HTG (n=413) et des sujets contrôles normo-triglycéridémiques (NTG) (n=324). Ces mutations ont chacune été identifiées chez un seul sujet du groupe NTG. Elles sont donc possiblement responsables d'une diminution de la triglycéridémie sans que leur implication fonctionnelle soit certaine (159).

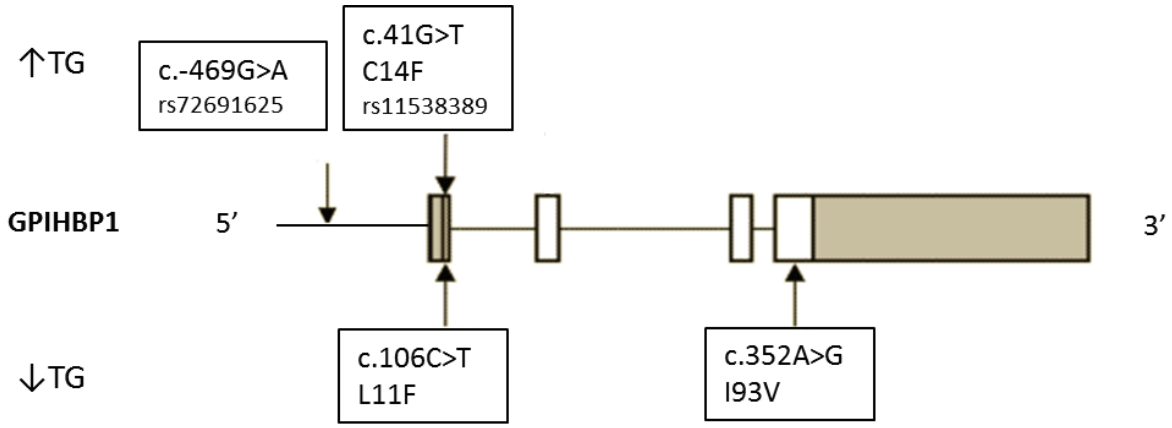


Figure 9 Polymorphismes de GPIHBP1 associés à la triglycéridémie

Pour les références se rapporter au texte.

Mutation*	Numéro rs	Alias	Localisation	Fonction	Références
Délétion GPHBP1	NA	NA	NA	Défaut de GPIHBP1	(177)
Délétion GPHBP1	NA	NA	NA	Défaut de GPIHBP1	(99,180)
Délétion	NA	NA	Exon3-Exon4	Défaut de GPIHBP1	(181)
c.166G>C	rs587777636	G56R	Exon2	Non connu	(159,182)
c.194G>A	rs587777638	C65Y	Exon3	Ly6	(160,183)
c.194G>C	rs587777638	C65S	Exon3	Ly6	(175)
c.202T>G	rs587777639	C68G	Exon3	Ly6	(175)
c.202T>C	rs587777639	C68R	Exon3	Ly6 mais liaison à la LPL conservée	(179)
c.203G>A		C68T	Exon3	Ly6	(99,184)
c.266G>T	rs587777640	C89F	Exon3	Ly6	(177)
c.267C>A	rs776388699	C89X	Exon3	Ly6	(185)
c.319T>C	Rs777039010	S107P	Exon3	Ly6	(186)
c.320C>G	rs587777643	S107C	Exon3	Ly6	(187)
c.323C>G	Rs752728823	T108A	Exon3	Ly6	(160)
c.331A>C	rs587777641	T111P	Exon4	Ly6	(188)
c.413-429del	rs587777642		Exon4	Ly6	(188)
c.344A>C	rs587777637	Q115P	Exon4	Ly6	(160,183,189)
c.431C>T	rs78367243	Ser144Phe	Exon4	NC	(160)
c.523G>C	rs145844329	G175R	Exon4	Altération du transfert à la surface cellulaire	(177)

Tableau 2 Mutations délétères de GPIHBP1 responsable d'hyperchylomicronémies

***** Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_178172.5

1.2.2.3 Les Apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont principalement produites par le foie et sont sécrétées dans la circulation plasmatique où elles circulent liées aux lipoprotéines dont les lipoprotéines riches en TG (LPRTG). Plusieurs apolipoprotéines ApoA-V, ApoC-I, ApoC-II et ApoC-III sont impliquées dans la régulation de l'activité LPL.

1.2.2.3.1 Apolipoprotéine A-V (ApoA-V)

L'ApoA-V est une protéine de 366 acides aminés, codée à partir du locus *APOA5APOA4-APOC3-APOA1* situé sur le chromosome 11q23-qter (190). La protéine mature de 343 acides aminés est sécrétée après clivage du peptide signal correspondant aux 23 premiers acides aminés, son poids moléculaire est de 39kDa. Elle est exprimée principalement par le foie et est sécrétée dans le plasma où elle est principalement liée aux VLDL, aux HDL et aux chylomicrons (190–192). L'ApoA-V circulante dans le plasma est principalement retrouvé sous forme monomérique (193). Sa concentration plasmatiques est très faible comparée à celle des autres apolipoprotéines allant de 20 à 500ng/ml en population générale (191,194).

L'ApoA-V est une protéine hydrophobe principalement constituée d'hélices alpha amphipathiques dont la structure secondaire peut être divisée en 6 régions différentes (195) (Figure 10). Le domaine N-terminal et C-terminal correspondent à des domaines de liaison lipidique. Les résidus 192 à 238 sont nécessaires à la liaison aux lipides et à l'activation de la LPL (195). Le domaine de liaison à l'héparine (résidus 186-227) intervient dans l'interaction entre ApoA-V et GPIHBP1. Les résidus (R210, K211, K215, K217) sont nécessaires pour cette interaction (166,196). Le domaine de liaison à l'héparine est également impliqué dans la liaison d'ApoA-V avec les récepteurs de lipoprotéines (LDLR, LRP-1, SorLa) dans le foie (197,198). Enfin, ApoA-V interagit également avec les cellules de surface midkine via son domaine N-terminal, favorisant son internalisation dans les cellules β pancréatiques (199). ApoA-V pourrait ainsi être impliquée dans l'homéostasie glucidique (200).

L'ApoA-V est impliqué dans le métabolisme des triglycérides. Les souris ko a*poa5*-/- présentent des triglycérides plasmatiques 3-4 fois supérieurs aux souris wild type (WT) (190,201) et les souris hétérozygotes *apoa5(+/-)* présentent une augmentation intermédiaire des triglycérides (190). Inversement, les souris surexprimant l'ApoA-V présentent une

réduction de 1/3 des concentrations plasmatiques des triglycérides du fait d'une accélération de la lipolyse des triglycérides par la LPL sans modification de la production des VLDL et des chylomicrons (190,202). Chez l'homme, l'ApoA-V active la LPL liée aux protéoglycanes et accélère ainsi l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et des VLDL (202–205). Le mécanisme exact n'est à ce jour pas complètement élucidé. Il implique des interactions entre LPL, ApoA-V, protéoglycanes, et GPIHPB1 (202,206). Enfin l'implication d'ApoA-V dans la liaison des LRTG aux protéoglycanes a été démontrée récemment (207).

ApoA-V pourrait également agir de manière intracellulaire au niveau hépatique en diminuant la synthèse et la sécrétion des VLDL ou chylomicrons (208,209). L'apoA-V diminuerait la lipidation de l'ApoB de manière dose-dépendante (205). Cependant chez la souris surexprimant l'apoa-V humaine, la production des VLDL et des chylomicrons n'est pas affectée (201–203). Enfin l'ApoA-V pourrait guider les triglycérides vers la formation de gouttelettes lipidiques diminuant ainsi la production des VLDL (210). Le rôle d'apoA-V au niveau hépatique reste donc controversé et d'autres études sont nécessaires.

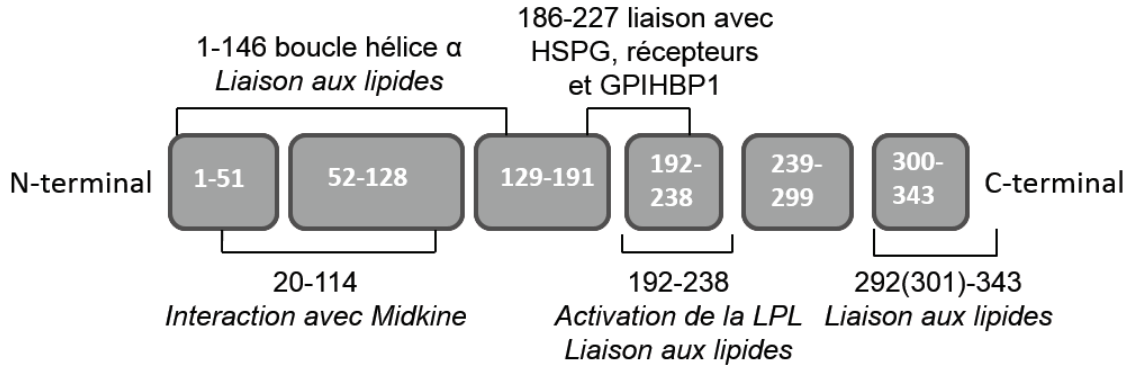


Figure 10 Structure d'ApoA-V d'après (197)

1.2.2.3.1.1 Polymorphismes d'APOA5

Le gène APOA5 correspond à un des locus le plus significativement associé à la triglycéridémie dans les études association génétique ou GWAS (genome wide association study) (211). Plusieurs variants communs d'APOA5 sont ainsi associés significativement à la triglycéridémie (Tableau 3) et des mutations rares, engendrant un déficit d'APOA5, ont également été identifiées (Figure 11).

1.2.2.3.1.1.1 Polymorphismes communs d'APOA5

Le gène APOA5 contient plusieurs polymorphismes relativement fréquents. Ils définissent quatre haplotypes correspondant à un ensemble de polymorphismes situés à proximité sur un même chromosome, cohérités ou en fort déséquilibre de liaison (190,212–215). L'haplotype APOA5*1, correspond à l'haplotype sauvage et est composé des allèles fréquents de chacun des polymorphismes. APOA5*2 est défini par la présence des allèles rares des polymorphismes SNP1, SNP2,-3A>G et -1131T>C. Tous les polymorphismes étant en fort déséquilibre de liaison avec -131T>C. Ainsi, -1131C peut servir de marqueur pour identifier l'haplotype APOA5*2. APOA5*3 est défini par la présence de l'allèle rare du polymorphisme S19W. Les trois haplotype principaux représentent environ 98% des haplotypes chez les caucasiens (212) et plus de 90% chez les asiatiques. L'APOA*4 est retrouvé uniquement chez les asiatiques avec une fréquence d'environ 8% (215) (Tableau 3).

Haplotype / SNP (HGVS*)	APOA5*1	APOA5*2	APOA5*3	APOA5*4
c.-644C>T	T	**C**	T	**C**
c.-3A>G	A	**G**	A	**G**
c.56C>G	C	C	**G**	C
c.162-43A>G	G	**A**	G	G
c.*158C>T	T	**C**	T	T

Tableau 3 Principaux haplotypes du gène APOA5

*Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_052968.4

De nombreuses études d'association génétique ont mis en évidence l'association de APOA5*2 (-1131T) et APOA5*3 (S19W) aux hypertriglycéridémies sévères et modérées. Les porteurs des allèles mineurs ont une augmentation des TG de 20 à 30% comparé aux homozygotes sauvages La fréquence allélique de ces deux haplotypes varie en fonction des ethnies entre 5 à 15% chez les caucasiens. En revanche, -1131T est beaucoup plus fréquent chez les asiatiques environ 30% (Tableau 4).

*1.2.2.3.1.1.1.1 Haplotype APOA5*3*

Le rôle l'APOA5*3 dans la régulation de la triglycéridémie est expliqué par l'allèle rare G du polymorphisme S19W localisé dans le peptide signal d'APOA5. Il induit une substitution d'un résidu sérine hydrophile par un résidu tryptophane hydrophobe qui modifie la structure secondaire d'ApoA-V. Cette modification diminue la capacité de translocation de la protéine mature à travers le RE conduisant à une diminution de la sécrétion de la protéine mature (213,216).

HGVS*	Numéro rs	Autres dénominations	localisation	Références association aux HTG
c.-644C>T	rs662799	-1131T>C SNP3	promoteur	(122,133,202,224–226,229–253)
c.-3A>G	rs651821	Kozak	Exon2	(118,217–221)
c.56C>G	rs3135506	S19W SNP5	Exon3	(136,151,160,190,212,212,213,217–219,222–237)
c.162-43A>G	rs2072560	SNP2	Intron 3	(219)
c.*158C>T	rs2266788	SNP1	3'UTR	(139,190,212,219,220,222,238,239)

Tableau 4 Polymorphismes d'APOA5 associés aux hypertriglycéridémies

*Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_052968.4

*1.2.2.3.1.1.1.2 Haplotype APOA5*2*

Contrairement à l'APOA5*3, la fonctionnalité de l'APOA5*2 n'est pas établie. L'analyse fonctionnelle de chacun des polymorphismes de cet haplotype n'a pas permis d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation d'*APOA*5. Le polymorphisme -3A>G se situe 3 nucléotides en amont d'un site d'initiation de la traduction également appelé séquence « Kozak ». Celle-ci est impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm, le polymorphisme -3A>G pourrait donc altérer la traduction d'APOA5. Toutefois, les études *in vitro* n'ont pas observé de modifications de l'efficacité de traduction en présence de ce variant

(216). Les travaux menés par Ahituv *et al*. n'ont pas mis en évidence d'altération de l'expression hépatique des ARNm chez les souris mutées pour APOA5*2 (240). Ceci a été ensuite confirmé par l'analyse de tissu hépatique chez l'homme (241). Cependant les concentrations d'ApoA-V sont significativement plus basses chez les porteurs de l'allèle rare du polymorphisme -1131C (241–244). Enfin il a été suggéré que le SNP1 (c.1259 T>C), localisé en région 3'UTR pourrait faire partie d'une séquence pouvant modifier la stabilité des ARNm (245).

1.2.2.3.1.1.2 Mutations rares associées aux hypertriglycéridémies

Le re-séquençage de patients ayant présenté des hyperchylomocronémies a permis d'identifier des mutations rares d'*APOA5* à l'état homozygote ou hétérozygote avec une transmission parfois considérée comme récessive ou codominante et de pénétrance variable (Figure 11). Ces mutations sont soit des mutations faux-sens responsables de la substitution d'un acide-aminé, ou des mutations non-sens conduisant à la troncature de la protéine ou bien des délétions de plusieurs acides aminés ou des délétions partielles d'APOA5. Trois mutations introniques modifiant des sites d'épissage ont également identifiées (Figure11).

1.2.2.3.1.1.2.1 Mutations non-sens d'APOA5

La fonctionnalité de la **mutation c.442 C>T (Q148X),** mutation non-sens, n'est pas élucidée. Elle pourrait être un facteur prédisposant à la survenue d'hypertriglycéridémie puisque seulement la moitié des sujets porteurs à l'état hétérozygote présentait une hypertriglycéridémie modérée (246). De plus les sujets porteurs de la mutation étaient tous également porteurs de la mutation S19W sur le même allèle (246,247). In vitro, l'expression de la protéine tronquée induit une diminution modeste mais non significative de l'activité LPL comparée à ApoA-V sauvage (248)

La mutation c.415C>T (Q139X) a été mise en évidence chez deux familles présentant des hyperchylomicronémies transmises de manière verticale à pénétrance variable et d'apparition tardive (249). Le phénotype d'hypertriglycéridémie sévère était observé uniquement en présence d'autre facteur génétique hypertriglycéridémiant soit APOA5*2 ou APOA5*3. L'étude de la cinétique de l'ApoB chez les porteurs hétérozygotes a mis en évidence un défaut de lipolyse intravasculaire (249) confirmé in vitro par Dorfmeister et al.

montrant une diminution significative de l'activité LPL en présence d'ApoA-V-139X comparé à ApoA-V sauvage(248).

La mutation non-sens, c.289 C>T (Q97X), localisée dans l'exon 4 du gène APOA5, induit un codon stop prématuré en position 97. A l'état homozygote, elle entraîne un défaut d'apoA-V plasmatique suggérant un défaut de sécrétion de la protéine tronquée (250,251). Ce défaut d'apoA-V entraîne une diminution de l'activité LPL post-héparinique d'environ 50% chez les porteurs hétérozygotes et 90% chez les sujets homozygotes conduisant à la survenu d'hypertriglycéridémie sévère (251).

La mutation c.161+3G>C (IVS3+3G>C) a été identifiée chez 2 sujets (père et fils) présentant une hypertriglycéridémie. Elle est localisée dans le site donneur d'épissage dans l'intron 3 et il en résulte l'apparition d'un codon stop prématuré responsable d'une protéine tronquée de seulement 18 acides-aminés. Chez les patients porteurs de cette mutation, une diminution de l'activité LPL a été rapportée (252).

La mutation c.990_993delAACA (p.D332Vfs336X) entraîne une troncature des 32 derniers acides-aminés de la partie C-terminale d'ApoA-V (5). Les explorations fonctionnelles de Mendoza-arbera *et al*. n'ont pas mis en évidence d'altération de la liaison à LRP1 mais une diminution de liaison à l'héparine, et aux récepteurs (sortiline, SorLA et LR11). La capacité d'activation de la LPL n'était pas altérée (198).

La mutation p.Q305X est significativement associée à une augmentation de la triglycéridémie. Les prédictions fonctionnelles *in silico* sont en faveur d'une protéine ApoA-V tronquée mais sa fonctionnalité n'a pas été testée à ce jour (5).

1.2.2.3.1.1.2.2 Les délétions partielles d'APOA5

La mutation c.16_39del (p.Ala6_Ala13del) est responsable de la délétion de 8 acides aminés (résidu 6 à 13) dans le peptide signal. Elle engendre un défaut de sécrétion d'ApoA-V qui est indétectable dans le plasma. Cette mutation a été mise en évidence à l'état homozygote chez un enfant ayant présenté une hyperchylomicronémie lors de l'allaitement. L'activité LPL était normale, il est intéressant de noter qu'après sevrage, la triglycéridémie s'est quasiment normalisée suggérant un rôle modulateur d'ApoA-V sur l'activité LPL lors de régime riche en graisse (253).

La mutation c.694_705delTCCCGGAAGCTC (p.(Ser232_Leu235)del), responsable de la délétion de 4 résidus très conservés est proche d'une région impliquée dans la liaison aux lipides, l'héparine et aux récepteurs. In vitro la protéine mutante montre une diminution de liaison à l'héparine, et aux récepteurs (sortiline, SorLA et LR11) mais sa capacité d'activation de la LPL n'est pas altérée (198).

Enfin **la délétion c.295–297 del GAG (p.E99 del)** a été identifiée à l'état hétérozygote chez un sujet présentant une hypertriglycéridémie sévère associée à d'autre variant hypertriglycéridémiant (254)

1.2.2.3.1.1.2.3Mutations faux-sens d'APOA5

La mutation c.553G>T (G185C) est associée à une augmentation des TG qui est relativement rare chez les caucasiens et plus représenté dans les populations asiatiques avec une fréquence d'environ 4% (255,256). La substitution d'une Glycine en Cystéine en position 162 de la protéine mature (après clivage du peptide signal) favorise la formation d'hétéro-dimère par la création d'un pont disulfure avec les protéines plasmatiques (257). In vitro l'expression du variant 185C diminue l'activation de la LPL comparé à l'allèle sauvage (248,258).

La mutation c.811G>T (G271C) est également associée aux hypertriglycéridémies sévères (160,248). La substitution d'un résidu Glycine pour une Cystéine favorise la formation de pont disulfure entraînant une polymérisation d'ApoA-V. Contrairement au variant G185C, la protéine apoA-V-271C n'altère pas l'activation de la LPL mais sa polymérisation pourrait empêcher sa liaison aux LDL récepteurs. Le phénotype d'hypertriglycéridémie semble également être favorisé par la présence d'autre facteur génétique prédisposant (248).

La mutation c. 962 A>T (H321L) correspond à la transition d'une Histidine en Leucine en position 321. Elle pourrait modifier l'interaction d'ApoA-V avec la LPL. *In vitro* le variant ApoA-V-321L diminue significativement l'activation de la LPL comparé à ApoA-V sauvage (248). Toutefois cette mutation a été identifiée chez un sujet porteur également d'une mutation homozygote de la LPL (P270L) et hétérozygote pour S19W, suggérant là encore, une origine polygénique de l'hyperchylomicronémie (248).

La mutation c.398C>G (p.Thr133Arg) a été identifiée chez un patient porteur hétérozygote ayant présenté des épisodes hyperchylomicronémie et de pancréatite aiguë. Ce patient présentait une masse LPL normale mais l'absence d'activité LPL post-héparinique (160).

La mutation c.764 A>G (E255G) semble exercer un effet modeste sur la survenue des hypertriglycéridémies, elle a été mis en évidence associée à une mutation homozygote de la LPL (W86G) connue pour causer une hyperlipoprotéinémie de type I. Toutefois, elle est associée à une diminution d'environ 25% de l'activité LPL *in vitro* suggérant un facteur prédisposant aux hypertriglycéridémies (248).

La mutation c.725T>C (L242P) a été mise en évidence chez des sujets hypertriglycéridémiques sévères porteurs également d'autres variants favorisant l'hypertriglycéridémie. Les sujets porteurs du variant L242P avaient des concentrations d'ApoA-V normales et une activité LPL normale Sa causalité dans la survenue des hypertriglycéridémies reste à préciser (251).

La mutation c.758 T>C (L253P) correspond à la substitution d'une Leucine en Proline en position 253. Elle pourrait entraîner une modification de la structure la partie C-terminale. *In vitro*, un défaut d'activation de la LPL et même un effet inhibiteur de la protéine mutée comparée à ApoA-V sauvage a été rapporté (198). Mais la survenue d'hyperchylomicronémie n'a été observée qu'en association avec d'autre variant d'APOA5 hypertriglycéridémiant (198,254).

1.2.2.3.1.1.2.4 Mutations des sites d'épissage

Trois mutations localisées dans des sites d'épissage ont été identifiées chez des sujets présentant des hypertriglycéridémies sévères. Le variant **c.161+3G>C (IVS3+3G>C)** induit également un codon stop prématuré et a été développé précédemment (252)**.** Le variant **c.161+5G>C** a été identifié à l'état homozygote chez un sujet présentant une ApoA-V plasmatique indosable (259), alors que le variant **c.49+1G>A** a été mis en évidence à l'état hétérozygote chez un sujet ayant une concentration d'ApoA-V normale (260). Ces deux sujets étaient également porteurs de plusieurs autres polymorphismes favorisant l'hypertriglycéridémiant (259,260).

La plupart de ces facteurs génétiques ne sont pas isolés mais souvent associés à l'état hétérozygote ou homozygote chez les sujets présentant des hyperchylomicronémies. De plus d'autres facteurs favorisant l'hypertriglycéridémie tels que grossesse, traitement, estroprogestatif, âge, diabète, obésité, ou diététique, sont souvent nécessaires à l'expression du phénotype lipidique (246–251,259). Une diminution importante des triglycérides est parfois observée après un régime ou l'introduction d'un traitement voire un retour à une triglycéridémie normale après prise en charge ou suppression d'un facteur favorisant, par exemple post-partum ou arrêt de contraception (251,253,259).

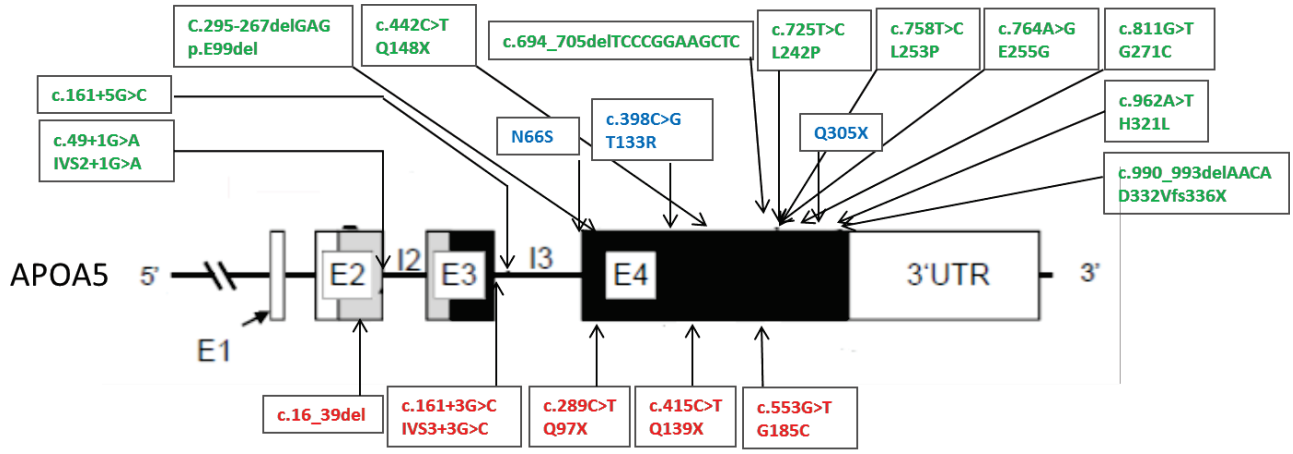


Figure 11 Mutations du gène APOA5 adaptée de (253)

Rectangle blanc : régions non traduites, en gris peptide signal, en noir séquence de la protéine mature. Mutations en rouge : mutations causale HTG, en vert facteur génétique prédisposant en association avec d'autres facteurs génétiques, en bleu associée aux HTG sans étude de fonction à ce jour. Références : se référer au texte

1.2.2.3.2 Apolipoprotéine C-III (ApoC-III)

L'ApoC-III une apolipoprotéine échangeable de 99 acides aminés, codée par le locus *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* situé sur le bras long du chromosome 11q23-qter. Elle est principalement synthétisée par le foie et également dans l'intestin. Elle est sécrétée dans le sang et est liée à la surface des LRTG (chylomicrons and VLDL) et des HDL (261). La

protéine mature est constituée de 79 acides aminés, après retrait du peptide signal de 20 acides aminés dans le RE et a un poids moléculaire de 8.8 kDa (261).

L'apoC-III est une protéine O-glycosylée. Il existe trois isoformes d'apoC-III en fonction du degré de sialylation sur le résidu thréonine en position 74 : apoC-III–0 (aucun acide sialique), apoC-III-1 (1 résidu d'acide sialique) et apoC-III-2 (2 résidus d'acide sialique) (262,263). L'isoforme apoC-III-0 a une capacité limitée d'inhibition de la LPL et augmente donc la capacité de clairance de TG (264).

L'expression d'ApoC-III est fortement associée à la triglycéridémie, en effet des études ont montré une corrélation positive entre la concentration d'ApoC-III dans le plasma et les concentrations de TG chez l'homme (265,266). Inversement la diminution de l'expression d'*APOC3* induite par les fibrates pourrait contribuer à l'effet hypotriglycéridémiant de cette classe thérapeutique (267,268). Ces données sont concordantes avec le profil lipidique observé chez les souris transgéniques *ko* pour le gène APOC3. Les homozygotes (*apoc3*-/-) présentent une diminution d'environ 70% des triglycérides comparé au sujets sauvages alors les hétérozygotes (*apoc3*-/+) ont des concentrations de triglycérides intermédiaires (269,270). Inversement les expériences de surexpression du gène humain *APOC3* dans des modèles murins ou porcins conduisent à des hypertriglycéridémies sévères et parfois des stéatoses hépatiques (271–274).

L'ApoC-III inhibe la LPL (via la partie N-terminale de la protéine) et elle inhibe également la lipase hépatique (261). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la LPL demeurent imprécis. Une hypothèse proposée est l'inhibition de l'activité LPL par le déplacement de la LPL des particules lipidiques induit par ApoC-III et ApoC-I et favorisant également l'action de ANGPTL4 (275). La partie C-terminale d'ApoC-III semble être impliquée dans son interaction avec la LPL d'après les études de structure (276).

L'ApoC-III intervient également dans l'inhibition de la clairance des LRTG médiée-par- récepteur au niveau hépatique (261) ainsi que dans leur liaison aux glycosaminoglycanes et à leurs récepteurs spécifiques (277). Enfin, le rôle d'ApoC-III au niveau hépatique a été plus récemment mis en évidence, elle joue un rôle crucial dans l'assemblage des VLDL et leur sécrétion (278,279).

1.2.2.3.2.1 Polymorphismes d'*APOC3*

Plusieurs variants d'*APOC3* sont associés à la triglycéridémie. On distingue les mutations responsables d'une perte de fonction d'ApoC-III, associées à une diminution des TG plasmatiques, et des polymorphismes associés à l'augmentation des TG probablement par augmentation de l'expression d'APOC3.

1.2.2.3.2.1.1 Mutations perte de fonction

Plusieurs mutations rares responsables d'une perte de fonction d'ApoC-III ont été mises en évidence ces dernières années. Du fait de leurs fréquences extrêmement faibles en population générale, elles n'étaient pas détectées dans les études d'association génétiques classiques ou GWAS. C'est l'étude de populations particulières, présentant des fréquences alléliques plus importantes, qui ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique lipidique et également protecteur cardiovasculaire de ces mutations. Cet effet a été confirmé par des études en population générale retrouvant chez les porteurs de ces mutations «perte de fonction» des TG significativement diminués de 39 à 44% et une diminution significative du risque relatif de coronaropathie de 36 à 40% comparé aux sujets non porteurs (280,281) (Figure 12).

La mutation c.55C>T, R19X est une mutation non-sens qui induit le remplacement d'un résidu Arginine en un codon stop en position 19, responsable d'un défaut en ApoC-III (280,281). Cette mutation est très rare avec une fréquence allélique de 0.035% chez les Européens (282) et 0.08% chez les Américains (283). La mutation a été identifiée dans une population Amish avec une fréquence allélique d'environ 2.8% (284). Les sujets porteurs de la mutation à l'état hétérozygote avaient des concentrations plasmatiques d'apoC-III significativement diminué de 50% comparées aux sujets sauvages. Le profil lipidique des porteurs hétérozygotes est également significativement modifié avec une diminution des triglycérides, une augmentation du HDL-c et diminution de LDL-c. La mutation est localisée dans le peptide signal de la protéine normalement clivé avant la sécrétion de la protéine. Les prédictions fonctionnelles sont donc en faveur d'un défaut de production d'apoC-III à partir de l'allèle muté. De plus l'ARNm transcrit à partir du gène muté serait dégradé. Cette mutation pourrait également exercer un effet cardiovasculaire protecteur (284).

Cette mutation a ensuite été mise en évidence dans une cohorte Grecque constituée à partir d'une population isolée crétoise. La fréquence allélique était de 1.9% et le même profil lipidique que dans la population Amish est observé chez les porteurs hétérozygotes de la mutation (282). Le profil lipidique protecteur ainsi que la diminution du risque cardiovasculaire a également été confirmé en population générale (283).

La mutation faux-sens c.127G>A, (A43T) induit un changement d'acide aminé du résidu 23 Alanine en une Thréonine. Cette mutation rare a été mise en évidence chez 3 sujets indiens Maya du Yucatan présentant des concentrations d'apoC-III très faibles (285). Cette mutation modifie la répartition hydrophobique/hydrophile de l'hélice N-terminale. In vitro, le variant apoC-III-Thr-23 ne modifie pas l'inhibition de l'activité LPL, mais sa liaison aux lipides était altérée (285). Les travaux de Sundaram *et al*. ont permis de caractériser la fonctionnalité du variant qui atténue l'assemblage et la sécrétion des VLDL des hépatocytes (279), expliquant son association à des concentration basse de TG (280,286).

Le variant c.55+1G>A, (IVS2+1G->A) est très significativement associé à une diminution des TG plasmatiques (217,280,281). Il est rare avec une fréquence allélique d'environ 0.2% dans la population britannique (287). Ce SNP affecte un site d'épissage en 5', très conservé, en modifiant un di-nucléotide essentiel (GT en AT) du premier exon codon codant pour la protéine ApoC-III. Le variant rare A interrompt donc l'épissage du premier exon codant pour la partie N-terminale de la protéine. Celle-ci contient le peptide signal (1 à 20 premiers acides aminés).

Les variants c.179+1G>T, (IVS3+1G->T) et c.-13-2A>G sont localisés dans l'intron 1 et 3 respectivement. Ils modifient également des sites d'épissage de l'ARNm d'APOC3 (280,286).

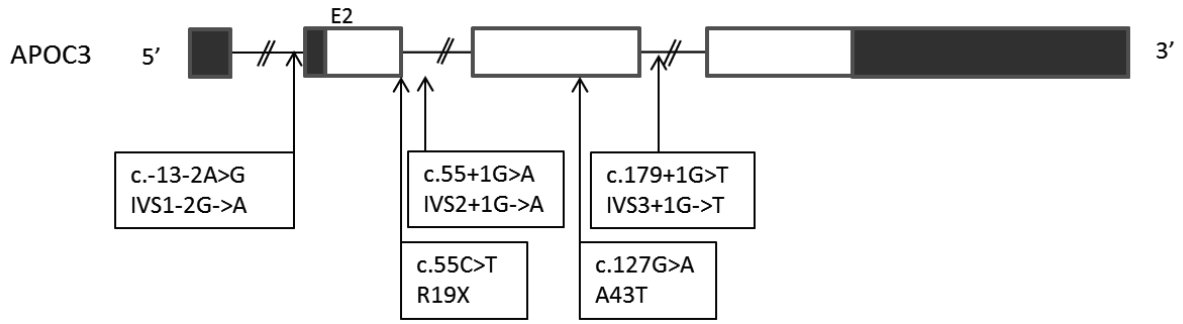


Figure 12 Mutations perte de fonction APOC3 adapté de (281)
E : Exon représenté par des rectangles et région transcrites en blanc, références : se référer au texte. Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_000040.1

1.2.2.3.2.1.2 Polymorphismes associés aux hypertriglycéridémies

Plusieurs polymorphismes d'*APOC3* sont associés aux hypertriglycéridémies et sont répertoriés dans le Tableau 5.

Les polymophismes c.-501C>T et c.-528T>C, sont variants fonctionnels relativement fréquents (30 à 50%). Ils sont localisés dans la région promotrice d'APOC3 : -482C>T et -455T>C et sont significativement associés une augmentation de la triglycéridémie (Tableau 5). Ces variants sont localisés dans une région du promoteur contenant un élément de réponse à l'insuline. En présence des allèles mineurs, l'atténuation de la régulation par l'insuline induirait une augmentation d'expression d'ApoC-III qui pourrait expliquer leur association à la triglycéridémie (288). Des concentrations significativement plus basses ont, en effet, été rapportées chez les porteurs des allèles mineurs comparés aux non porteurs (289,290). Ces variants sont ainsi apparentés à un état d'insulino-résistance à l'échelle moléculaire (288). Ils pourraient appartenir à un haplotype puisque certaines études montrent qu'ils sont en déséquilibre de liaison (291,292).

Ce polymorphisme, c.*40G>C (Sst1), localisé en région 3'UTR**,** est responsable de la création du site d'enzyme de restriction de SstI. De nombreuses études montrent une association significative avec l'hypertriglycéridémie dans divers groupes ethniques (Caucasiens, Asiatiques, Arabes, Africains) (Tableau 5). Les patients porteurs de l'allèle mineur (S2) ont une concentration d'apoC-III plasmatique plus importante que les non porteurs (293–297). Ainsi ce variant pourrait être impliqué dans la régulation d'expression d'*APOC3*. Il est également significativement associé à l'hyperlipémie combinée familiale

associant une hypertriglycéridémie et une augmentation du LDL-c (298). Enfin, l'allèle S2 est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire (revu dans (299)). Son mécanisme d'action n'est à ce jour pas élucidé.

Enfin**, le polymorphisme c.102T>C,** est localisé dans l'exon3 et correspond à une mutation silencieuse d'*APOC3*. Il est également associé à une augmentation des TG plasmatiques (Tableau 5). Les concentrations d'ApoC-III plasmatiques sont augmentées en présence de l'allèle mineur (290,300).

1.2.2.3.2.1.3 Haplotype et déséquilibre de liaison

Les polymorphismes du gène *APOC3* et du promoteur ainsi que d'autres polymorphismes du cluster apoAI-CIII-AIV ont été décrit en fort déséquilibre de liaison et pourraient correspondre à des haplotypes favorisant les hypertriglycéridémies (298,301–303). L'analyse de combinaison d'haplotypes du cluster réalisé par Groenejik *et al*. suggère un rôle dominant du polymorphisme SstI dans l'association à l'hyperlipémie combinée familiale (301).

HGVS*	Numéro rs	Enzyme de restriction	Autre dénomination	Localisation	Références
c.-528T>C	rs2854117	MspI	-482 C>T MspI-C-III	Promoteur	(289,291,303–309)
c.-501C>T	rs2854116	FokI	-455T>C	Promoteur	(289,291,304,310–313)
c.-14+121G>C	rs618354	PvuI		Intron	(314)
c.102T>C	rs4520		-1100C>T G34G	Exon3	(218,300,306,315–317)
c.*40G>C	rs5128	SstI SacI	S2 3238C>G +3175	3'UTR	(152,217,239,291,293,295,296,299,318,319,319–332)
c.*71G>T	rs4225	BbvI	T3293G T3206G	3'UTR	(317,333,334)

Tableau 5. Polymorphismes d'APOC3 associés aux hypertriglycéridémies

*Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_000040.1

1.2.2.3.3 Apolipoprotéine C-II (ApoC-II)

L'ApoC-II est une protéine de 79 acides aminés et a un poids moléculaire de 8.8KDa après clivage du peptide signal de 26 acides aminés dans le RE (335). Elle est codée par gène *APOC2* situé sur le cluster *APOC1-APOC2-APOC4* du chromosome 19q13.2. Elle est synthétisée principalement dans le foie mais de manière moins importante dans l'intestin (336). La structure de la protéine est constituée de 3 hélices amphipathiques. La région N-terminale contient le domaine de liaison lipidique. La région C-terminale est responsable de l'activation de la LPL avec une importance particulière des résidus 63, 66, 69 et 70 (337). L'apoC-II est localisée à la surface des chylomicrons, VLDL et HDL-c dans la circulation périphérique. L'action d'ApoC-II dépend de sa concentration : à faible concentration (env 4mg/dl) elle active la LPL alors qu'à forte concentration elle l'inhibe (261). En effet les souris surexprimant *APOC2* présentent une hypertriglycéridémie par accumulation de VLDL (338). Cependant, la nature exacte de l'interaction entre la LPL et apoC-II et le processus expliquant l'activation de l'activité lipolytique n'est pas encore complètement élucidé (2).

1.2.2.3.3.1 Polymorphismes d'*APOC2*

L'importance d'ApoC-II comme activateur de la LPL chez l'homme est bien démontrée par les cas de patients déficients en ApoC-II qui présentent un phénotype d'hyperchylomicronémie de type 1 identique à celui d'un déficit en LPL (261) Une dizaine de familles porteuses de telles mutations d'*APOC2* a été décrite. Elles représentent la deuxième atteinte monogénique la plus fréquente impliquée dans les hyperchylomicronémies après les déficits en LPL (4). Deux autres mutations non-sens sont associées à des hypertriglycéridémies sévères ou modérées sans inhibition complète de l'activité LPL.

1.2.2.3.3.1.1 Mutations délétères d'APOC2

Ces mutations induisent un défaut de synthèse ou de structure d'ApoC-II et entraînent à l'état homozygote des hypertriglycéridémiess sévère par défaut d'activation de la LPL (Tableau 6). Le phénotype lipidique alors observé est identique à celui des déficits homozygotes en LPL toutefois légèrement moins sévère et se déclarant parfois plus tardivement (2). Plusieurs types de mutations d'*APOC2* ont été décrits : des mutations faux-sens, responsables d'une troncature d'ApoC-II qui n'est soit pas sécrétée ou rapidement dégradée dans la circulation. Deux mutations des sites d'épissage sont associées à une diminution de la concentration plasmatique d'ApoC-II. Enfin des mutations non-sens

induisant des substitutions d'acides aminés déterminant pour la fonctionnalité d'ApoC-II ou pour l'initiation de sa synthèse sont également responsables d'hyperchylomicronémie familiale (Tableau 6). Les porteurs hétérozygotes de ces mutations ont des profils lipidiques normaux (261). Cependant ils présentent des concentrations de TG plus élevées que les sujets sauvages et ont aussi des lipoprotéines plus riches en TG (151).

1.2.2.3.3.1.2 Mutations associées aux hypertriglycéridémies

La mutation c.178G>A (Apoc-II-SF) est associée à une dyslipidémie mixte : élévation du cholestérol total et hypertriglycéridémie modérée (Tableau 6). Les études fonctionnelles du variant ne montrent pas de modification de la capacité à activer la LPL. Cette mutation pourrait modifier un autre site fonctionnel d'ApoC-II tel que le domaine de liaison aux lipides (339).

Une autre **mutation, c.122A>C (Lys19Thr),** est significativement associée aux HTG sévères et modérées. Les porteurs de la mutation ont des concentrations plasmatiques d'ApoC-II normales. La fonctionnalité de cette mutation n'est pas connue mais les prédictions sont en faveur d'une dysfonction probable. La mutation pourrait modifier la structure en hélice amphipatique permettant la liaison aux lipides (151). Néanmoins son effet pourrait dépendre de son association à d'autres facteurs environnementaux ou génétiques telles que des mutations du gène *APOE* (340–342).

Enfin, aucun polymorphisme d'APOC2 n'est associé à la triglycéridémie dans les études GWAS.

HGVS* (numéro rs)	Autre dénomination	Localisation	Phénotype	Fonction	Réf
c.-86A >G		Promoteur	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(343)
Large délétion	Nijmegen CIV-CII	Exon1	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(344)
c.1A>G (rs120074112)	p.Met1Val ApoC-II Paris1	Exon2	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(345)
c.10C>T	R-19X Arg19 Ter ApoC-II-Paris2	Exon 2	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(346,347)
c.55 + 1G> C	IVS2, G-C, +1 ApoC-II Hamburg HphI	Intron2	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(348–350)
	IVS2-30G-A	Intron2	Hyperchylomicronémie familiale	Site d'épissage Déficit ApoC-II	(151)
c.70delC	Gln2Ter	Exon3	Hyperchylomicronémie familiale	Décifit ApoC-II	(351)
c.118del	Val40Ter ApoC-II Nijmegen	Exon3	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(160,348)
c.122A>C (rs120074114)	C2K19T Lys19thr ApoC-II-v	Exon 3	Hyperlipidémie	Hélice alpha amphipathique Liaison aux lipides?	(6,151,341, 342,352)
c.142T>C (rs120074115)	ApoC-II Wakayama Trp26Arg	Exon3	Hyperchylomicronémie familiale		(353)
c.177C>A (rs12007411)	ApoC-II Padova	Exon3	Hyperchylomicronémie familiale		(354)
c.177C>G (rs12007411)	APOC-II Bari	Exon 3	Hyperchylomicronémie familiale		(355)
c.178G>A (rs5122)	ApoC-II SF	Exon3	Hyperlipidémie	Altération de la liaison lipidique ?	(339)
c.255C>A (rs120074116)	Tyr63Ter	Exon4	Hyperchylomicronémie familiale		(356)
c.270delT	apo C-II Toronto	Exon 4	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(357–359)
c.274insC	ApoC-II St Michael Gln70Pro	Exon 4	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(360)
c.281T N C	p.L72P	Exon 4	Hyperchylomicronémie familiale	Déficit ApoC-II	(361)
c.255C>A (rs120074116)	Tyr63Ter	Exon4	Hyperchylomicronémie familiale		(356)

Tableau 6. Mutation du gène APOC2 associé aux hypertriglycéridémies

*Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_000483.4

1.2.2.3.4 Apolipoprotéine C-I (ApoC-I)

L'ApoC-I est une protéine de 83 acides aminés codée par gène *APOC1* situé sur le chromosome 19q13.2 (locus *APOC1-APOC2-APOC4*). Elle est constituée d'un peptide signal de 26 acides aminés qui est clivé dans le RE. La protéine ApoC-I mature contient donc 57 acides aminés et a un poids moléculaire de 6.6 kDa (261). Il s'agit d'une protéine riche en Lysine qui contient des domaines de liaison aux lipoprotéines (362). Elle est principalement exprimée dans le foie mais également dans le poumon, la peau, la rate, tissu adipeux et cerveau (363). L'ApoC-I a une concentration relativement importante chez l'homme (environ 6 à 10 mg/dl) (364,365) et est principalement lié aux VLDL, chylomicrons et HDL (366).

L'inhibition de la LPL par ApoC-I *in vitro* a été démontrée dès les années 1970 (367). Les modèles de souris transgéniques surexprimant le gène *APOC1* humain présentent une élévation importante des TG et une augmentation modérée du cholestérol total. Cet effet a été initialement attribué à un défaut de recapture hépatique médié par ApoE sans modification de la production hépatique ou de la lipolyse des VLDL (261). D'autres études ont ensuite démontré l'inhibition de la LPL par ApoC-I *in vitro et vivo*, de manière dose-dépendante, contribuant ainsi à hyperlipidémie observée chez les souris *APOC1* transgéniques (368,369). Enfin, l'étude de Larsson *et al* a montré que l'ApoC-I et l'ApoC-III inhibent l'activité LPL en la déplaçant des particules lipidiques rendant la LPL ainsi plus vulnérable à l'action d'ANGPTL4 (275).

1.2.2.3.4.1 Polymorphismes d'*APOC1*

Aucun variant fonctionnel du gène APOC1 n'a été identifié dans les facteurs de modulation de la triglycéridémie à ce jour (3).

Un variant localisé dans le promoteur d'*APOC1*, c.-371_-370insCGTT (rs11568822)**,** a été décrit comme associé à l'hypertriglycéridémie. Ce polymorphisme introduit un site de restriction pour l'enzyme HpaI (370). Il est associé à une augmentation d'expression d'*APOC1* (371). Les porteurs de l'allèle mineur présentent des concentrations de TG significativement plus importantes que les non porteurs (372,373). Ce polymorphisme est en fort déséquilibre de liaison avec les polymorphismes du gène *APOE*. Son association avec l'hypertriglycéridémie et l'augmentation des concentrations d'ApoC-I seraient finalement liée aux polymorphismes d'APOE (365).

Enfin aucun polymorphisme d'APOC1 n'est associé à la triglycéridémie dans les études GWAS.

1.2.2.3.5 La famille des protéines angiopoïétine like (ANGPTL)

Les ANGPTL sont des protéines angiopoïétine like. Elles sont caractérisées par une structure commune : une séquence N-terminale ou séquence signal, une séquence spécifique, un domaine superhélice (coiled coil) et un domaine large fibrinogène/angiopoietin-like domaine. Ces protéines subissent, après leur sécrétion, un clivage sérique médié par des proprotéines convertases dont PCSK3. Ces dernières reconnaissent une séquence protéique RRKR. Le rôle des protéines ANGPTL3 et 4 a été revu par Lichtenstein (374).

1.2.2.3.5.1 Angiopoietin proteine-like 4 (ANGPTL4)

ANGPTL4 est une protéine constituée 406 acides aminés, codée par le gène *ANGPTL4,* localisé sur le chromosome 19p13.3. Cette protéine est synthétisée dans les hépatocytes, les adipocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales intestinales, les myocytes, et les macrophages (3). ANGPTL4 subit, avant sa sécrétion, une oligomérisation médiée par des liaisons disulfides sur des résidus Cystéine (Cys^{76} et Cys^{80}) et par de résidus hydrophobes. Une fois sécrétée, elle est clivée en 2 parties au niveau du site $_{161}$RRKR$_{164}$: une portion N-terminale (nANGPTL4) et une portion C-terminale (cANPTL4) (374). A la surface de l'endothélium, ANGPTL4 interagit avec les HSPG et cette interaction est interrompue après administration d'héparine (375).

ANGPTL4 inhibe l'activité LPL *in vitro*. La surexpression d'ANGPTL4 induit une hypertriglycéridémie alors qu'une diminution des TG est observée chez les souris *ko* pour ANGPTL4 (68,376,377). Les souris *Angptl4*-/- présentent également une augmentation du poids corporel et une augmentation de l'accumulation de triglycérides dans l'intestin (378). Le mécanisme d'action d'ANGPTL4 n'est pas encore complètement compris et deux mécanismes sont proposés. Une dissociation du dimère actif de LPL en un monomère inactif médiée par la partie N-terminale d'ANGPTL4 (67,68) et une inhibition non compétitive de la LPL (379). L'inactivation de la LPL est moins importante en présence de lipoprotéines ou de GPIHBP1 (173,380) et inversement la liaison d'ANGPTL4 au complexe LPL-GPIHBP1 diminue l'affinité de la LPL pour GPIHBP1 (381).

ANGPTL4 est régulé par les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Plusieurs études suggèrent un rôle clé dans la régulation de l'activité LPL en période de jeûne ou d'exercice en limitant l'utilisation des acides gras à partir de TG plasmatiques (376,382,383).

1.2.2.3.5.1.1 Polymorphismes d'*ANGPTL4*

La majorité des mutations d'*ANGPTL4* identifiées induit une diminution de la triglycéridémie par défaut d'inhibition de l'activité LPL.

1.2.2.3.5.1.1.1 Mutation délétère c.118G>A (E40K)

La mutation NM_139314.2:c.118G>A (rs116843064, E40K) induit d'une transition d'une glutamine en Lysine sur le résidu 40. Elle est significativement associée à une diminution de la triglycéridémie. Les porteurs de l'allèle mineur présentent une augmentation du HDL-c et une diminution des triglycérides (384–386). La mutation déstabilise la protéine après sa sécrétion en empêchant l'oligomérisation d'ANGPTL4 qui est alors incapable d'inhiber l'activité LPL (387). De manière surprenante, ce variant conférant un profil lipidique athéro-protecteur est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire (385).

Le polymorphisme T266M (NM_139314.2:c.797C>T, rs1044250) est également significativement associé à une diminution des TG plasmatiques mais son effet serait lié à son déséquilibre de liaison avec E40K (385).

1.2.2.3.5.1.1.2 Mutations rares

Des mutations rares, faux-sens ou non-sens sont associées à une diminution de la triglycéridémie. Elles sont responsables pour la plupart d'une perte de fonction d'ANGPTL4 par défaut de sécrétion complet ou partiel (388). Deux mutations du domaine fibrinogene-like **P251T (NM_139314.2:c.751C>A, rs376328756**) et (**R371Q NM_139314.2:c.1112G>A, rs779488814)** sont associées à une augmentation des TG mais leurs fonctionnalités ne sont pas connues (388) (Figure 13).

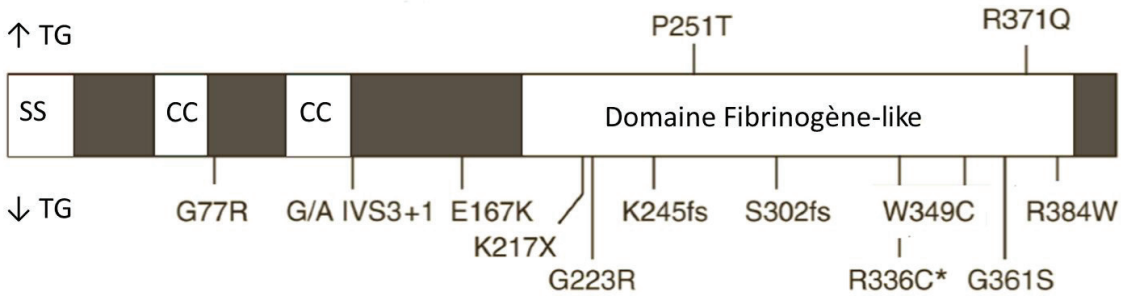


Figure 13. Mutations du gène ANGPTL4 associées à la triglycéridémie d'après (384)

Représentation schématique du gène ANGPTL4, SS : séquence signal, CC : domaine coiled coil

1.2.2.3.5.1.1.3 Polymorphismes associés à la triglycéridémie

Aucun polymorphisme d'ANGPTL4 n'est associé à la triglycéridémie dans les études GWAS. En revanche, les polymorphismes NM_139314.2:c.548-907C>A (rs7255436) et NM_004218.3:c.*1296C>T rs2967605 sont significativement associés à une diminution du HDL-c (146,153,389).

1.2.2.3.5.2 Angiopoietin proteine-like 3 (ANGPTL3)

ANGPTL3 est une protéine de 460 acides aminés, codée par le gène *ANGPTL3* situé sur le chromosome 1p31.1-p22.3 et situé dans l'intron du gène DOCK7. Comme ANGPTL4, elle subit, avant sa sécrétion, une oligomérisation par des liaisons disulfides. Elle est ensuite clivée, après sa sécrétion au niveau du site $_{221}$RAPR$_{224}$. Elle est exprimée presque exclusivement dans le foie (374). Elle pourrait être activée par ANGPTL8 (390,391).

Les souris ko *Angptl3*$^{-/-}$, comme les souris *Angptl4*$^{-/-}$, présentent une augmentation de l'activité LPL post-héparinique et une diminution des triglycérides plasmatiques (376). Cependant ANGPTL3 inhibe l'activité LPL selon un mécanisme différent d'ANGPTL4 (392). Clivée ou non, ANGPTL3 facilite l'inactivation protéolytique de la LPL par des proprotéines convertases. Elle favorise ainsi le clivage de la LPL de la surface cellulaire et inhibe les fonctions catalytiques et non catalytiques de la LPL (393).

1.2.2.3.5.2.1 Polymorphismes d'ANGPTL3

Chez l'Homme, des polymorphismes d'ANGPTL3 sont associés à la triglycéridémie. On distingue des mutations délétères entraînant une perte de fonction d'ANGPTL3 qui induisent un phénotype d'hypolipidémie combinée familiale. D'autres mutations rares sont associées à la triglycéridémie. Enfin, des SNPs localisés en région non codantes sont également associés à la triglycéridémie.

1.2.2.3.5.2.1.1 Mutations perte de fonction

Des mutations faux-sens, responsable d'un défaut d'ANGPTL3, ont été identifiées chez des patients présentant une hypolipidémie combinée familiale correspondant à des concentrations basses de TG, HDL-c et de LDL-c (Tableau 7). Les porteurs homozygotes présentent un défaut d'ANGPTL3 plasmatique et une activité et une masse LPL plus élevée que celle observée chez des témoins (391,394,395). Il s'agit de mutation récessive, les porteurs hétérozygotes ne présentent pas de modification du phénotype lipidiques comparés aux sujets sauvages (396,397).

HGVS*	**Numéro rs**	**Autres dénomination**	**Localisation**	**Références**
c.385G>T	rs2007785483	E129X	Exon 1	(398)
c.50_51delCCinsGA	rs267606625	E17X	Exon 1	(394,398)
c.55delA	rs398122986	p.I19LfsX22	Exon1	(388,397)
c.363_367delCTCAA	rs398122988	p.N121Lx2	Exon1-domaine coiled-coil	(399)
c.439_442delAACT	rs398122987	p.N147X	Exon1	(396,397)
c.1198+1G>T	rs398122985	p.G400VfsX5	Intron6-site d'épissage	(388,397)
c.883T>C	rs398122989	F295L	Exon5	(396)

Tableau 7. Mutation d'ANGPTL3 engendrant une hypolipémie combinée familiale.

** Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_001272001.1*

1.2.2.3.5.2.1.2 Mutations rares

Des mutations non-synonymes rares d'*ANGPTL3*, associées à des phénotypes lipidiques extrêmes : TG < 25ème percentile ou TG > 75ème percentile ont également été identifiés (Figure 14) (388). Les variants associés à une triglycéridémie basse sont associés à un défaut de sécrétion d'ANGPTL3 ou bien altèrent la capacité d'inhibition de la LPL *in vitro*. La fonctionnalité des variants associés à une hypertriglycéridémie sévère n'a pas été étudiée (388).

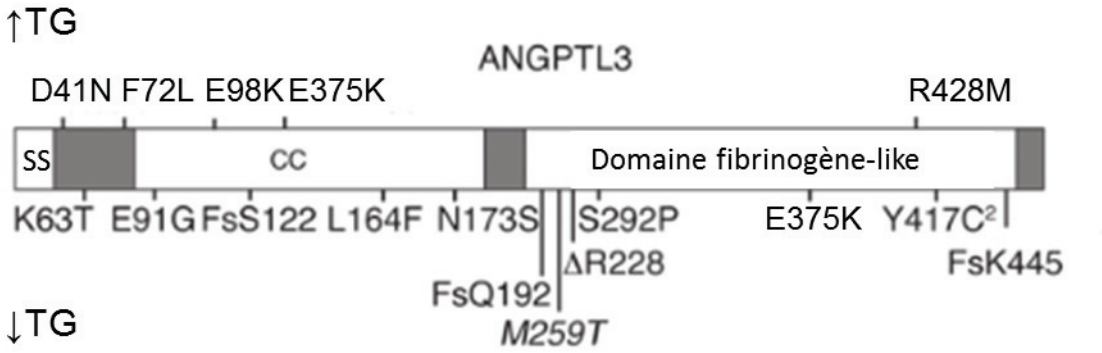


Figure 14 Mutations rares d'ANGPTL3 associées à la triglycéridémie d'après (388).
SS : séquence signal, CC : domaine coiled coil

1.2.2.3.5.2.1.3 SNPs associés à la triglycéridémies

Les études GWAS ont identifié plusieurs polymorphismes localisés à proximité du gène ANGPTL3 significativement associés à la triglycéridémie (Tableau 8). La fonctionnalité de ces polymorphismes n'est à ce jour pas élucidée.

SNP nomenclature HGVS	Numéro rs	Localisation	AM/ Am	FAm	Effet de Am (score)	Réf
c.389+1200T>G	rs10889353	Intron	C/A	0.14	↓TG (-0.126)	(400)
			A/C	0.33	↓TG (-0.02)	(153)
c.1801-668G>A	rs1748195	Intron	C/G	0.30	↑TG (7.12)	(146)
				0.22	↓TG (-5.8)	(401)
					↓ TG (-0.030)	(141)
c.2200-1051C>A	rs2131925	Intron	T/G	0.32	↓TG (-4.94)	(389)
					↓TG	(402)
					↓TG	(146)
c.4644+899C>T	rs1168029	Intron	A/G	0.30	↑TG 0.13	(403)
NC_000001.11: g.62726106C>T	rs12130333	Intergénique	C/T	0.22	↓TG (-0.11)	(119)
					↓TG	(404)
					↓ TG	(236)

Tableau 8. SNPs associés d'ANGPTL3 associés à la triglycéridémie

**Nomenclature internationale HGVS séquence de référence : NM_001272001.1, AM : Allèle majeur, Am : allèle mineur, Fam : fréquence de l'allèle mineur, score : score de corrélation statistique de l'effet de l'allèle mineur, considéré comme significatif pour $P<0.05$*

1.2.2.3.5.3 Angiopoietin proteine-like 8 (ANGPTL8)

ANGPTL8, également dénommé lipasine, RIFL (Re-feeding Induces in Fat and Liver), betatrophin, a été simultanément identifiée par plusieurs équipes comme impliquée dans la régulation du métabolisme lipidiques (390,405–407). ANGPTL8 est une protéine de 198 acides aminés présentant une structure similaire à ANGTL3 et 4 mais dont le domaine C-terminal (angiopoietin-like domaine) est manquant (405,406). Elle est codée par le gène C19orf80 (chromosome 19 open reading frame 80) situé dans l'intron du gène DOCK6.

Chez l'homme, ANGPTL8 est exprimée majoritairement dans le foie et en moindre importance dans le tissu adipeux, cerveau, rectum et cœur. Chez la souris, elle est exprimée dans le foie, le tissu adipeux brun et blanc et également en moindre importance dans le rein et l'intestin (390,405,406). L'expression d'ANGPTL8 est induite par la prise alimentaire (390). Les souris ko pour ANGPTL8 *Angptl8*$^{-/-}$, ont des concentrations de TG plus basses et une augmentation de l'activité LPL (408,409). Inversement la surexpression d'*ANGPTL8*

augmente la concentration de TG plasmatiques et induit une diminution de l'activité LPL(405,409). ANGPTL8 pourrait induire une inhibition de l'activité LPL soit directement ou par activation d'ANGPTL3. En effet ANGPTL8 favorise le clivage d'ANGPTL3 et la surexpression d'ANGPTL8 chez des souris *Angptl3*$^{-/-}$ n'induit pas d'hypertriglycéridémie (390).

1.2.2.3.5.3.1 Polymorphismes d'*ANGPTL8*

Un polymorphisme, NM_020812.3:c.2136A>G (rs737337) d'ANGPLT8 est associé à une diminution du HDL-c dans les GWAS. Un autre polymorphisme NM_018687.6:c.175C>T (rs2278426, R59W, c.194C>T) responsable d'une transition d'un résidu Tryptophane en Arginine en position 59 est significativement associé à une diminution du LDLc et HDLc mais sans modification des TG plasmatiques (389,390).

1.2.3 Synthèse de la LPL et exposition dans la lumière des capillaires

La LPL est synthétisée dans les cellules parenchymateuses, elle est ensuite exportée vers la lumière des capillaires qui correspond à son site d'action. La sécrétion de la LPL dépend de LMF1, une protéine transmembranaire localisée dans le RE détaillée précedemment (*cf 1.2.2.1*) (36). En cas de mauvais repliement de la LPL, elle peut être dégradée par le protéasome dans le RE. La LPL est transportée depuis son site de synthèse jusqu'à son site d'action, la lumière des capillaires, par la protéine GPIHBP1 détaillée précedemment (*cf 1.2.2.2*). Cette protéine liée à la LPL serait capable de circuler de manière bidirectionnelle à travers les cellules endothéliales (164,410). La liaison de la LPL aux HSPG joue également un rôle dans la sécrétion de la LPL. Celle-ci permet la diminution de la dégradation intracellulaire de la LPL ainsi que la diminution de son internalisation et dégradation (411,412). Les HSPG sont localisés dans des « rafts » à la surface des cellules endothéliales au niveau des capillaires des tissus sécrétant la LPL. Ils constituent ainsi des stations d'ancrage pour la LPL (157) et constitue également une plateforme favorisant l'interaction de la LPL avec les LRTG facilitant leur liaison du fait de leurs charges négatives (413–415).

1.2.4 Margination des LRTG

Pour que la lipolyse soit possible, les lipoprotéines doivent être localisées à proximité de la LPL c'est-à-dire sur la face luminale des capillaires et doivent s'y « arrêter ». Ce phénomène est dénommé la margination des LRTG. Le complexe LPL-GPIHBP1 pourrait être nécessaire à la margination (48). Bien que ce processus puisse être bloquée par l'héparine, la liaison de la LPL aux HSPG ne semble pas être impliquée (48).

1.2.5 Hydrolyse des LRTG

Les LRTG liés à la LPL subissent l'hydrolyse de leurs TG, libérant des acides gras libres et entraînent leur relargage sous forme de remnants. En période post prandiale, les chylomicrons entrent en compétition avec les VLDL pour le métabolisme des triglycérides par la LPL, et constituent un substrat préférentiel pour la LPL (416,417). En effet, la LPL a une affinité 50 fois plus importante pour les chylomicrons que pour les VLDL (418). La lipolyse des VLDL post-prandiaux génère deux fois plus d'acides gras non estérifiés que la lipolyse des VLDL produits à jeun (419).

1.2.6 Défaut de lipolyse intravasculaire et hyperchylomicronémies

Un défaut de lipolyse intravasculaire est reponsable d'une diminution ou abolition de clairance des LRTG et engendre des hyperchylomicronémies. Elle se définie par la persistence de chylomicrons plasmatiques à jeun, qui correpond habituellement à une hypertriglycéridémie supérieure à 10mmol/L (certaine équipe utilisant un seuil à 15 mmol/l) (4). Les hyperchylomicronémies correspondent aux hyperlipoprotéinémies de type V le plus souvent (chylomicrons et VLDL) et plus rarement aux hyperlipoprotéinémies de type I (chylomicrons uniquement).

Les symptômes de l'hyperchylomicronémie apparaissent habituellement dès la période néonatale (allaitement) ou tôt dans l'enfance en cas d'atteinte monogénique : il s'agit de douleurs abdominales et de pancréatites. Cependant, certains patients présentent peu de symptômes jusqu'à l'âge adulte, sutout dans les formes polygéniques. Le diagnostic peut alors être posé fortuitement à l'occasion d'un bilan lipidique systématique, ou lors de la survenue

d'une complication aiguë la plus fréquente et la grave étant la pancréatite aiguë. D'autres symptômes sont retrouvés lors des hyperchylomicronémies : des xanthomes éruptifs sont rares (<1% des cas), une lipémie rétinienne sans altération de la vision, une hépatosplénomégalie ou une hépatomégalie quasi constante. Le risque cardiovasculaire pourrait être augmenté chez ces patients (420).

Les formes monogéniques correspondent aux hyperlipoprotéinémie de type I, il s'agit de pathologies rares avec une prévalence entre $1/10^5$ à $1/10^6$ dont l'étiologie la plus fréquente est le déficit familial en LPL (revue dans (421). Les formes polygéniques correspondent habituellement aux hyperlipoprotéinémies de type V. Leur prévalence est estimée à 1/600 et elles correspondent à l'association de facteurs génétiques prédisposant souvent à l'état hétézygotes. La mesure de l'activité LPL post-héparinique permet de préciser le diagnostic, le dosage de la protéine LPL (LPL masse) par ELISA est également utilisé ainsi que la recherche de mutations qui est largement employée.

1.3 RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE

Le terme épigénétique a été introduit pour la première fois en 1942 par Conrad Waddington pour décrire « la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, qui font apparaître le phénotype » (422). L'épigénétique se définit aujourd'hui par l'étude des modifications de l'expression des gènes n'impliquant pas d'altération de la séquence de l'ADN. Ces modifications peuvent être héritables, réversibles et soumises à des facteurs environnementaux (423,424). Les mécanismes de régulation épigénétique peuvent être séparés en trois types différents : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'interaction avec les ARN non-codants (Figure 15). Nous aborderons brièvement les mécanismes sous-tendant la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Nous développerons ensuite en détails la régulation épigénétique par les microARNs qui fait l'objet de nos travaux.

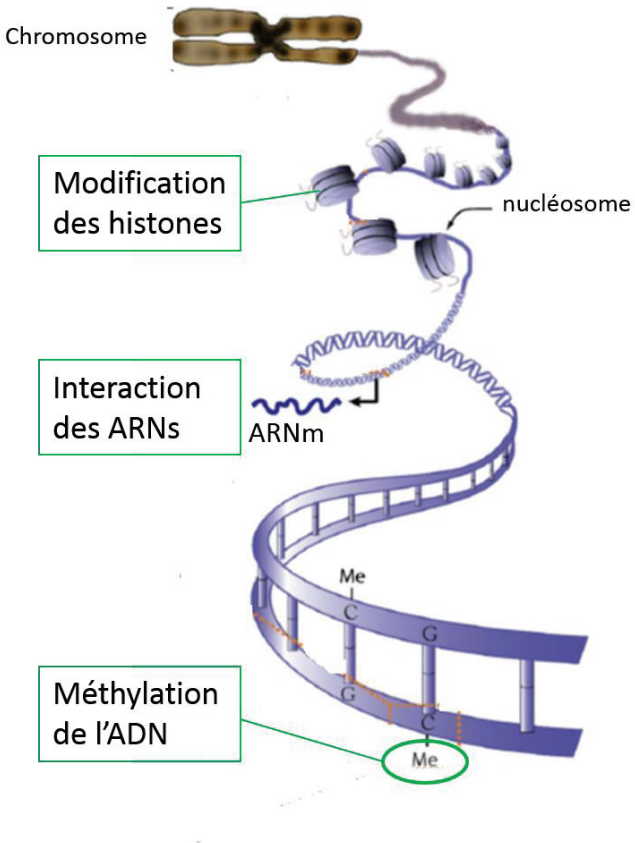


Figure 15 Régulation épigénétique adaptée de (425)

1.3.1 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à la modification covalente par méthylation d'une Cytosine positionnée en 5' d'une base Guanine formant un di-nucléotide CpG. Cette méthylation est catalysée par plusieurs DNA méthyltransférases (DNMT). C'est un mécanisme clé de la régulation de l'expression des gènes transcriptionnelle. La méthylation de la cytosine en 5-méthylcytosine empêche la transcription du gène en modulant la liaison des facteurs de transcription (426,427) ou bien en favorisant le recrutement et la liaison de complexes inhibiteurs de la transcription (428). La méthylation de l'ADN est ainsi impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la différentiation cellulaire, l'expression tissu-spécifique des gènes, l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique (429). Des méthylations aberrantes de l'ADN peuvent également être impliquées dans le développement de pathologies, notamment cancéreuses (430).

1.3.2 Modification des histones (chromatine)

La modification des histones ou chromatine correspond à des modifications post-transcriptionnelles covalentes des protéines d'histone. L'unité fondamentale de la chromatine correspond au nucléosome qui est constitué de 147 paires de base d'ADN génomique enroulées autour d'un octamère de 4 noyaux histones (H3, H4, H2A, H2B). La structure des histones est globalement globulaire mais leur « queue » N-terminale est peu structurée. Les histones peuvent subir une grande variété de modifications covalentes telles que des acétylations, méthylations, phosphorylations ou ubiquitinination qui ont lieu principalement au niveau de la « queue » N-terminale (431). Ces modifications sont, en principe, préservées lors des divisions cellulaires et donc sont considérées comme des mécanismes épigénétiques héritables.

L'impact des modifications des histones peut être la rupture de contact entre les nucléosomes pour « démêler » la chromatine la rendant ainsi « accessible » pour la transcription. Elle peut également conduire au recrutement d'autres protéines pour l'exécution des fonctions de l'ADN telles que la transcription d'un gène, la réparation de l'ADN, réplication de l'ADN ou la condensation chromosomique (431,432).

Enfin, des modifications aberrantes des histones et la dérégulation des gènes induites par ses modifications sont impliquées dans le développement de néoplasie et d'autres pathologies (433) auto-immunes (434) maladie neuro-dégénérative (435), psychiatrique.

1.3.3 Interaction avec les ARN non codants

Diverses classes d'ARN non codant, des petits ARN au longs ARN, ont été mises en évidence et semblent être des régulateurs clé de l'expression des gènes, de la stabilité de génome ou de défense contre des éléments étrangers (436).

Les petits ARN non codants peuvent modifier la chromatine et inhiber la transcription par le recrutement de complexes liés à l'Argonaute et contribuer au recrutement des histones et des méthyltransférases revu dans (436). Plus récemment, de longs ARN non codants associés à la chromatine ont été mis en évidence. Ils peuvent recruter des complexes impliqués dans la modification de la chromatine indépendamment de petits ARN non codants (437). Certains longs ARN non codant sont considérés comme des échafaudages indispensables à la coordination de l'ensemble du complexe modificateur des histones (438).

Les microARN, sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes (7) et de petits ARN non codants ainsi que les longs ARN non codants ont récemment émergé et sont impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine (439,440).

1.3.3.1 Les MicroARNs

La découverte des microARNs (miR) par Lee et al. en 1993, a apporté de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de régulation épigénétique de l'expression du génome humain (441). Les miRs sont de petites séquences d'ARN d'environ 22 nucléotides non codants se liant aux séquences non traduites en 3' (3'UTR) des ARN messager (ARNm). Ils sont ainsi capables d'en réguler l'expression de manière post-transcriptionnelle par clivage de l'ARN ou par répression de leur traduction (7).

1.3.3.1.1 Classification et nomenclature des microARNs.

On dénombre actuellement environ 2500 miRs chez l'homme qui sont répertoriés dans la base données miR-base (http://www.mirbase.org/) (442). La fonctionnalité de la plupart de ces miR, identifiés par des techniques de screening d'ARN utilisant des puces par RT-PCR, n'est pas connue (443,444). Parmi eux, 196 familles de miR sont conservées chez les mammifères suggérant un rôle fonctionnel important de ces miRs (443,445).

Face au nombre grandissant de miRs identifiés, un système de nomenclature internationale a été mis en place en 2003 (446). Le nom de microARN commence par l'espèce dans laquelle il a été identifié. Elle est abrégée par la première lettre du nom du genre suivi des deux premières lettres du nom d'espèce (par exemple hsa pour *Homo sapiens*, mmu pour *Mus musculus* etc.). Le suffixe miR pour microARN est suivi d'un numéro d'identification unique. Certain miR peuvent avoir une séquence identique ou très similaire mais sont codés par des loci localisés sur des chromosomes différents. Il est alors adjoint un suffixe supplémentaire soit par une lettre (pour les séquences similaires) ou un chiffre (pour les séquences identiques). Ainsi hsa-miR-29a et hsa-miR-29b sont codés par deux loci différents dont les séquences ne diffèrent que par deux nucléotides. Enfin chaque précurseur de miR est à l'origine de deux miRs matures simples brins présentant des séquences similaires mais non identiques. Le miR originaire de l'extrémité 3' est nommé -3p et celui issu de l'extrémité 5', -5p. Par exemple, hsa-miR-29b-1-5p correspond au bras 5' du mir mature 29b codé par un locus du chromosome 7 ayant une séquence identique à hsa-miR-29b-2-5p codé par un locus du chromosome 1 (Figure 16).

Par exception, les premiers miRs identifiés sont dénommés en fonction de leur phénotype (par exemple lin-4, let-7 ou lys-6).

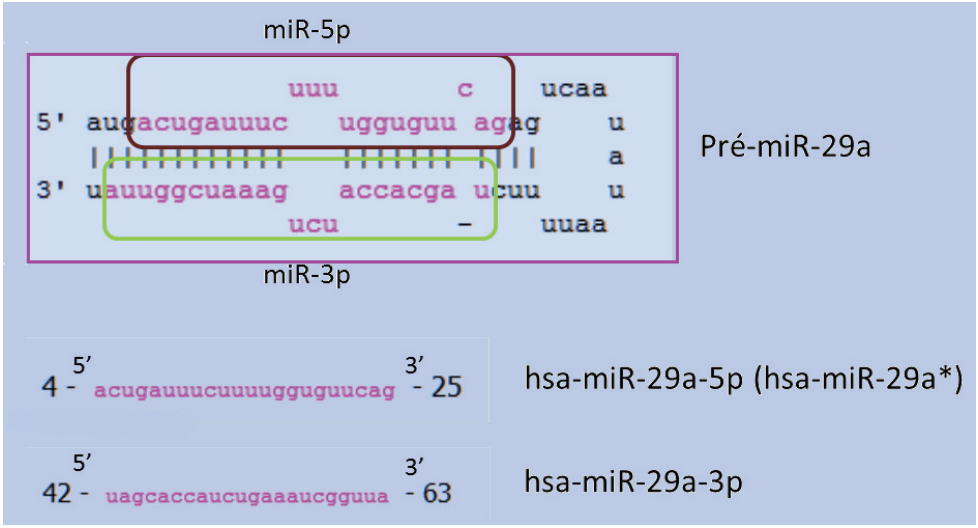


Figure 16 Séquence du pré-miR-29a et séquence des miRs matures issus de ce pré-miR.

1.3.3.1.2 Les gènes des microARN

Les gènes codant les miRs sont répartis sur l'ensemble du génome. La majorité des miRs sont codés par des introns de gène codant pour des protéines ou dans des régions « intergéniques » au sein d'unité de transcription non-codante pour des protéines. Les séquences des miRs sont souvent organisées en cluster de plusieurs miRs qui partagent les mêmes mécanismes de régulation de la transcription. Plus rarement, les miRs peuvent être codés par des exons dans environ 10% des cas (447).

1.3.3.1.3 Biogénèse des miRNA

1.3.3.1.3.1 La transcription du microARN primaire

La transcription des miRs est dépendante de deux ARN polymérases : ARN Pol II et ARN Pol III. L'ARN Pol II est impliquée dans la transcription des ARN messagers et d'ARNs non codants. Les gènes des miRs localisés dans les introns de gènes codant pour des protéines ainsi que les miRs intergéniques sont transcrits par l'ARN Pol II (448,449). L'ARN Pol III est généralement impliquée dans la transcription de l'ARN de transfert ou ribosomal. Certains miR localisés dans des régions riches en ALU ainsi que des miRs viraux sont

transcrits par ARN Pol III (450,451).

La transcription génère un miR primaire (pri-miR) d'environ 1000 nucléotides qui se replie sous forme de boucle en épingle à cheveux (hairpin) correspondant à une structure double-brin présentant des séquences partiellement complémentaires induisant des mésappariements formant des boucles au sein de la structure double brin (Figure 14). Les gènes de miRs organisés en cluster sont transcrits en un ARN polycistronique, le pri-miR est alors structuré en plusieurs structures en épingle à cheveux (Figure 17).

1.3.3.1.3.2 Maturation nucléaire en pré-microARN

Dans le noyau, le pri-miR est clivé en un précurseur de miR (pré-miR). Cette étape de la maturation fait intervenir un complexe multi-protéique le microprocessor (452,453). Il s'agit d'un complexe d'environ 650 kDa dont le cœur est constitué par l'enzyme Drosha (454) protéine DGCR8 (455) (Digeorge syndrom Critical Region gene 8) encore nommée Pasha chez C. Elegans et Drosophila melanogaster (452) (Figure 17).

Tous deux possèdent des domaines de liaison aux ARN double brins, dsRBD (double-strand RNA-Binding Domain) qui favorisent la liaison du complexe microprocessor au pri-miR. L'enzyme Drosha appartient à la famille des ARN polymérase III. Elle est responsable du clivage du pri-miR approximativement à 11 paires de bases de la jonction « basale » située entre l'ARN simple brin et l'ARN double brin, et environ à 22 paires de bases de la jonction « apicale » entre l'ARN double brin et la boucle terminale (456,457). Il en résulte un pré-miR d'environ 70 nucléotides possédant également une structure en épingle à cheveux. Seuls les deux nucléotides de l'extrémité en 3' sont libres pour permettre la liaison de l'exportine-5. Cette protéine permet le transport du pré-mir du noyau vers le cytoplasme selon un mode de transport identique à celui des ARN de transfert (458,459).

1.3.3.1.3.3 Maturation cytoplasmique

Dans le cytoplasme, le pré-miR est clivé par l'enzyme Dicer au niveau de la boucle terminale pour former un duplex miR/miR* transitoire d'environ 20 paires de bases. Il est constitué de mésappariement de nucléotides et contient deux nucléotides libres à l'extrémité 3' préférentiellement reconnu par l'enzyme Dicer (460). Du fait de la structure caractéristique en tige-boucle lié aux mésappariements des bases, lors du clivage du pré-miR, deux miR matures simples brins présentant des séquences similaires mais non identiques sont libérés.

Ainsi chaque pré-miR est donc à l'origine de deux miARN matures -5p et -3p mais l'un des bras est habituellement prépondérant et biologiquement plus actif que le second correspondant au miR* qui est rapidement dégradé (461).

Cette enzyme est une RNA polymérase III, elle contient un domaine de liaison à l'ARN dsRBD et un domaine PAZ (PIWI-AGO-ZWILLE) permettant la liaison à l'extrémité terminale de l'ARN double brin (462,463). Dicer interagit avec d'autres protéines possédant des domaines dsRBS : TRBP (HIV1 TAR RNA Binding protein) et PACT (PRKRA)(464,465).

Enfin, le miR mature est intégré à un complexe protidique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) assemblé à partir de la protéine Argonaute AGO2, elle-même recrutée par TRBP complexée à l'enzyme Dicer (466). Le complexe ribonucléoprotidique RISC est alors assemblé autour du miR-mature et le brin complémentaire est généralement dégradé (467). Ainsi le miR mature est associé au RISC formant le complexe miRISC (miRNA-mediated-Silencing-Complex) capable de se lier à son l'ARNm cible par une petite séquence complémentaire selon la complémentarité des bases de Watson–Crick (8) (Figure 17).

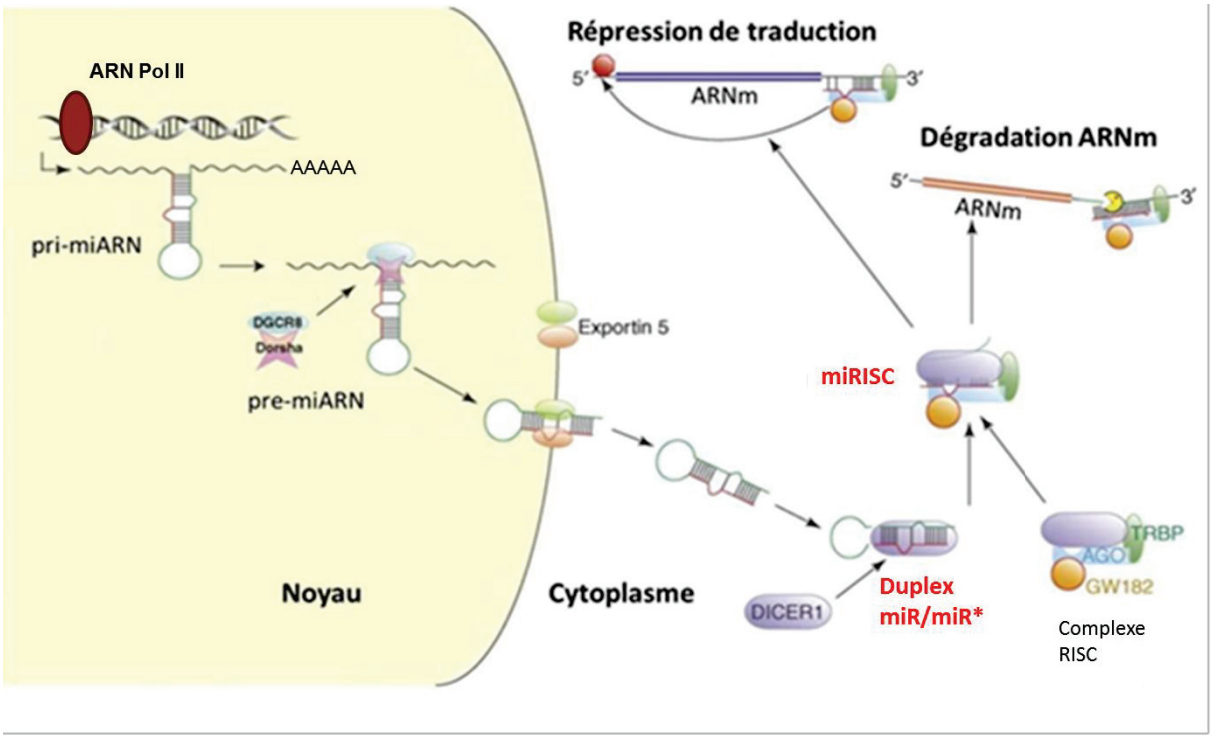


Figure 17 Biogénèse des microARNs adaptée de (468)

1.3.3.1.4 Régulation de l'expression des microARNs

L'expression des miRs est fortement régulée de manière tissu-spécifique mais également au cours du temps. Le développement d'outils de plus en plus précis pour la quantification de l'expression des miR ont permis d'en étudier les profils d'expression. Il est intéressant de noter que la maturation des miRs est également régulée puisque de l'expression des précurseurs de miR ne correspond pas strictement à l'expression des miRs matures (469). Tous les mécanismes de régulation des miRs ne sont pas à ce jour élucidés mais il existe plusieurs voies de régulations.

1.3.3.1.4.1 Régulation transcriptionnelle

Les miRs localisés au sein d'intron de gènes codant pour des protéines présentent généralement le même profil d'expression de leurs gènes hôte suggérant un promoteur commun (447,470). Néanmoins, selon l'étude du positionnement des nucléosomes sur les séquences de miR, environ un tiers des miRs introniques possèdent des régions promotrices indépendantes de leur gène hôte (471). Les autres miRs, localisés dans des régions intergéniques ou bien codé en sens inverse de leurs gènes hôtes, sont probablement transcrits à partir de leur propre promoteur (449,472).

Des éléments de régulation de la transcription tels que des séquences contenant des boîtes TATA ont été mises en évidence à proximité des gènes de miR. Plusieurs séquences consensus de liaison de facteur de transcription tels que NFK-B, c-Myc, CREB ou MyoD ont également été identifiées à proximité des gènes de miR (473–477) et la régulation par les facteurs de transcription p53, MYC, ZEB1 et ZEB2 et MYOD a été démontrée (478,479) Enfin, il est possible que d'autres éléments de régulation spécifiques des promoteurs de miR existent.

1.3.3.1.4.2 Régulation épigénétique

La plupart des mécanismes de régulation épigénétique connus pour les gènes codant pour des protéines tels que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones sont applicables aux gènes de miR (480). De nombreux exemples d'inhibition de miR induite par des méthylations de leur ADN ont été identifiés et peuvent être impliqués dans le tumorigénèse de divers cancers (revu dans (480)).

1.3.3.1.4.3 Les isoformes de miR

Il existe plusieurs isoformes de miR qui sont issus des pré-miR ou des miRs matures après diverses modifications telles que l'ajout, la suppression ou l'édition de nucléotides. Les isoformes de miR de l'extrémité 5' sont rares, car cette partie détermine la séquence cible des miRs. Toutefois, certains miRs peuvent produire plusieurs isoformes en 5' qui vont interagir avec des ARNm cibles distincts (443,481).

Les isoformes de miR en 3' sont issus d'extension homo-polymérique des miRs ou "tailing" correspondant à l'ajout de nucléotides à l'extrémité 3' terminale du pré-miR ou miRs matures (revu dans (482). L'uridylation par des enzymes TUT (terminal uridylyltransferase) catalyse l'ajout d'une queue polyU sur l'extrémité 3' du miR. Celle-ci inhibe la progression de l'enzyme Dicer et favorise ainsi la dégradation du miR. L'uridylation du précurseur de let-7 a été particulièrement étudiée, il s'agit d'un mécanisme régulateur important de son expression lors du développement embryonnaire (revu dans (461)).

L'adénylation des miRs permet également de moduler l'expression des miRs. Celle-ci intervient après la maturation par l'enzyme Dicer. Cependant son mécanisme d'action est moins documenté. Dans certains cas, l'adénylation du miR permet la stabilisation du miR tel que pour miR-122 dans le foie (483) alors que l'adénylation de miRs hôtes facilite leurs dégradations (484).

L'édition de l'ARN est également impliquée dans la régulation de la biogénèse des miRs. Il s'agit d'une modification sélective sur l'ARN double brin de l'Adénosine en Inosine durant la phase post-transcriptionnelle (485). Cette modification est catalysée par le complexe ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) et peut concerner les séquences de pri-miR, et les pré-miR (486–488). Ainsi, l'édition des miRs permet une régulation de l'expression des microARNs à différents niveaux. Le changement d'une Adénosine en Inosine dans le pri-microARN altère principalement le clivage par l'enzyme Drosha et, par conséquent, sa maturation en pré- microARN (487). La modification du pré-miR par le mécanisme d'édition engendre, quant à lui, un blocage de Dicer et donc, de la formation du duplex miR-miR*. Dans ce cas, soit la variation est reconnue et le pré-microARN n'est pas maturé, soit un microARN mature différent de celui qui aurait dû être produit est synthétisé (489).

Enfin, la méthylation des miRs peut également inhiber la maturation des miRs en

bloquant son interaction avec l'enzyme Dicer (490).

1.3.3.1.4.4 Stabilité des miRs

La régulation de la quantité de miR mature peut être régulée par la stabilité des miRs. Ainsi, le renouvellement et la dégradation des miRs ont été étudiés dans différents systèmes. Plusieurs endonucléases pourraient être impliqué dans le clivage et la dégradation des miRs mais leurs mécanismes d'action spécifiques restent à préciser (461).

1.3.3.1.5 Rôle et mécanisme d'action des miRs

1.3.3.1.5.1.1 Liaison sur ARNm cible

La cible consensuelle des miRs est la région 3'UTR des ARNm. La liaison du miR sur son ARNm cible entraîne généralement une répression de traduction soit par inhibition de traduction ou dégradation de l'ARNm (7). Cependant quelques rares exemples de miR se liant à aux régions 5'UTR ont été rapportés. De manière intéressante, la liaison des miR en région 5'UTR pourrait exercer un effet stimulateur de la traduction par activation des protéines ribosomales (491–493).

La liaison du complexe miRISC sur l'ARNm cible dépend d'une petite séquence complémentaire. Alors que l'on observe une complémentarité des bases complètes selon Watson et Crick chez les plantes (494), des mésappariements sont souvent observés chez les animaux. La complémentarité entre le miR et son site de fixation est généralement complète entre les nucléotides 2 à 8 de l'extrémité 5' du microARN, qui constituent la séquence «seed» (Figure 18). Celle-ci peut être définie en 6mer, 7mer, ou 8mer selon le nombre de nucléotides complémentaires avec l'ARNm cible de 6, 7 ou 8 nucléotides respectivement. La partie 3' du miR s'apparie ensuite partiellement avec le reste de la séquence ciblée en formant des renflements ou « bulges ».

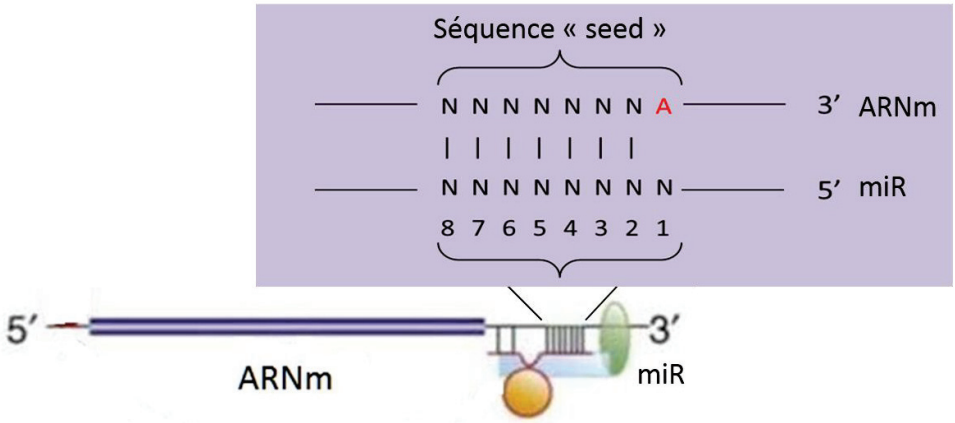


Figure 18 Séquence de liaison d'un microARN sur son ARNm cible ou séquence « seed »

Récemment, l'équipe de Schirle *et al*. a démontré l'importance de la séquence « seed » pour le reconnaissance de ARNm cible. Les nucléotides en position 2 à 5 favorisent des modifications conformationnelles exposant ensuite les nucléotides 2 à 8 et 13 à 16 pour la liaison à l'ARNm cible (495). La présence d'une Cytosine en position 6 pourrait aussi jouer un rôle de pivot dans la liaison avec l'ARNm (496). D'autres nucléotides, situés en dehors de la séquence « seed » sont impliqués dans la liaison à l'ARNm. Le premier nucléotide correspondant classiquement à une Adénosine faciliterait également la reconnaissance de la cible (495). La présence d'une Uridine ou Adénosine en position 9 du miR pourrait également potentialiser l'activité du miR (497). Lorsque l'ARNm cible contient des régions riches en Adénosine et Uridine, une augmentation d'efficacité de liaison des microARNs a été mise en évidence (8,498).

L'identification de la séquence « seed » des miRs a permis de développer des algorithmes qui peuvent aider à déterminer les sites de fixation potentiels de miR sur des transcrits (8,499). Ces logiciels intègrent la complémentarité de séquence avec la séquence « seed », certains implémentent également la conservation au cours de l'évolution de la région ciblée, le calcul de l'énergie de liaison miR-ARNm ou encore le nombre de séquences cibles dans un transcrit donné. Ainsi, chaque logiciel de prédiction a développé un score de probabilité de liaison de miR propre et les prédictions peuvent être différentes d'un logiciel à l'autre. L'étude de la fonctionnalité des miRs est donc complexes et actuellement, seules les études fonctionnelles permettent de valider l'interaction miR-ARNm cible (8).

1.3.3.1.5.1.2 Mécanisme d'action des miRs

1.3.3.1.5.1.2.1 Inhibition de la traduction

Lorsque la séquence du miR est strictement complémentaire de celle de l'ARNm cible, la protéine Ago2 clive l'ARNm au milieu de la zone de fixation (500,501). Ainsi, l'appariement complet engendre une inhibition irréversible de la traduction de l'ARNm du fait de sa dégradation.

Dans la majorité des cas chez l'homme, la complémentarité ne concerne que la séquence « seed », et la régulation le miR exerce une action inhibitrice réversible de la traduction de l'ARNm cible. On distingue deux niveaux d'inhibition différents lors de l'initiation de la traduction ou lors de l'élongation qui sont encore controversés actuellement.

1.3.3.1.5.1.2.1.1 Inhibition de l'initiation de la traduction

La liaison d'un miR sur son ARNm cible perturbe le recrutement des facteurs de traduction. En effet la protéine Ago2 possède la capacité de se fixer de manière compétitive sur la coiffe de l'ARNm au niveau du site de fixation eIF4E (502,503) (Figure 19A). Il s'agit d'un phénomène précoce qui apparaît dans les 15 premières minutes après que l'ARNm ait pénétré dans le cytoplasme (504). Inversement, les ARNm ayant une traduction indépendante de la coiffe ne sont pas soumis à une inhibition par les miRs (505).

La liaison du miR avec sa cible entraîne l'inhibition de l'initiation de la traduction par l'interaction avec les ribosomes. Le complexe miRISC co-précipite avec la sous-unité 60S ribosomale ainsi qu'avec eIF6, qui facilite l'assemblage des sous-unités 40S et 60S empêchant ainsi la formation du ribosome 80S (506) (Figure 19A).

La fixation des miRs entraîne la déadénylation de la queue polyA des ARNm dans le cytoplasme. La déadénylation favorise la dégradation de l'ARNm, et pourrait également contribuer à inhiber la traduction (507). Les protéines Argonautes et GW182 du complexe miRISC pourraient provoquer la déadénylation de la queue polyA, empêchant l'interaction avec la coiffe et de circulariser l'ARNm pour stimuler la traduction (508). Les miRs jouent ainsi un rôle à la fois sur l'efficacité de la traduction et sur la stabilité de l'ARNm.

1.3.3.1.5.1.2.1.2 Inhibition de l'élongation de la traduction

Plusieurs études sont en faveur d'une action inhibitrice de la traduction après son initiation. L'étude du profil des polysomes montre que les miR et les protéines du complexe RISC sont associés aux fractions polysomales (509–511). Ceci suggère une action des miRs durant l'élongation de la traduction. De plus, les miRs inhibent l'expression d'ARN non coiffés dont la traduction est régulée par des sites de recrutement des ribosomes sur l'ARNm les IRES (pour Internal Ribosome Entry Site (512)). Ces miRs pourraient donc induire la terminaison prématurée de la traduction l'induction du détachement des ribosomes (Figure 19B).

1.3.3.1.5.1.2.2 Activation de la traduction des ARNm par les miRs

L'inactivation de la traduction par les miRs est consensuelle. Néanmoins, les mécanismes précis de régulation de la traduction sont encore mal compris et semblent extrêmement variables en fonction du contexte cellulaire. Dans ce rares cas, les miRs peuvent activer la traduction de leur ARNm cible. Cette fonction est encore très controversée et les mécanismes mis en jeu sont mal connus. Par exemple le miR-369-3 a pour cible l'ARNm du *TNFα* (pour Tumor Necrosis Factor α). En phase de quiescence cellulaire, la liaison de miR-369-3 favorise le recrutement de protéines pour former un complexe activateur de la traduction du *TNFα*, et inversement, dans les conditions de prolifération cellulaire, miR-369-3 inhibe la traduction de ce dernier (513).

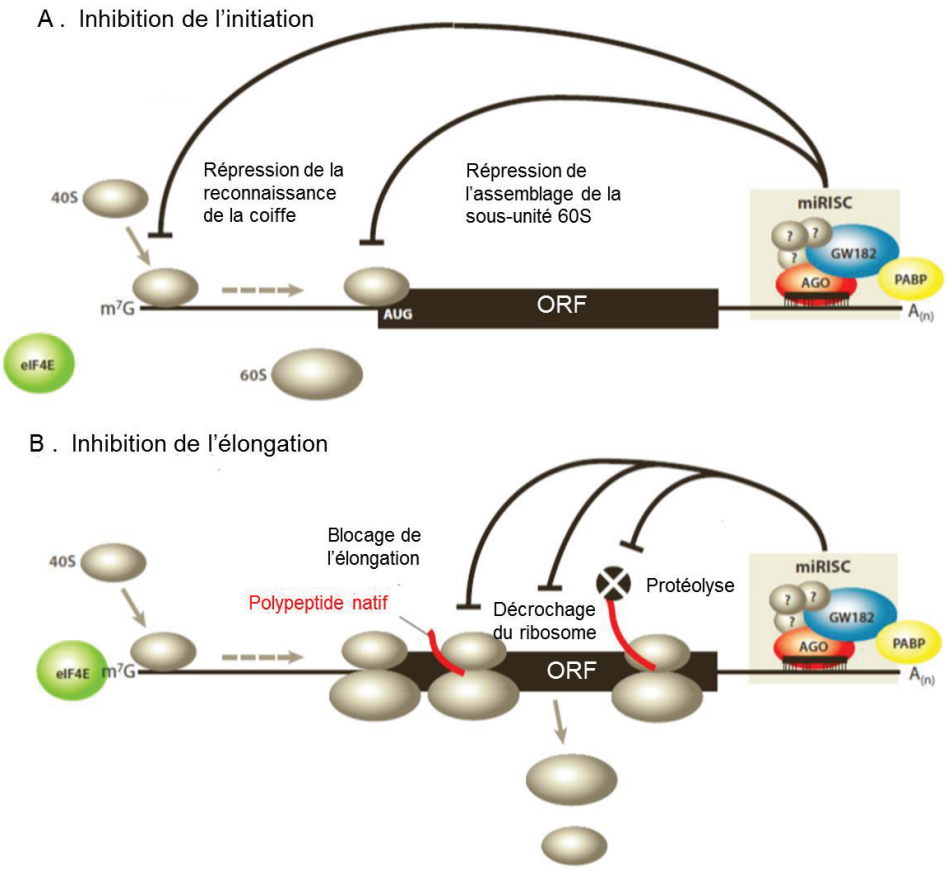


Figure 19 Inhibition de la traduction par les miRs adaptée d'après (514)

1.3.3.1.5.1.3 Localisation de l'activité des miRs : la compartimentation

Les ARNm inhibés par les miRs possèdent une localisation cytoplasmique particulière. Une accumulation des ARNm liés au miR dans les P-Bodies a été rapportée. Ces compartiments cytoplasmiques ont été décrits comme un lieu de dégradation des ARNs (515). De plus, il a été démontré que des protéines du complexe miRISC (Ago1- GW182) sont des éléments essentiels pour la formation des P-Bodies (516,517). Ainsi, l'inhibition de l'expression des ARNm ciblés par des miRs serait localisée dans ce compartiment. Une des hypothèses avancées serait que les miRs répriment l'expression des ARNm ciblés dans le cytoplasme et que cette répression engendre la formation des P-Bodies pour isoler l'ARNm des facteurs traductionnels permettant d'augmenter la capacité d'inhibition de traduction (518).

Les granules de stress constituent un autre compartiment connu pour l'inhibition réversible de l'initiation de la traduction. Du fait de leur proximité avec les P-Bodies, ces deux compartiments peuvent échanger leur matériel. L'accumulation de protéines du complexe RISC a été mise en évidence dans les granules de stress. Une des hypothèses possibles serait la séquestration initale des miRs, liés à leurs cibles, dans les granules de stress, puis leur transfert vers P-Bodies à plus long terme pour la dégradation de l'ARNm (519).

Enfin, les miRs ont également été mis en évidence dans les exosomes. Ainsi les miRs pourraient jouer un rôle dans la communication intercellulaire par leur transmission via les exosomes (520).

1.3.3.2 Rôles physiologiques des miRNA et leur implication dans le métabolisme lipidique

1.3.3.2.1 Rôles physiologiques des miRs

Depuis la découverte des miRs il y a deux décennies, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence leur implication dans divers processus physiologiques. Le premier mir découvert chez le nématode *C.elegans*, lin-4, est essentiel pour la transition du premier au deuxième stade larvaire durant son développement (521). De nombreuses études ont, ensuite, démontré l'implication des miRs dans les étapes du développement qui apparaissent comme des acteurs clés de ce processus finement régulé dans le temps (revu dans (522).

Les miRs sont également impliqués dans la prolifération et l'apoptose, la régulation des boucles de rétrocontrôle, ainsi que dans le maintien de l'intégrité cellulaire (revu dans (523). Le rôle des miRs dans ces différents processus a conduit à la découverte de l'implication des miRs dans le développement tumoral et dans l'altération de la réponse au traitement anti-cancéreux (524).

L'implication des miRs dans la différenciation cellulaire a également été très étudiée. Les miRs peuvent jouer un rôle important lors de la différenciation des cellules souches ainsi que lors de la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (525). A l'avenir, ces implications pourraient déboucher sur le développement de nouvelles thérapeutiques ciblées (526).

1.3.3.2.2 MicroARN et métabolisme lipidique

Les miRs sont des acteurs potentiels de la majorité des processus physiologiques. Le développement des logiciels de prédiction des cibles potentielles de miR couplé à des outils de validation de la fonctionnalité de ces interactions *in vitro* a conduit à l'émergence de nombreux travaux mettant en lumière l'implication des miRs dans différentes pathologies, telles que les maladies inflammatoires, neurologiques, auto-immunes, métaboliques ou cardio-vasculaires. Nous allons développer dans la suite, les données concernant l'implication de miR dans régulation lipidique qui fait l'objet de nos travaux.

1.3.3.2.2.1 Métabolisme du HDL cholestérol

De nombreux miR ont été mis en évidence dans la régulation de l'homéostasie du HDL cholestérol (HDL-c). Ils sont impliqués dans les différents processus du métabolisme du HDL-c sont répertoriés dans le Tableau 9.

1.3.3.2.2.1.1 microARN et efflux du cholestérol

Les miR-33a et miR-33b ont été largement étudiés pour leur implication dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et en particulier le HDL cholestérol (HDL-c). Ces deux miRs sont localisés dans les introns des gènes SREBP2 et SREBP1 respectivement. Ce gène est lui-même impliqué dans la synthèse du cholestérol et des acides gras. Les miR-33 ciblent le gène ABCA1 qui est une protéine clé dans la biogénèse du HDL-c et en inhibent ainsi l'expression *in vitro et in vivo*. En, effet la surexpression du miR-33 induit une diminution de l'efflux du cholestérol vers l'apolipoprotéine A-I. Inversement, l'inhibition de miR-33 induit une augmentation de l'expression d'ABCA1 et parallèlement une augmentation de l'efflux de cholestérol (527–529). Dans un modèle de souris *ko* pour le miR-33, l'augmentation de l'expression d'ABCA1 et une augmentation du HDL-c ont été observées (530). Le miR-33 cible également ABCG1, un autre gène impliqué dans l'homéostasie de HDL-c (527). Enfin, miR-33 est aussi impliqué dans la régulation de l'oxydation des acides gras en ciblant les gènes *CPT1*, *CROT*, *HADHB* (531).

Le gène *ABCA1* possède une région 3'UTR relativement longue ce qui est une caractéristique des gènes régulés par les miRs (532). De manière non surprenante, d'autres miRs ciblant ABCA1 ont été identifiés parmi eux, miR-758, miR-106b, miR-26, miR-144, miR-10b et miR-27a et miR-27b, et ont été validés expérimentalement (revu dans (533,534) (Tableau 9).

miRNA	Gène cible	Fonction	Références
miR-122	*ALDOA* *CS*	Homéostasie glucidique Synthèse du cholestérol Oxydation des acides gras	(535)
miR-10b	*ABCA1, ABCG1*	Efflux du cholestérol	(536)
miR-21	*HMGCR*	Stéatose hépatique Métabolisme TG et cholestérol	(537)
miR-24	*INSIG1*	Synthèse du cholestérol via SREBP	(538)
miR-26	*ABCA1*	Efflux du cholestérol	(539)
miR-27a/ miR-27b	*ABCA1* *ABCG1;SR-B1*	Efflux du cholesterol	(534)
miR-33a/ miR-33b	*ABCA1;ABCG1* *NPC1;CROT* *HADHB;CPT1* *SIRT6;PRKAA1* *IRS2;ABCB11,* *ATP8B1;RIP140* *SRC3*	Efflux du cholestérol Oxydation des acides gras Homéostasie glucidique	(527–529,540–543)
miR-96	*SR-B1*	Transport inverse du HDLc	(544)
miR-106b	*ABCA1*	Efflux du cholestérol	(545)
miR-144	*ABCA1*	Efflux du cholestérol	(536,546)
miR-185	*SR-B1*	Transport inverse du HDLc	(544)
miR-223	*SR-B1,* *HMGCS1,SC4MOL*	Transport inverse du HDLc Synthèse du cholestérol Efflux du cholestérol	(544,547–549)
miR-302	*ABCA1*	Efflux du cholesterol	(550)
miR-370	*CPT1A*	Oxydation des acides gras	(551)
miR-758	*ABCA1* *SLC38a1; NTM;* *EPHA7*	Efflux du cholestérol	(552)

Tableau 9. Les microARNs impliqués dans la régulation du HDLc

1.3.3.2.2.1.2 Recapture hépatique des HDL

Le transport inverse du HDL-c vers le foie pour la synthèse et l'excrétion des acides biliaires se fait par l'intermédiaire d'un récepteur scavenger B-I (SR-BI). Bien que moins étudié qu'*ABCA1*, *SR-BI* est également la cible de plusieurs miRs. Les miR-185, miR-96 et miR-223 sont de puissants répresseurs de l'expression de l'ARNm de *SR-B1* et de son expression à la surface cellulaire. *In vitro*, l'inhibition de ces miRs augmente l'expression de SR-BI et la recapture sélective du HDL-c (544). Le rôle de miR-223 semble prépondérant dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol. Son expression est stimulée par le cholestérol endogène et il agit comme une boucle de régulation par l'inhibition de la synthèse du cholestérol et du transport inverse du cholestérol et en favorisant l'efflux de cholestérol (547).

1.3.3.2.2.1.3 Synthèse du cholestérol et oxydation des AG hépatiques

Plusieurs miRs sont impliqués dans la synthèse du cholestérol et l'oxydation des acides gras dans le foie. Le miR-122 est fortement exprimé au niveau hépatique. Il est considéré comme un miR très important pour le maintien du phénotype hépatique. L'inhibition du miR-122 induit l'augmentation d'expression nombreux gènes normalement réprimés au niveau hépatique. Parmi eux, des gènes impliqués dans la régulation de l'oxydation des lipides. De plus, l'inhibition du miR-122, chez des souris soumises à un régime riche en graisse, réduit la stéatose hépatique due à la réduction de la synthèse du cholestérol et la stimulation de l'oxydation des acides gras (535).

Le miR-370 est impliqué dans la régulation de *CPT1* (pour carnitine palmitoyl transferase), et induit une diminution de l'oxydation des acides gras au niveau hépatique. Ce miR est également capable d'induire l'expression du miR-122 conduisant ainsi à la surexpression de gènes lipolytiques tels que *SREPB1* et *DGAT2* (551). Le miR-21 est surexprimé dans le foie de sujets stéatosiques, il serait impliqué dans la régulation du métabolisme des triglycérides et du cholestérol via son interaction avec *HMGCR* (537).

Le miR-24 est également impliqué dans la synthèse lipidique hépatique par son rôle inhibiteur d'Insig1 (pour insulin-induced gene 1). Cette protéine membranaire du RE permet de réguler la synthèse des lipides en retenant les facteurs de transcription SREBPs dans le RE empêchant ainsi leurs activations. La surexpression d'*Insig1* dans le foie inhibe la lipogénèse

alors que son inhibition conduit à une augmentation des TG hépatiques et plasmatiques (553,554). L'inhibition de miR-24, conduit à l'augmentation d'expression d'Insig1 et à une diminution de l'accumulation des lipides hépatiques. Le processus inverse est observé lors de la sur-expression de miR-24 chez la souris (538).

1.3.3.2.2.2 MicroARN régulant la LPL

La LPL possède les caractéristiques des gènes régulés par les miRs car il possède une région 3'UTR relativement longue de 1948 paires de base. En outre, il s'agit d'un gène très finement régulé et soumis à une régulation post-transcriptionnelle importante (555). Plusieurs études rapportent la liaison de différents miRs avec la LPL.

La LPL est la cible des miR-27a et miR-27b in vitro (534). De plus le miR-27a est impliqué dans la régulation de la LPL durant l'adipogénèse chez la souris en association avec le miR-29a (556). La liaison du miR-29a avec la LPL a également été démontrée dans les cellules dentritiques (557). Au niveau hépatique, ce miR est responsable de la répression d'expression de la LPL chez la souris (558).

La LPL est aussi régulée par le miR-467b au niveau hépatique. L'expression hépatique de ce miR est significativement diminuée chez les souris nourries par un régime riche en graisse. La diminution d'expression du miR-467b est associée à une augmentation d'expression de la LPL (559). MiR-467b régule également l'expression de la LPL dans les macrophages *in vitro* (560). Cette inhibition a ensuite été validée *in vivo* : la diminution de l'expression de la LPL dans les macrophages après surexpression du miR-467b dans un modèle de souris ko pour ApoE (534). Récemment, la régulation de la LPL par le miR-590 dans les macrophages THP-1 a été rapportée (561).

1.3.3.3 Implication des polymorphismes dans l'interaction miR avec leur gène cible

En raison de la petite taille de la séquence « seed » permettant la liaison des miR sur leur ARNm cible, un polymorphisme ou SNP, localisé soit dans le site de reconnaissance du miR soit dans la région d'appariement de l'ARNm-cible peut en modifier la liaison par la création ou la suppression d'un site de liaison (9) (Figure 20).

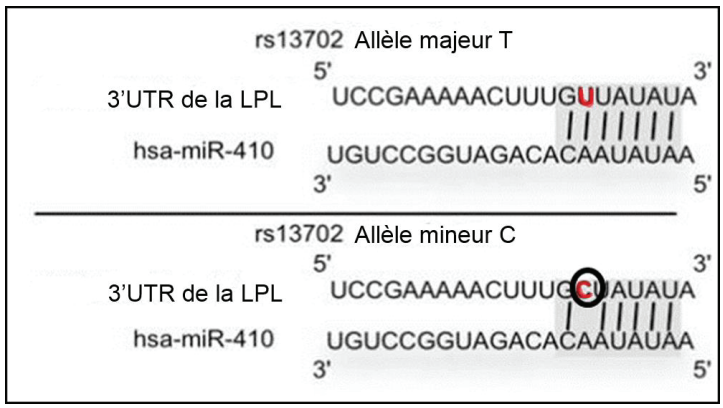


Figure 20 Exemple de modification du site de liaison du miR-410 induite par le SNP rs13702 (140)

La présence de polymorphisme au sein des gènes de miR peut affecter leur biogénèse ou encore altérer la spécificité de leur cible (562). De plus, de nombreux exemples de suppression de site de liaison de miRs induits par des SNPs localisés en région 3'UTR des gènes cibles ont été rapportés. Inversement, la création de sites de liaison de miR « illégitime » a également été décrite dans de plus rares cas (563–567). L'implication des SNPs dans la modulation de la régulation des miRs par les SNPs permet la compréhension de leur fonctionnalité. Elle permet ainsi d'expliquer l'association des SNPs avec des traits phénotypique ou des pathologies.

Un polymorphisme de la région 3'UTR de la LPL associé à une diminution de la triglycéridémie en population générale induit ainsi la suppression du site de liaison du miR-410. En effet, le site de liaison du miR-410 sur la LPL contient le polymorphisme c.*1671T>C (rs13702). En présence de l'allèle mineur C, la liaison du miR-410 est supprimée et conduit à une augmentation de l'expression de la LPL (Figure 20). La suppression de la liaison de miR-410 sur la LPL pourrait donc expliquer l'association du rs13702 à la diminution de la triglycéridémie observée (140). D'autres polymorphismes de la région 3'UTR sont associés à la triglycéridémie y compris dans les études GWAS (*cf* 1.2.6.1.2.2). Ces polymorphismes peuvent potentiellement modifier des sites de liaison de miR et moduler ainsi l'expression de la LPL et, par conséquent la triglycéridémie (568). Ce phénomène peut également concerner les autres gènes impliqués dans la régulation de la LPL. Par example, l'allèle mineur C, du polymorphisme c.*158C>T rs2266788 appartenant à APOA5*2est fortement associé à une augmentation de la triglycéridémie (*cf* 1.2.6.2.2.1.2.1.2). Ce polymorphisme modifie également la liaison de miR en supprimant le site de liaison du miR-3201 (239).

1.4 CONCLUSION DE LA REVUE DE LA LITTÉRATURE ET ENJEUX DU TRAVAIL

La LPL est une enzyme clé dans la régulation de la lipolyse intravasculaire. Ces mécanismes de régulation sont complexes et font intervenir de nombreux processus y compris post-transcriptionnelle. Ceux-ci permettent une régulation fine de la triglycéridémie qui dépend notamment de facteurs génétiques et environnementaux. En effet, la concentration plasmatique des TG est modulée par des facteurs génétiques influençant la lipolyse intravasculaire. Ainsi, un défaut de lipolyse engendre des hypertriglycéridémies sévères (hyperlipoprotéinémies de type I ou V ou hyperchylomicronémies) par défaut de clairance des LRTG. Inversement, des facteurs génétiques favorisant la lipolyse induisent une diminution de la triglycéridémie plasmatique.

De nombreux variants de la LPL et des différents gènes impliqués dans sa régulation sont significativement associés à la triglycéridémie. Ces variants peuvent induirent des mutations délétères des gènes impliqués dans la régulation de la LPL (perte de fonction ou gain de fonction) conduisant à des phénotypes lipidiques extrêmes. D'autres polymorphismes ou single nucleotides polymorphismes (SNP) sont significativement associés à des modulations de la triglycéridémie en population générale.

Pourtant, la fonctionnalité de ces polymorphismes n'est que rarement élucidée. L'association des polymorphismes à la triglycéridémie pourrait être liée à leur association ou déséquilibre de liaison avec d'autres variants fonctionnels localisés sur le même gène ou à distance sur des gènes encore non connus. Elle pourrait également mettre en jeu des mécanismes de régulation non connus à ce jour en particulier dans les régions non codantes. Enfin elle pourrait impliquer une régulation médiée par les miRs.

La découverte des miRs, il y environ deux décennies, a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle du génome. L'interaction des miRs avec les régions 3'UTR de leur ARNm cible démontrent également l'importance des régions non codantes dans la régulation épigénétique. De plus, les polymorphismes, en particulier localisés en région 3'UTR, sont susceptibles de modifier la liaison des miRs et ainsi, de moduler l'expression de leur gène cible. Ces interactions engendrent des changements phénotypiques qui pourraient intéresser la régulation de la triglycéridémie. Ainsi, les polymorphismes localisés en région 3'UTR de la LPL ou de ses gènes régulateurs pourraient

être des facteurs modulateurs de leur expression. Ils pourraient ainsi, réguler l'activité de la LPL et induire une modulation la triglycéridémie.

Le but de notre travail est d'étudier la régulation de la lipolyse intravasculaire médiée par les miRs. Nous avons dans un premier temps étudié l'implication potentielle des SNPs de la LPL et de ses gènes régulateurs, connus pour leurs associations avec la triglycéridémie dans la modification des sites de liaison de miRs à l'aide d'outils bio-informatiques. Nous avons également recherché d'autres polymorphismes de la LPL associés à la triglycéridémie par le séquençage systématique de la région 3'UTR. La fonctionnalité potentielle des interactions entre les SNPs identifiés et les sites de liaison de miRs a ensuite été étudiée.

L'étude des interactions entre les miRs et les polymorphismes de la LPL ou ses gènes régulateurs peut apporter une explication fonctionnelle de leurs associations avec la triglycéridémie. Elle permettra alors de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la LPL et donc de la lipolyse intravasculaire.

2 Deuxième partie :

PRESENTATION DES TRAVAUX

2.1 ARTICLE 1 : " AN APOA5 3'UTR VARIANT ASSOCIATED WITH PLASMA TRIGLYCERIDES TRIGGERS *APOA5* DOWNREGULATION BY CREATING A FUNCTIONAL MIR-485-5P BINDING SITE"

ApoA-V est une apolipoprotéine liée aux chylomicrons et VLDL qui joue un rôle important dans l'activation de la LPL. Des mutations délétères du gène *APOA5* sont responsables d'hyperchylomicronémies familiales par défaut d'activation de l'activité LPL. Le gène APOA5 possède plusieurs haplotypes relativement fréquent composés de polymorphismes en déséquilibre de liaison complet. L'haplotype 2, APOA5*2, est très fortement associé aux hypertriglycéridémies sévères et modérés et les sujets porteurs de cet haplotype présentent une diminution de l'expression post-transcriptionnelle d'APOA5. Cet haplotype bien connu est composé d'un SNP localisé en région 3'UTR : SNP1 (c.*158C>T également dénommé (1891T>C, rs2266788) et de trois autres SNPs : SNP3 (g.-1131T>C, rs662799), c.-3A>G (rs651821) et SNP2 (c.162-43A>G, rs2072560).

Nous avons mis en évidence la création d'un site de liaison fonctionnel pour le miR-485-5p induit par l'allèle rare du SNP1 (c.*158C). Cette création de site de liaison induit une diminution de l'expression d'APOA5 dans des cellules hépatiques *in vitro*. Ainsi nous proposons, pour la première fois, une explication du processus impliqué dans l'effet hypertriglycéridémiant de l'APOA5*2. Nous proposons que la création du site de liaison du miR-485-5p induite par l'allèle rare du SNP1 (c.*158C) serait responsable d'une inhibition post-transcriptionnelle d'APOA5 pouvant expliquer la diminution de son expression et donc son association aux hypertriglycéridémies chez l'homme.

An *APOA5* 3′ UTR Variant Associated with Plasma Triglycerides Triggers *APOA5* Downregulation by Creating a Functional miR-485-5p Binding Site

Cyrielle Caussy,[1,2] Sybil Charrière,[1,2,*] Christophe Marçais,[2,3] Mathilde Di Filippo,[2,4] Agnès Sassolas,[2,4] Mireille Delay,[3] Vanessa Euthine,[2] Audrey Jalabert,[2] Etienne Lefai,[2] Sophie Rome,[2,5] and Philippe Moulin[1,2,5]

APOA5 c.*158C>T (rs2266788), located in the 3′ UTR, belongs to *APOA5* haplotype 2 (APOA5*2), which is strongly associated with plasma triglyceride levels and modulates the occurrence of both moderate and severe hypertriglyceridemia. Individuals with APOA5*2 display reduced *APOA5* expression at the posttranscriptional level. However, the functionality of this haplotype remains unclear. We hypothesized that the hypertriglyceridemic effects of APOA5*2 could involve miRNA regulation in the *APOA5* 3′ UTR. Bioinformatic studies have identified the creation of a potential miRNA binding site for liver-expressed miR-485-5p (MIRN485-5p) in the mutant *APOA5* 3′ UTR with the c.*158C allele. In human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells cotransfected with an *APOA5* 3′ UTR luciferase reporter vector and a miR485-5p precursor, c.*158C allele expression was significantly decreased. Moreover, in HuH-7 cells endogenously expressing miR-485-5p, we observed that luciferase activity was significantly lower in the presence of the c.*158C allele than in the presence of the c.*158T allele, which was completely reversed by a miR-485-5p inhibitor. We demonstrated that the rare c.*158C *APOA5* allele creates a functional target site for liver-expressed miR-485-5p. Therefore, we propose that the well-documented hypertriglyceridemic effect of APOA5*2 involves an *APOA5* posttranscriptional downregulation mediated by miR-485-5p.

Hypertriglyceridemia (HTG [MIM 145750 and 144600]) is a common metabolic disease resulting from complex interactions between genetic and environmental factors.[1,2] Lipoprotein lipase (*LPL* [MIM 609708]) and its regulators, such as apolipoprotein CII (*APOC2* [MIM 608083]), apolipoprotein CIII (*APOC3* [MIM 107720]), and apolipoprotein A-V (*APOA5* [MIM 606368]), play a major role in triglyceride (TG) metabolism. Deleterious mutations in these genes cause hyperchylomicronemia (MIM 144650 and 238600), and various SNPs have been associated with both mild and severe HTG.[2]

ApoAV, encoded by *APOA5*, is a liver-expressed 366 amino acid apolipoprotein that binds to very-low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, and chylomicrons in plasma.[3] Its involvement in TG metabolism was first demonstrated in mouse models: *Apoa5*-knockout mice showed a 4-fold increase in plasma TG concentrations, whereas *Apoa5* overexpression in mice significantly reduced TG levels.[3,4] In mice, apoAV lowers plasma TG levels by increasing lipoprotein lipase (LPL) activity, as confirmed by in vitro and in vivo studies.[5–7] However, its mechanism of TG regulation is still not completely understood.

In humans, *APOA5* plays a critical role in HTG physiopathology. Deleterious *APOA5* mutations were found to be involved in familial hyperchylomicronemia by inducing a LPL activity defect.[8–10] Moreover, two common *APOA5* variant haplotypes modulate triglyceridemia and the expression of mild and severe HTG.[3,10–15] *APOA5* haplotype 3 (APOA5*3) carries the c.56C>G (p.Ser19Trp) polymorphism (rs3135506; RefSeq accession number NM_052968.4), which alters apoAV signal peptide and causes reduced levels of mature peptide in vitro.[16] A second *APOA5* haplotype (APOA5*2) includes the C rare allele of the c.*158C>T SNP (rs2266788; RefSeq NM_052968.4), which is located in the *APOA5* 3′ UTR (previously described as *APOA5* SNP1, c.1891T>C, or c.1259T>C) and is in strong linkage disequilibrium with three additional SNPs: g.4430C>T (rs662799; RefSeq NG_015894.1; previously described as *APOA5* SNP3 or g.−1131T>C), c.−3A>G (rs651821; RefSeq NM_052968.4), and c.162−43A>G (rs2072560; RefSeq NM_052968.4; previously described as *APOA5* SNP2).[3,11] The frequency of APOA5*2 is approximately 7% in populations of European descent and is strongly associated with both mild and severe HTG.[10,14,15] This strong association with plasma TG concentrations was confirmed in genome-wide association studies (GWASs).[12,13,17–19] Clinical data have shown that subjects with the c.*158C minor allele have 20%–30% higher plasma TG levels than do those without this allele.[3] Some studies have also shown a decreased plasma apoAV concentration in subjects with APOA5*2.[20–24] Several arguments have suggested that APOA5*2 might modulate *APOA5* expression at the posttranscriptional

[1]Fédération d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques, Diabète, et Nutrition, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron Cedex, France; [2]Laboratoire Carmen, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1060, Institut National de la Recherche Agronomique U1235, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69621 Villeurbanne Cedex, France; [3]Laboratoire de Biochimie Moléculaire et Métabolique, Centre de Biologie Sud, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, 69495 Pierre-Bénite Cedex, France; [4]Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron Cedex, France
[5]These authors equally contributed to this work
*Correspondence: sybil.charriere@chu-lyon.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.001. ©2014 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

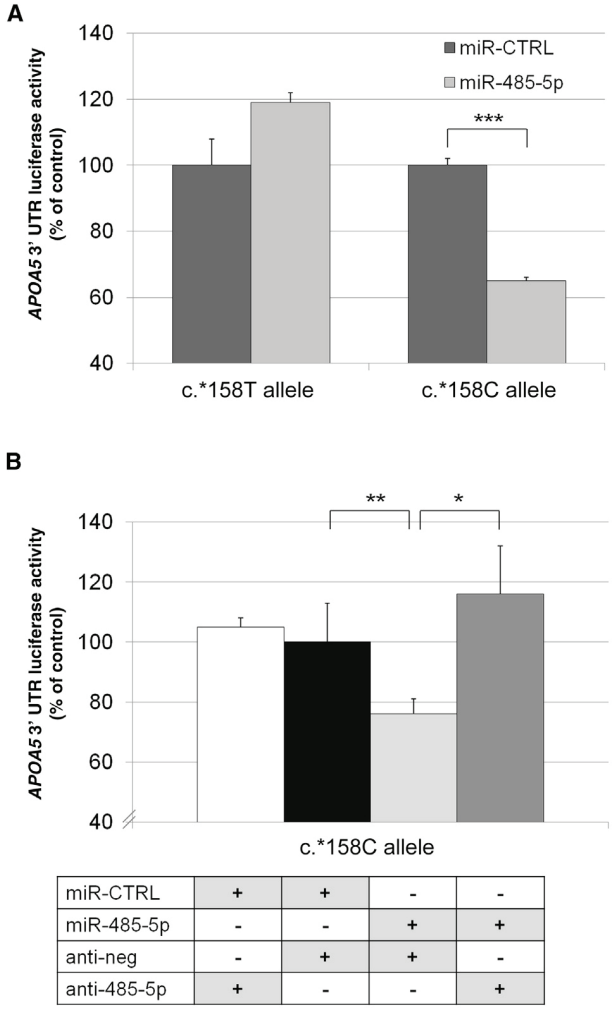


Figure 1. The *APOA5* 3′ UTR with the c.*158C Allele Creates a miR-485-5p Seed Site

(A) Luciferase activity of the pEZX-C or pEZX-T construct with miR-485-5p or miR control (miR-CTRL).

(B) Luciferase activity of the pEZX-C construct with miR-485-5p or miR-CTRL in the presence of either a miR-485-5p inhibitor (anti-485-5p) or a negative control inhibitor (anti-neg).

The *APOA5* 3′ UTR full-length sequence (c.*158T allele) was inserted into pEZX-MT01 (GeneCopoeia, Labomics SA) downstream of a firefly luciferase reporter gene, creating a pEZX-MT01-*APOA5*-c.*158T vector (pEZX-T). Site-directed mutagenesis was performed with the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology) with mutated primers (forward 5′-GGGTGC TGTCTCCTGCACATCCAGCCTCCTGCG-3′ and reverse 5′-CGCA GGAGGCTGGATGTGCAGGAGACAGCAGCC-3′) for introduction of the c.*158C allele, creating a pEZX-MT01-*APOA5*-c.*158C vector (pEZX-C). All constructs were verified by sequencing. HEK293T cells (3×10^5 cells/well) were plated onto 12-well plates 48 hr before transfection and were maintained in a 5% decompleted fetal calf serum 1 hr before transfection. Cells were cotransfected with 800 ng of the pEZX-T or pEZX-C vector and 200 ng of miR-485-5p precursor or scramble nontargeting control (miR-CTRL) (pEZX-MR04 vectors, GeneCopoeia and Labomics). For anti-miR experiments (B), 24 hr before transfections with pEZX-C, HEK293T cells were pretransfected with anti-485-5p or anti-neg (mirVana, Life Technologies; final concentration 30 nM). All transient transfections were performed according to the manufacturer's protocol with the use of ExGen500 transfection reagent (EUROMEDEX) and 5 μl of ExGen500 for 1 μg of DNA. Luciferase activity was measured 48 hr after transfection on cell lysate with the Dual-Glo Luciferase Reporter Assay System (Promega) with a GLOMAX20/20 luminometer (Promega). *Renilla* luciferase activity was used as an internal control for normalizing to the corresponding firefly luciferase activity. All transfection experiments were performed in triplicate and repeated three times. Results are expressed as luciferase activity relative to that of control samples (pEZX-C vector cotransfected with miR-CTRL and anti-neg for miR inhibitor experiments in B). Data represent the mean ± SEM. p values were determined by a Student's paired t test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$). NS, nonsignificant.

level. Similar *APOA5* mRNA levels were found in mice overexpressing human *APOA5*, either wild-type or with APOA5*2.[25] Moreover, *APOA5* mRNA levels were similar in human hepatic biopsies in subjects with either wild-type *APOA5* or APOA5*2.[20] However, the underlying mechanisms involved in APOA5*2 dysfunction remain unknown, e.g., Palmen et al. did not confirm in vitro the hypothesis that within APOA5*2, the c.−3A>G Kozak sequence polymorphism could alter *APOA5* mRNA translation.[24] Consequently, we investigated the potential implication of miRNAs in the posttranscriptional regulation of mutant *APOA5*.

miRNAs are evolutionally conserved 19–22 nucleotides of noncoding RNA that posttranscriptionally downregulate gene expression by binding target mRNAs. This process leads to mRNA degradation or translation repression. Recent data have suggested that miRNAs predominantly decrease mRNA stability through base pairing with the 3′ UTR of target mRNAs. The recognition of target mRNA by miRNA involves a small complementary sequence from 2 to 7 nucleotides long.[26,27] Sequence alteration by SNPs can either generate or destroy miRNA binding sites in mRNAs.[28] Such a finding was reported for obesity-associated c.*2270A>G (rs8887; RefSeq NM_001080400), which creates an illegitimate miR-522 binding site in the 3′ UTR of perilipin 4 (*PLIN4* [MIM 613247]) and promotes its downregulation in adipose tissue.[29]

Within APOA5*2, c.*158C>T is the only SNP located in the 3′ UTR. We hypothesized that the *APOA5* 3′ UTR c.*158C>T rare variant might create an illegitimate binding site for miRNAs and thus result in *APOA5* posttranscriptional inhibition. This could lead to downregulation of lipolysis and a subsequent increase in plasma TG levels.

Using five distinct software tools for miRNA target prediction, we performed bioinformatic studies to determine whether c.*158C>T affects the binding of specific miRNAs (Table S1, available online). First, we used PITA[30] and RegRNA[31] to investigate the potential effect of the c.*158C allele on miRNA target sites and how it compares to that of the c.*158T allele. The miRNA-mRNA binding scores were stronger in the presence of the C allele than in the presence of the T allele for three miRNAs: miR-485-5p (MIRN485-5p) and miR-1255a (MIRN1255a) were predicted by the two programs, whereas miR-3188 (MIRN3188) was only predicted by RegRNA (Table S2). Second, we utilized three additional programs (microRNA.org,[32] TargetScan,[33] and Diana-microT[34]) to confirm the potential binding of

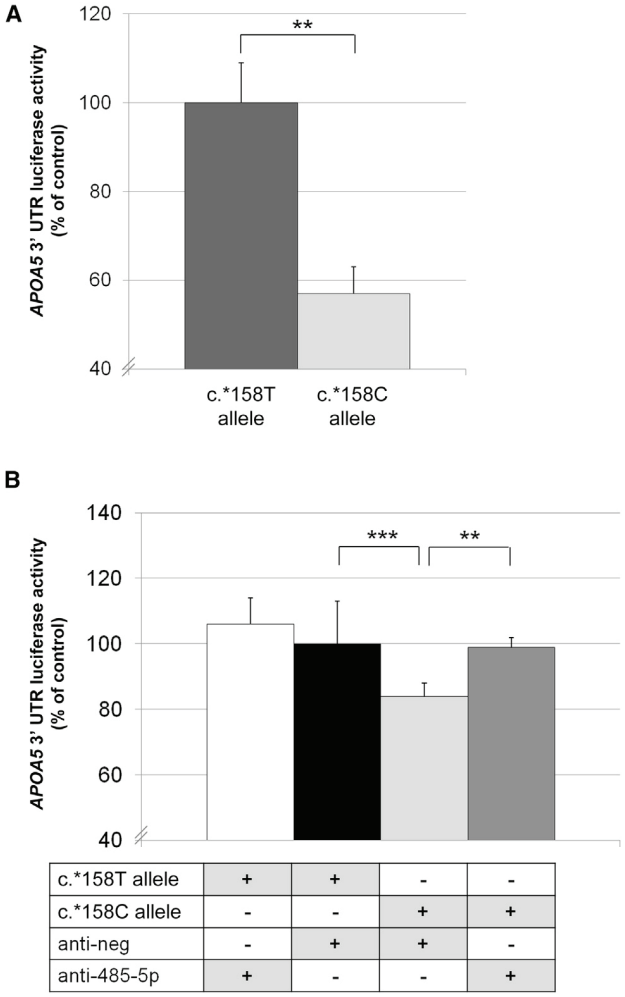


Figure 2. Endogenous miR-485-5p Downregulates Luciferase Activity of the *APOA5* 3′ UTR with the c.*158C Allele in HuH-7 Cells

(A) Luciferase activity of c.*158C (pEZX-C) is expressed as relative to that of c.*158T (pEZX-T).

(B) Luciferase activity of c.*158C (pEZX-C) is expressed as relative to that of c.*158T (pEZX-T) in the presence of either anti-485-5p or anti-neg.

HuH-7 cells (5×10^4 cells/well) were plated onto 12-well plates and transfected with 1 μg of pEZX-T or pEZX-C vector as described for HEK293T cells (Figure 1). Anti-miR experiments were performed 24 hr after incubation with anti-485-5p or anti-neg as previously described (Figure 1). Experiments were performed in triplicate, and data are expressed as luciferase activity relative to that of control samples (pEZX-C vector cotransfected with miR-CTRL and anti-neg). Data represent the mean ± SEM. p values were determined by a Student's paired t test (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$). NS, nonsignificant.

these three miRNAs on the c.*158C allele: miR485-5p binding was confirmed by the three programs, miR3188 binding was confirmed only by microRNA.org, and miR1255a binding was not confirmed (Table S2). Consequently, these results indicate that the c.*158C allele might create a potential illegitimate target site at least for miR-485-5p. Given the discrepancies between the programs, we decided to also consider miR-1255a and miR-3188 for in vitro binding validation.

Luciferase expression vectors containing the C or T allele (pEZX-C or pEZX-T, respectively) were constructed for functional assessment of the binding of the three candidate miRNAs on the mutant *APOA5* 3′ UTR (Figure 1A). Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells (ATCC CRL-11268) were cotransfected with pEZX-C or pEZX-T and with either a miRNA precursor (miR-485-5p, miR-1255a, or miR-3188) or a control mimic (miR-CTRL). Compared to control miRNA, the *APOA5* 3′ UTR containing the c.*158C allele showed a significant, 35% (±6%) decrease in luciferase activity in the presence of miR-485-5p ($p < 0.001$). Meanwhile, the 3′ UTR containing the c.*158T allele showed a nonsignificant increase in the level of luciferase activity in the presence of miR-485-5p in comparison to control miRNA (Figure 1A). However, when the c.*158T or c.*158C allele was expressed in the presence of miR-1255a (Figure S1A) or miR-3188 (Figure S1B), there was no significant difference in comparison to expression with the miR-CTRL. The specific effect of miR-485-5p on the luciferase activity of the *APOA5* 3′ UTR c.*158C allele was assessed with a mir-485-5p inhibitor (anti-485-5p) or a negative control inhibitor (anti-neg). The anti-485-5p fully reversed the decrease in luciferase activity of the *APOA5* 3′ UTR c.*158C allele, whereas in the same conditions, the anti-neg had no significant effect (Figure 1B).

These results confirm that in vitro miR-485-5p is capable of targeting the *APOA5* 3′ UTR c.*158C sequence and of partially repressing its luciferase activity.

Because *APOA5* is exclusively expressed in the liver, only liver-expressed miRNAs would potentially regulate *APOA5* expression. We sought to determine whether miR-485-5p was expressed in the liver by using quantitative RT-PCR on RNA extracted from human hepatic cells (HepG2 [ATCC HB-8065] and HuH-7 [human hepatoma cell line, JCRB-0403]) and mouse and human liver tissue (generous gift from the pathology laboratory of Centre Hospitalier Lyon Sud). miR-485-5p was expressed in both human and mouse hepatic tissue and in all hepatic cell lines tested and was most highly expressed in human hepatic tissue (Figure S2).

To confirm our results obtained with HEK293T cells, we investigated endogenous miR-485-5p functionality in human hepatic cell line HuH-7, expressing miR-485-5p. HuH-7 cells were transfected with the luciferase expression vectors pEZX-C or pEZX-T. We confirmed the specific effect of endogenous miR-485-5p by using anti-485-5p or anti-neg cotransfected with pEZX-C or pEZX-T. We observed that the *APOA5* 3′ UTR c.*158C allele showed significantly less luciferase activity than did the c.*158T allele (−43 ± 16%, $p < 0.01$) (Figure 2A). This decrease was completely reversed in the presence of anti-485-5p, but not in the presence of anti-neg (Figure 2B). These results demonstrate that endogenous hepatic miR-485-5p is able to target the mutant *APOA5* 3′ UTR with the c.*158C allele and decrease *APOA5* 3′ UTR luciferase expression.

Our in silico studies primarily identified the *APOA5* 3′ UTR with the c.*158C rare allele as a potential

miR-485-5p target site. Our in vitro studies subsequently established that the *APOA5* c.*158C minor allele creates an illegitimate and functional miR-485-5p binding site. In the human liver, miR-485-5p might therefore downregulate mutant *APOA5* at the posttranscriptional level, which could explain the strong GWAS-confirmed association between hypertriglyceridemia and APOA5*2, which bears c.*158C>T.[3,11–15,17–19]

Clinical studies have suggested a decreased apoAV concentration in subjects with APOA5*2.[20–24] An association between c.*158C>T genotypes and plasma apoAV levels has not been specifically reported. Nevertheless, because this SNP is in complete linkage disequilibrium with g.4430C>T (rs662799, g.−1131T>C) on APOA5*2,[3,35] data can be extrapolated from g.4430C>T studies. Subjects with the g.4430C rare allele (T/C + C/C genotypes) were found to have a substantially significant 23%–27% decrease in plasma apoAV concentration in comparison to subjects with the g.4430 T/T genotype.[20,25] In a recent large study, Kim et al. provided support for the relevance of plasma apoAV levels in plasma TG concentrations. This study clearly showed a close inverse association between apoAV and TGs in a cohort of 754 hypertriglyceridemic individuals (TGs > 150 mg/dl). Compared to the individuals with the g.4430 T/T major genotype, individuals with T/C and C/C genotypes displayed a 11% and 19% apoAV decrease, respectively, associated with a 9% and 18% TG increase, respectively.[36]

Several studies have suggested that APOA5*2 might modulate *APOA5* expression at the posttranscriptional level.[20,24] Nevertheless, functional analysis of APOA5*2 polymorphisms have hitherto failed to identify the mechanisms involved in the regulation of *APOA5* expression.[16,24,25] Our results support a miRNA posttranscriptional regulation of APOA5*2. Consistent with our study, Palmen et al. performed a functional analysis of APOA5*2 SNPs by using a luciferase reporter construct including part of APOA5*2: the g.4430C>T, c.−3A>G, and c.*158C>T rare variants. Palmen et al. reported approximately the same decrease in luciferase expression in HuH-7 cells as in our study. Although miRNA regulation was not suspected at that time, their findings are consistent with a targeting of APOA5*2 by endogenous miR-485-5p expressed in this cell type. Additionally, Palmen et al. showed an equally reduced luciferase expression with the construct including only one *APOA5* variant: the c.*158C allele.[24] As in our results, these previous findings demonstrate that the c.*158C>T rare variant alone provides luciferase modulation in this model.

Additionally, the data presented in this study are in line with several previous studies that demonstrated that SNPs located either in miRNA genes or in mRNAs can affect miRNA-mRNA recognition and either abrogate or create miRNA binding sites.[28] This could account for diseases or phenotypic traits in various cellular pathways.[29,37] In plasma TG metabolism, the miR-410 seed site disruption induced by *LPL* 3′ UTR SNP c.*1671T>C (rs13702; RefSeq NM_000237.2) was recently associated with a significant decrease in plasma TG concentration.[38]

Because *APOA5* is exclusively expressed in the liver, we crucially provided evidence of miR-485-5p expression in human liver tissue. This is in accordance with the discovery of miR-485-5p in human fetal liver[39] and its recently documented hepatic expression.[40] It is encoded in a miRNA cluster within an intergenic region located in chromosome 14 and is involved in neurologic pathways or diseases such as synaptic plasticity, Alzheimer disease,[41] and ependymomas.[42] It has also been shown to be downregulated in ovarian epithelial tumors.[43] miR-485-5p was not reported to affect lipid metabolism before our study. However, because *APOA5* c.*158C>T regulation would appear through the creation of an illegitimate target site, it is not obvious that miR-485-5p might physiologically regulate TG metabolism.

Therefore, our work provides a comprehensive mechanism for the APOA5*2 hypertriglyceridemic effect. We propose that, in humans, the miR-binding site created by the c.*158C rare allele in the *APOA5* 3′ UTR causes liver posttranscriptional downregulation of *APOA5* by miR-485-5p, a miRNA expressed in the human liver. This downregulation might at least partially account for the reported expression of APOA5*2, its effect of rising plasma TG concentrations in humans, and the strong association between APOA5*2 and both mild and severe hypertriglyceridemia. It remains to be clarified whether additional interactions with other APOA5*2 SNPs are also required.

Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and two tables and can be found with this article online at http://www.cell.com/AJHG.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Michel Lagarde and Hubert Vidal for their helpful discussions, the nurses for blood drawing, and the Société Française d'Endocrinologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Université Claude Bernard Lyon 1 for their support ("BQR accueil EC 2013" grants). S.R. received grants from the Fondation pour le Recherche Médicale, and P.M. received grants from the Fondation de France.

Received: July 26, 2013
Accepted: December 2, 2013
Published: January 2, 2014

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

DIANA microT v.4, http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microtv4/index
microRNA.org, http://www.microrna.org
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), http://omim.org
PITA, http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html

RegRNA, http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/
TargetScan 6.2, http://www.targetscan.org/

References

1. Marçais, C., Bernard, S., Merlin, M., Ulhmann, M., Mestre, B., Rochet-Mingret, L., Revol, A., Berthezene, F., and Moulin, P. (2000). Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. Diabetologia *43*, 1346–1352.
2. Johansen, C.T., Kathiresan, S., and Hegele, R.A. (2011). Genetic determinants of plasma triglycerides. J. Lipid Res. *52*, 189–206.
3. Pennacchio, L.A., Olivier, M., Hubacek, J.A., Cohen, J.C., Cox, D.R., Fruchart, J.C., Krauss, R.M., and Rubin, E.M. (2001). An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science *294*, 169–173.
4. van der Vliet, H.N., Schaap, F.G., Levels, J.H., Ottenhoff, R., Looije, N., Wesseling, J.G., Groen, A.K., and Chamuleau, R.A. (2002). Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *295*, 1156–1159.
5. Fruchart-Najib, J., Baugé, E., Niculescu, L.S., Pham, T., Thomas, B., Rommens, C., Majd, Z., Brewer, B., Pennacchio, L.A., and Fruchart, J.C. (2004). Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. Biochem. Biophys. Res. Commun. *319*, 397–404.
6. Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L.A., Laatsch, A., and Heeren, J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. J. Biol. Chem. *280*, 21553–21560.
7. Grosskopf, I., Baroukh, N., Lee, S.J., Kamari, Y., Harats, D., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A., and Cooper, A.D. (2005). Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 2573–2579.
8. Priore Oliva, C., Pisciotta, L., Li Volti, G., Sambataro, M.P., Cantafora, A., Bellocchio, A., Catapano, A., Tarugi, P., Bertolini, S., and Calandra, S. (2005). Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 411–417.
9. Marçais, C., Verges, B., Charrière, S., Pruneta, V., Merlin, M., Billon, S., Perrot, L., Drai, J., Sassolas, A., Pennacchio, L.A., et al. (2005). Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. J. Clin. Invest. *115*, 2862–2869.
10. Charrière, S., Cugnet, C., Guitard, M., Bernard, S., Groisne, L., Charcosset, M., Pruneta-Deloche, V., Merlin, M., Billon, S., Delay, M., et al. (2009). Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. Atherosclerosis *207*, 150–156.
11. Pennacchio, L.A., Olivier, M., Hubacek, J.A., Krauss, R.M., Rubin, E.M., and Cohen, J.C. (2002). Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. Hum. Mol. Genet. *11*, 3031–3038.
12. Kraja, A.T., Vaidya, D., Pankow, J.S., Goodarzi, M.O., Assimes, T.L., Kullo, I.J., Sovio, U., Mathias, R.A., Sun, Y.V., Franceschini, N., et al. (2011). A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. Diabetes *60*, 1329–1339.
13. Tan, A., Sun, J., Xia, N., Qin, X., Hu, Y., Zhang, S., Tao, S., Gao, Y., Yang, X., Zhang, H., et al. (2012). A genome-wide association and gene-environment interaction study for serum triglycerides levels in a healthy Chinese male population. Hum. Mol. Genet. *21*, 1658–1664.
14. Wang, J., Ban, M.R., Kennedy, B.A., Anand, S., Yusuf, S., Huff, M.W., Pollex, R.L., and Hegele, R.A. (2008). APOA5 genetic variants are markers for classic hyperlipoproteinemia phenotypes and hypertriglyceridemia. Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. *5*, 730–737.
15. Charriere, S., Bernard, S., Aqallal, M., Merlin, M., Billon, S., Perrot, L., Le Coquil, E., Sassolas, A., Moulin, P., and Marcais, C. (2008). Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. Clin. Chim. Acta *394*, 99–103.
16. Talmud, P.J., Palmen, J., Putt, W., Lins, L., and Humphries, S.E. (2005). Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. J. Biol. Chem. *280*, 28215–28220.
17. Comuzzie, A.G., Cole, S.A., Laston, S.L., Voruganti, V.S., Haack, K., Gibbs, R.A., and Butte, N.F. (2012). Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population. PLoS ONE *7*, e51954.
18. Kettunen, J., Tukiainen, T., Sarin, A.P., Ortega-Alonso, A., Tikkanen, E., Lyytikäinen, L.P., Kangas, A.J., Soininen, P., Würtz, P., Silander, K., et al. (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. Nat. Genet. *44*, 269–276.
19. Willer, C.J., Sanna, S., Jackson, A.U., Scuteri, A., Bonnycastle, L.L., Clarke, R., Heath, S.C., Timpson, N.J., Najjar, S.S., Stringham, H.M., et al. (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nat. Genet. *40*, 161–169.
20. Hahne, P., Krempler, F., Schaap, F.G., Soyal, S.M., Höffinger, H., Miller, K., Oberkofler, H., Strobl, W., and Patsch, W. (2008). Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. J. Intern. Med. *264*, 452–462.
21. Ishihara, M., Kujiraoka, T., Iwasaki, T., Nagano, M., Takano, M., Ishii, J., Tsuji, M., Ide, H., Miller, I.P., Miller, N.E., and Hattori, H. (2005). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. J. Lipid Res. *46*, 2015–2022.
22. Dallinga-Thie, G.M., van Tol, A., Hattori, H., van Vark-van der Zee, L.C., Jansen, H., and Sijbrands, E.J.; DALI study group (2006). Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. Diabetologia *49*, 1505–1511.
23. Vaessen, S.F., Schaap, F.G., Kuivenhoven, J.A., Groen, A.K., Hutten, B.A., Boekholdt, S.M., Hattori, H., Sandhu, M.S., Bingham, S.A., Luben, R., et al. (2006). Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. J. Lipid Res. *47*, 2064–2070.
24. Palmen, J., Smith, A.J., Dorfmeister, B., Putt, W., Humphries, S.E., and Talmud, P.J. (2008). The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels. Biochim. Biophys. Acta *1782*, 447–452.
25. Ahituv, N., Akiyama, J., Chapman-Helleboid, A., Fruchart, J., and Pennacchio, L.A. (2007). In vivo characterization of human APOA5 haplotypes. Genomics *90*, 674–679.

26. Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 586–593.
27. Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell *136*, 215–233.
28. Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. Hum. Mutat. *33*, 254–263.
29. Richardson, K., Louie-Gao, Q., Arnett, D.K., Parnell, L.D., Lai, C.Q., Davalos, A., Fox, C.S., Demissie, S., Cupples, L.A., Fernandez-Hernando, C., and Ordovas, J.M. (2011). The PLIN4 variant rs8887 modulates obesity related phenotypes in humans through creation of a novel miR-522 seed site. PLoS ONE *6*, e17944.
30. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat. Genet. *39*, 1278–1284.
31. Huang, H.Y., Chien, C.H., Jen, K.H., and Huang, H.D. (2006). RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. Nucleic Acids Res. *34* (Web Server issue), W429–W434.
32. Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. Nucleic Acids Res. *36* (Database issue), D149–D153.
33. Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol. Cell *27*, 91–105.
34. Maragkakis, M., Vergoulis, T., Alexiou, P., Reczko, M., Plomaritou, K., Gousis, M., Kourtis, K., Koziris, N., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2011). DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association. Nucleic Acids Res. *39* (Web Server issue), W145–W148.
35. Olivier, M., Wang, X., Cole, R., Gau, B., Kim, J., Rubin, E.M., and Pennacchio, L.A. (2004). Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. Genomics *83*, 912–923.
36. Kim, J.Y., Kim, O.Y., Paik, J.K., Lee, S.H., and Lee, J.H. (2013). Association of apolipoprotein A-V concentration with apolipoprotein A5 gene -1131T>C polymorphism and fasting triglyceride levels. J. Clin. Lipidol. *7*, 94–101.
37. Wynendaele, J., Böhnke, A., Leucci, E., Nielsen, S.J., Lambertz, I., Hammer, S., Sbrzesny, N., Kubitza, D., Wolf, A., Gradhand, E., et al. (2010). An illegitimate microRNA target site within the 3′ UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. Cancer Res. *70*, 9641–9649.
38. Richardson, K., Nettleton, J.A., Rotllan, N., Tanaka, T., Smith, C.E., Lai, C.Q., Parnell, L.D., Lee, Y.C., Lahti, J., Lemaitre, R.N., et al. (2013). Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. Am. J. Hum. Genet. *92*, 5–14.
39. Fu, H., Tie, Y., Xu, C., Zhang, Z., Zhu, J., Shi, Y., Jiang, H., Sun, Z., and Zheng, X. (2005). Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. FEBS Lett. *579*, 3849–3854.
40. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. BMC Genomics *8*, 166.
41. Cohen, J.E., Lee, P.R., Chen, S., Li, W., and Fields, R.D. (2011). MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 11650–11655.
42. Costa, F.F., Bischof, J.M., Vanin, E.F., Lulla, R.R., Wang, M., Sredni, S.T., Rajaram, V., Bonaldo, Mde.F., Wang, D., Goldman, S., et al. (2011). Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma. PLoS ONE *6*, e25114.
43. Kim, T.H., Kim, Y.K., Kwon, Y., Heo, J.H., Kang, H., Kim, G., and An, H.J. (2010). Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. Histopathology *57*, 734–743.

The American Journal of Human Genetics, Volume *94*

Supplemental Data

An *APOA5* 3′ UTR Variant Associated with Plasma Triglycerides Triggers *APOA5* Downregulation by Creating a Functional miR-485-5p Binding Site

Cyrielle Caussy, Sybil Charrière, Christophe Marçais, Mathilde Di Filippo, Agnès Sassolas, Mireille Delay, Vanessa Euthine, Audrey Jalabert, Etienne Lefai, Sophie Rome, and Philippe Moulin

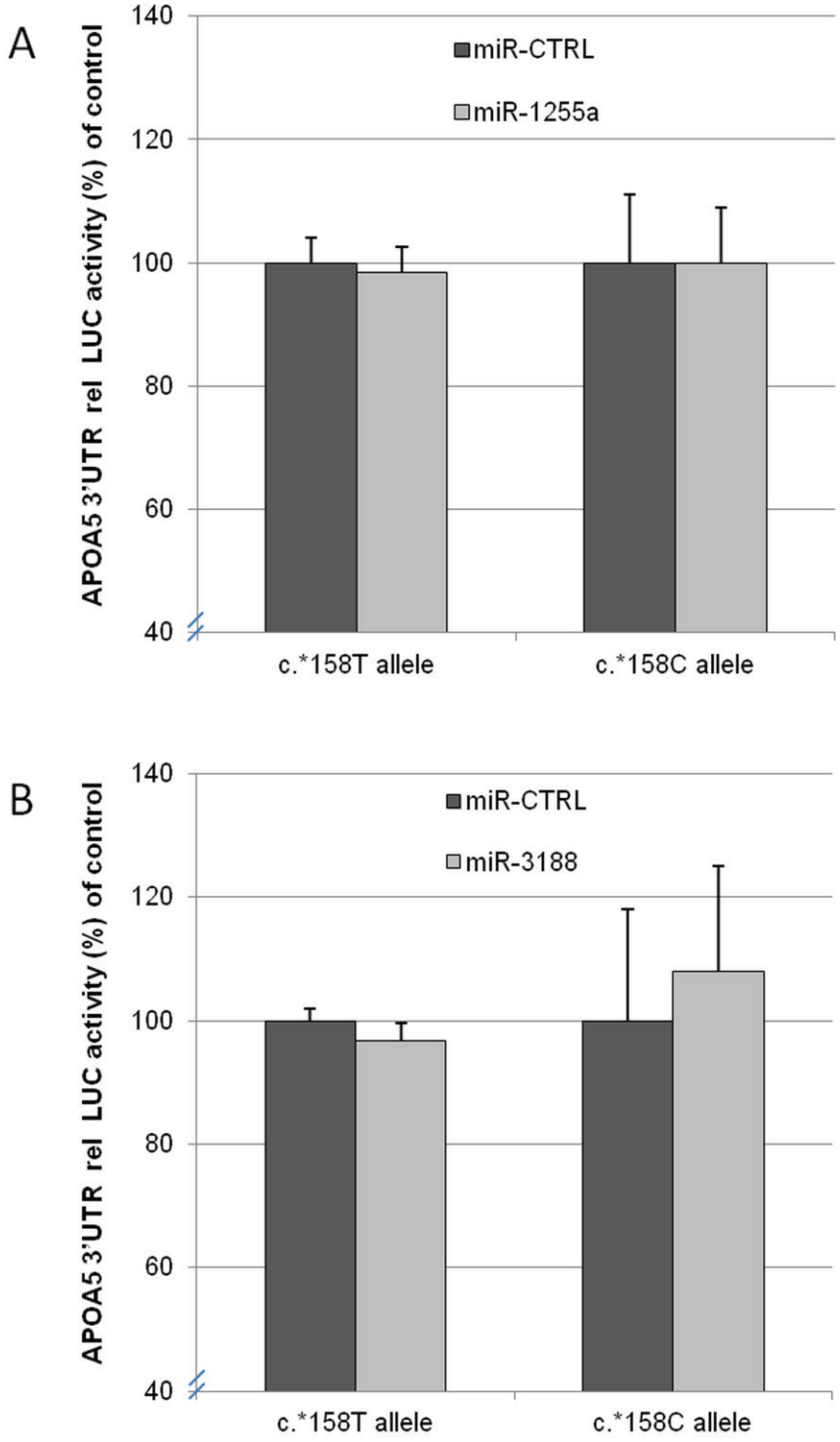


Figure S1. miR-1255a and miR-1388 do not modify the luciferase activity of the *APOA5* 3'UTR luciferase constructs with c.*158T or C alleles.

HEK-293T cells were co-transfected with 800ng of pEZX-T or pEZX-C vectors and 200 ng of miRNA precursors of miR-1255 (Panel A) or miR-3188 (Panel B) compared to miR-CTRL as described in Figure 1. All transfection experiments were performed in triplicate and repeated three times. Results are expressed as relative luciferase activity to control samples. Data are represented as mean +/- SEM. p-values were determined by Student's paired t-test. All differences are non-significant.

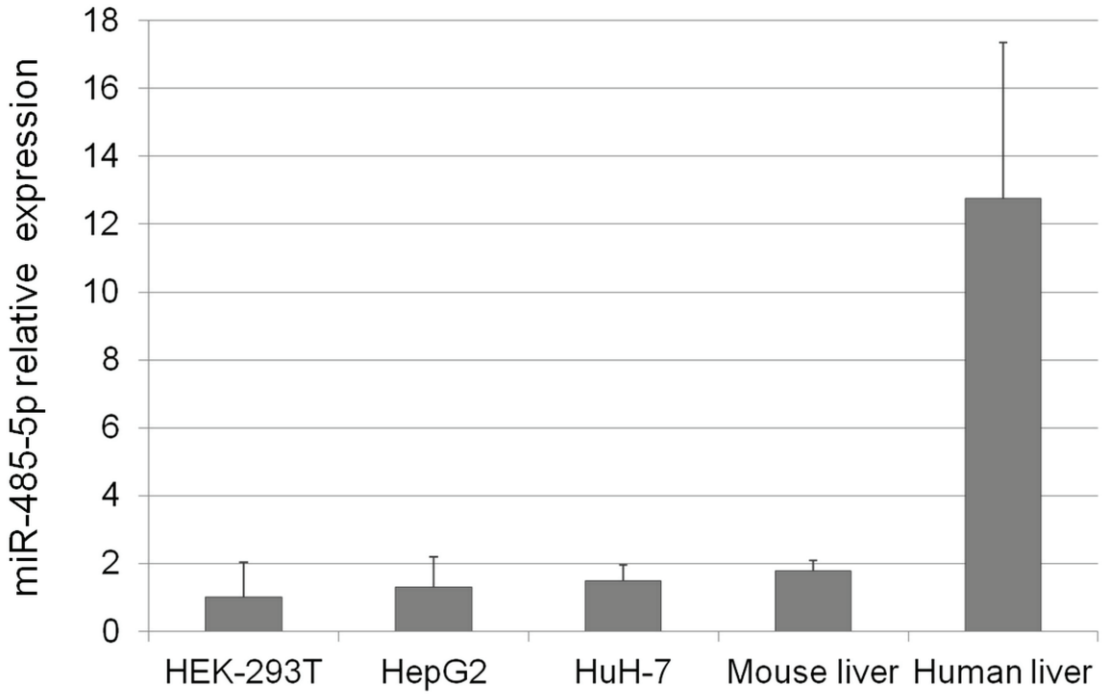


Figure S2. Relative miR-485-5p expression across hepatic cells lines or hepatic tissue samples in RT-qPCR.

miR-485-5p expression was determined by RT-qPCR on total cell RNA isolated with TriPure Isolation reagent (Roche Applied Science). miRNA-specific reverse transcription was performed with 500ng of purified total RNA using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) and miRNA qPCR using TaqMan 2x Universal PCR master Mix, (Life Technologies) on Rotor-Gene Q thermocycler (QIAGEN). miR-485-5p expression is expressed relative to HEK-293T expression. All experiments were performed in triplicate. Data are represented as mean +/- SEM.

Software (ref*)	Algorithm score	Algorithm parameters	Relevant score threshold
PITA (30)	ΔΔG score	Free energy gained from the formation of the microRNA-target duplex Energetic cost of unpairing the target to make it accessible to the microRNA mRNA secondary structure Target mRNA flanking 3' and 5' flanking sequence	< -10
RegRNA1.0 (31,S1)	miRanda	Sequence matching Minimum free energy of miRNA–target duplex Evolutionary conservation	> 160
microRNA.org (32,S2)	miRSVR	Sequence matching The minimum free energy of miRNA–target duplex Evolutionary conservation Secondary structure accessibility	< -0.1
Targetscan Release 6.1 (33,S3,S4)	Context +score	Seed-site type (base pairing in miRNA 5'sequence) miRNA 3' sequence pairing contribution Local nucleotide composition (high local AU content are more likely to be functional) Site position in mRNA 3'UTR Evolutionary conservation	< -0.1
Diana-microT 4.0 (34)	miTG score	Seed-site type (base pairing in miRNA 5'sequence) The minimum free energy of miRNA–target duplex Evolutionary conservation	> 15

Table S1: miRNA target-site prediction software characteristics

*ref : reference (refered to article's references or supplemental references)

Software	PITA		RegRNA		microRNA.org	TargetScan	Diana-microT
Allele	T	C	T	C	C*	C*	C*
miR-485-5p	-2.35	-3.27	154	158	-0.0043	-0.14	8
miR-1255a	0.4	-1.12	123	140	no binding	NT	NT
miR-3188	no binding	no binding	139	143	-0.0043	no binding	NT

Table S2: Bio-informatic study of *APOA5* SNP1 effect on miRNA target-sites: miRNA binding score prediction on c.*158C allele (rare variant) compared to c.*158T allele (wild type variant).

* The software predicts only a reference sequence corresponding to C allele.

NT: not tested (the miRNA sequence is not tested by the software).

PITA and RegRNA softwares allowed users to upload any mRNA target sequence and were used to compare binding scores of miRNAs on the *APOA5* c.*158T or the c.*158C alleles (nucleotide 158 of the 3'UTR). The uploaded sequence contained 80 nucleotides of *APOA5* 3'UTR (3'-ACAGGGAGGCCACCAAAGGGGCTGCTGTCTCCTGCA(T/C)ATCCAGCCT CCTGCGACTCCCCAATCTGGATGCATTACAT-5'). The three remaining softwares (microRNA.org, TargetScan, Diana-microT) contained only the *APOA5* reference sequence corresponding to the c.*158C rare variant and thus were used to confirm the potential binding of the candidate miRNAs identified with PITA and RegRNA.

Supplemental references

S1. Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., Marks, D.S. (2003). MicroRNA targets in Drosophila. Genome Biol. 5, R1.

S2. Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. Genome Biol. 11, R90.

S3. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. 19, 92-105.

S4. Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 120, 15‑20.

2.2 ARTICLE 2 : "MULTIPLE MICRORNA REGULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE GENE ABOLISHED BY 3'UTR POLYMORPHISMS IN A TRIGLYCERIDE-LOWERING HAPLOTYPE HARBOURING P.SER474TER"

Cet article a été soumis le 21 juillet 2015 et accepté le 9 janvier 2016.
DOI :10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.

La LPL est une enzyme clé dans la lipolyse intravasculaire. Elle est soumise à de nombreux mécanismes de régulation et en particulier une régulation post-transcriptionnelle importante dont les mécanismes ne sont pas tous élucidés. Quelques études ont démontré l'implication des miRs dans la liaison avec la région 3'UTR de la LPL notamment le miR-29a dans les cellules dendritiques (557). Richardson et al. a démontré l'implication de l'allèle rare du polymorphisme rs13702 dans la suppression du site de liaison du miR-410. Cette suppression expliquerait son association avec la diminution significative de la triglycéridémie chez les porteurs de ce variant (140).

Avant la découverte de l'implication des régions 3'UTR dans la régulation médiée par les miRs, ces régions étaient peu considérées et peu de données concernant les polymorphismes de la région 3'UTR de la LPL ont été publiées. Nous avons donc entrepris le génotypage de la région 3'UTR de la LPL à partir de notre cohorte DIACOR (patients diabétiques de type 2 phénotypés sur le plan lipidique) afin d'identifier des SNPs associés à la triglycéridémie pouvant potentiellement interagirent avec des miRs. Notre étude a permis de mettre en évidence un haplotype de la LPL, l'haplotype 4, composé de sept SNPs de la région 3'UTR et de la mutation p.Ser474Ter (rs328) en déséquilibre de liaison et significativement associés à une diminution des TG plasmatiques. Nous avons ensuite confirmé cette association en population générale dans 4 cohortes françaises MONICA, MONA LISA, PRIME and CES.

L'étude du rôle de cet haplotype dans la régulation de la LPL via une potentielle suppression de sites de liaison de miRs nous a permis de démontrer la suppression des sites de liaison des miR-410, miR-29a, miR-29b-1 et miR-1277 induite par les variants rares de l'haplotype 4.

Ce travail apporte de nouvelles données concernant la régulation de la LPL par les miRs, d'une part en confirmant son interaction avec les miR-410 et miR-29a et en démontrant l'implication des miR-29b-1 et miR-1277 dans la régulation de la LPL sauvage. Ceci met en

lumière la complexité de la régulation épigénétique de la LPL cible de plusieurs miRs. De plus, nous avons démontré la fonctionnalité de plusieurs SNPs de la région 3'UTR de la LPL, responsable de la suppression de sites de liaison de miR qui expliquerait leur association à une diminution de la concentration des TG plasmatiques via l'augmentation de l'expression de la LPL possiblement induite par une levée d'inhibition des miRs. Enfin, nous proposons une explication de l'effet hypotriglycéridémiant, bien connu, du variant p.Ser474Ter. Celui-ci pourrait être au moins en partie lié à son déséquilibre de liaison avec les SNPs fonctionnels de la région 3'UTR de l'haplotype 4.

Multiple microRNA regulation of Lipoprotein Lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a Triglyceride-lowering Haplotype harboring p.Ser474Ter

Cyrielle Caussy[1,2] ; Sybil Charrière[1,2§]; Aline Meirhaeghe[3] ; Jean Dallongeville[3] ; Etienne Lefai[2] ; Sophie Rome[2] ; Charlotte Cuerq[2,4]; Vanessa Euthine[2] ; Mireille Delay[4] ; Oriane Marmontel[2,5] ; Mathilde Di Filippo[2,5] ; Michel Lagarde[2] ; Philippe Moulin[1,2.6] ; Christophe Marçais[2,4,6]

[1] Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, 28 Avenue Doyen Lépine, Bron cedex F-69677, France

[2] INSERM U1060, Laboratoire Carmen, Université Lyon 1, INRA U1235, INSA de Lyon, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne Cedex, France

[3] INSERM, U1167, Institut Pasteur de Lille, BP-245-59019 Lille Cedex, France

[4]Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Centre de Biologie Sud, Laboratoire de Biochimie moléculaire et métabolique, 165 chemin du Grand Revoyet, Pierre-Bénite Cedex F-69495, France

[5] Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Département de biochimie et biologie moléculaire, 59 Boulevard Pinel Bron Cedex F-69677, France

[6] CENS, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre Hospitalier Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France

§ corresponding author

Dr Sybil Charrière, MD, PhD

Fédération d'endocrinologie, maladies métaboliques, diabète et nutrition, Hôpital Louis Pradel, 28 avenue Doyen Lépine, 69677 Bron Cedex, France.

Tel.: 00 33 4 72 68 13 31; Fax: 00 33 4 72 68 13 07; E-mail: sybil.charriere@chu-lyon.fr

The manuscript includes: 4 Figures and 1 Table

Abstract

Background-Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in triglyceride (TG) metabolism. *LPL* gene single nucleotide polymorphisms (SNP) are associated with TG concentrations however the functionality of many of these SNPs remains poorly understood. MicroRNAs (miR) exert post-transcriptional down-regulation and their target sequence on the 3'UTR may be altered by SNPs. We therefore investigated whether *LPL* 3'UTR SNPs could modulate plasma TG concentration through the alteration of miR binding-sites.

Methods and Results-We performed genetic association studies of *LPL* 3'UTR SNPs with TG concentrations in 271 type 2 diabetic patients and in general population samples (2997 individuals). A specific *LPL* haplotype (Hap4) was associated with lower plasma TG concentration (TG -0.18,IC95%[-0.30,-0.07]mmol/L or logTG-0.13,IC95%[-0.18,-0.08], $p=4.77.10^{-8}$) in the meta-analysis. Hap4 comprises seven 3'UTR SNP minor alleles and p.Ser474Ter (rs328) a well-documented nonsense mutation associated with low TG concentration although by an unknown mechanism so far. Bio-informatic studies identified several putative miRNA binding-sites on the wild-type Hap1 haplotype, lost on Hap4. Functional validation performed in HEK-293T cells using luciferase expression constructs with various *LPL* 3'UTR allele combinations demonstrated a binding of miR-29, miR-1277 and miR-410 on Hap1, lost on Hap4. This loss of specific miR binding-site in presence of Hap4 was independent of the allelic variation of p.Ser474Ter (rs328).

Conclusions-We report the regulation of *LPL* by the miR-29, miR-1277 and miR-410 that is lost in presence of Hap4, a specific *LPL* TG-lowering haplotype. Consequently p.Ser474Ter association with TG concentration could be at least partially explained by its strong linkage disequilibrium with these functional 3'UTR SNPs.

Key Words : lipoprotein lipase, lipids, triglycerides, haplotype, SNP, microRNA

Introduction

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme which regulates plasma triglyceride (TG) lipolysis and thereby the kinetics of TG rich lipoproteins. LPL expression is tightly regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels involving complex environmental and genetic mechanisms which remain partially unknown (1). The *LPL* 3'UTR was suggested to play an important role in the down-regulation of LPL translation both *in vivo* and *in vitro* (2, 3). This may result from a loss of post-transcriptional down-regulation by miRNAs (miR) (4). SNPs within the recognition sequence of miR can modify miR binding sites, leading either to down/up-regulation of the target mRNA (5-7). Genetic association studies identified multiple non-coding single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *LPL* associated with plasma TG concentration (8-10). It was recently suggested that some of those SNPs located in the *LPL* 3'UTR may modulate the binding of miRs (5).

By conducting association studies in the *LPL* 3'UTR, we identified an haplotype associated with low TG concentration. Haplotype 4 (Hap4) harbors seven 3'UTR *LPL* SNPs and also comprises the well-known rs328, p.Ser474Ter (previously described as S447X) variant that is strongly associated with an increase of LPL mass, LPL activity and lower TG concentration (11-13).

We functionally tested the SNPs making up this haplotype and identified a set of miRNA which down-regulation was lost in the presence of the Hap4 haplotype.

Materials and methods

Type 2 diabetic patient cohort and population studies

182 unrelated type 2 diabetic patients from the DIACOR cohort were recruited in the department of endocrinology and metabolic diseases of Louis Pradel Hospital in Lyon, France. Detailed inclusion and exclusion criteria are available in reference (14). The 182 patients were classified in 2 groups, normotriglyceridemic (group N, 68 patients) or mildly hypertriglyceridemic (group M, 114 patients), depending on their fasting triglyceride values at inclusion. An additional group of 89 unrelated European descent type 2 diabetic patients (group S) was studied. These patients had documented type 2 diabetes and had documented hyperchylomicronemia (TG>15 mmol/L), as previously described (15). Baseline characteristics and lipid parameters are presented in Supplemental Table 1. A written informed consent was obtained from all the included patients and this study had the approval of our local ethics committee. In addition, four polymorphisms rs328, rs13702, rs1059611, rs10645926, *Refseq* accession number *NM_000237.2*, were genotyped in four French population samples using KASPar technology (KBioscience, Hoddesdon, UK): MONICA(n=852) (18), MONA LISA (n=1194) (19), PRIME (n=594) (20) and CES (n=357) (unpublished data). Detailed cohort characteristics and statistical analysis are available in Supplemental Material.

LPL 3'UTR polymorphisms analysis

Genomic DNA was extracted as previously described (16). Prior to denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC) sequence analysis, LPL genomic DNA (0.2µg) was subjected to PCR with 9 primers pairs detailed in Supplemental Table 2. PCR products were analyzed for sequence variations by dHPLC on a Wave (Transgenomic, Glasgow, UK). Direct sequencing was performed on variant LPL 3'UTR sequences on

CEQ2000 DNA analysis system (Beckman-Coulter, Villepinte, France) with forward and reverse primers using the CEQ-DTCS QuickStart kit (Beckman-Coulter, Villepinte, France). Haplotype reconstruction was performed using PHASE software (17).

Bio-informatic studies

We compared the miRNA binding-site predictions of 2 software programs for miRNA target prediction : PITA (21) and RegRNA (22) whose characteristics are summarized in a previous study (7).

LPL 3'UTR Luciferase constructs

Two sequences containing the full 3'UTR of human LPL mRNA and 90 nucleotides upstream of the stop codon (with p.Ser474Ter SNP), were synthesized (GenScript, Piscataway,USA), corresponding either to LPL Haplotype 1 (Hap1) or to LPL Haplotype 4 (Hap4). The 2 sequences were cloned into the pEZX-MT01 vector downstream a firefly luciferase reporter gene. The Renilla luciferase, encoded by the same vector, was used as an internal control for the dual-luciferase assays.

To determine the individual effect of rs328, site-directed mutagenesis was performed with QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology, Evry, France). All constructs were confirmed by sequencing.

LPL Luciferase reporter assays

Human cell lines HEK-293T (Human Embryonic Kidney cell line, ATCC® CRL-11268™), were cultured at standard condition as previously described in reference (7). For miRNA over-expression studies, HEK-293T cells were co-transfected with 800ng of pEZX-MT01 vector and 200 ng of miRNA precursors (pEZX-MR04 vectors) (GeneCopoeia™, Labomics

S.A, Nivelles, Belgium) or miR-CTRL. HEK-293T cells were transfected with 1 µg of pEZX-MT01vector alone or co-transfected with a specific mature miRNA inhibitor (miR-3p or miR-5p) or a negative control inhibitor (miRCURY LNA™ Power microRNA inhibitor, Exiqon, Vedbaek, Danemark). All transient transfection was performed with ExGen500 (EUROMEDEX, Lyon, France) and luciferase activity was measured as previously described (7). All transfection experiments were performed in triplicate and repeated three times.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 software. Continuous variables were expressed in mean +/- standard error of the mean (SEM) and categorical variables as frequencies and percentages. Log-transformation was performed for skewed variables such as triglycerides (crude data were shown in the results). Means of quantitative variables were compared using one-way ANOVA test or Student's t-test, while categorical variables were analyzed with the Chi-squared test or Fisher's exact test when effectives were under 10. A p value of < 0.05 (two sided) was considered to be significant.

Results

Identification of *LPL* haplotype Hap4 associated with normotriglyceridemia in type 2 diabetic patients

In order to identify the SNPs in the *LPL* 3'UTR associated with plasma TG concentration in the *LPL* 3'UTR, we firstly performed a genetic analysis in 3 groups of type 2 diabetic patients (n=271): normotriglyceridemic (group N, n=68), mildly hypertriglyceridemic (group M, n=114) and severe hypertriglyceridemic (group S, n=89). Seven 3'UTR SNPs were differentially distributed according to TG status (Supplemental Table 3). We additionally studied the distribution of p.Ser474Ter, known to be in significant linkage disequilibrium with most of the seven 3'UTR SNPs identified (23). We identified a higher frequency of the minor alleles of the 8 SNPs in the normotriglyceridemic patients compared to patients either with moderate hypertriglyceridemia or history of severe hypertriglyceridemia (Supplemental Table 3). We also performed bioinformatic haplotype reconstruction for the 8 identified SNPs using PHASE software. Amongst the 9 most frequent haplotypes identified, one variant haplotype (Hap4), harbouring the variant allele of each 8 SNPs, was present exclusively among the normotriglyceridemic patients (8.5%) (Table 1).

Hap4 associates with lower TG levels in population studies

We attempted to replicate the association between the Hap4 haplotype and TG in 4 independent general population samples. We assessed the effect of the 4 SNPs identified on our Hap4 *LPL* haplotype (p.Ser474Ter (rs328), rs13702, rs1059611 and rs10645926) on plasma TG levels in MONICA (n=852), MONA LISA (n=1194), PRIME (n=594) and CES (n=357) cohorts. We also studied the linkage disequilibrium among these four SNPs in the MONA LISA study which shows a strong LD between rs328, rs1059611, rs10645923 and to a lesser extent with rs13702 (Supplemental Figure 1A). The other SNPs of Hap4 haplotype

were not studied as they are in strong linkage disequilibrium according to the 1000 genomes data (Supplemental Figure 1B). The minor alleles of each SNP were also significantly associated with lower plasma TG levels ($1.2x10^{-7} \leq p \leq 4.5x10^{-9}$) (Supplemental Figure 2) without evidence of significant heterogeneity among studies. In addition, we performed a meta-analysis in 2997 individuals comparing the 4 SNPs with the 1111 wild type haplotype (containing all major alleles). The 2222 haplotype (containing all minor alleles) and corresponding to the LPL Hap4 haplotype was significantly associated with lower plasma TG levels (logTG-0.13, IC95% [-0.18,-0.08] $p=4.77.10^{-8,}$ TG -0.18, IC95% [-0.30,-0.07] mmol/L) (Figure 1).

These results in humans confirm the existence of a minor TG-lowering *LPL* haplotype comprising 3'UTR SNPs and the p.Ser474Ter polymorphism in human general population. We subsequently focused our study on Hap4 functionality.

Bioinformatic prediction of *LPL* Hap4 haplotype impact on miR binding sites

We used 2 prediction software tools to investigate the putative impact of *LPL* Hap4 haplotype on miR target-sites (Supplemental Table 4). Several miR binding-sites were predicted to be disrupted in presence of *LPL* Hap4 compared to the *LPL* wild-type Hap1 haplotype (Figure 2). We identified multiple binding sites for the miR-29 family potentially lost in presence of the minor SNP alleles present on Hap4 haplotype, including rs328. The alignments between of the miR and the LPL wild-type sequence are shown in Supplemental Figure 3.

Expression profile of candidate miR in adipose tissue and HEK-293T cell line

The relevance of candidate-miR for LPL regulation was established by assessing adipose tissue expression of the selected miRs. The candidate miRs were found expressed in the 3

human visceral adipose tissue samples tested. These tissues were obtained from surgical biopsies performed during digestive surgeries. We chose HEK-293T cells to design the subsequent functional assays and verified that this cell line also expressed all candidate miRs with a similar profile as in adipose tissue (Supplemental Figure 4).

Multiple miR binding on *LPL* Hap1, disrupted on Hap4 haplotype

In order to determine the functionality of candidate miR binding-sites, HEK-293T cells were transfected with pEZX-MT-01 luciferase reporter vector containing either *LPL* Hap1 or *LPL* Hap4 haplotype. Results showed a significantly reduced luciferase activity with LPL Hap1 construct compared to the LPL Hap4 construct (-32+/-7%,$p<0.001$) (Figure 3A) suggesting a down-regulation of the reporter gene induced by Hap1 compared to Hap4.

Subsequently, HEK-293T cells were co-transfected with LPL-luciferase reporter constructs (either Hap1 or Hap4) with the individual candidate-miR precursors (miR-29a, miR-29b1, miR-136, miR-410, miR-579, miR-1277, miR-3174) or a control mimic (miR-CTRL) to decipher the contribution of each miRNA.

In co-transfection experiments of the wild-type Hap1 construct, with either miR-29a, miR-29b1, miR-410 and miR-1277, we observed a significant decrease in luciferase activity, compared to miR-CTRL (Figure 3B). When the same miRs were co-transfected with the Hap4 construct, luciferase activity was not significantly different from miR-CTRL (Figure 3B). By contrast, co-transfection experiments of miR-136, miR-579, miR-3174 and with either Hap1 or Hap4 constructs did not modify luciferase activity compared to miR-CTRL (Supplemental Figure 5).

These data demonstrates the presence of functional binding sites for miR-29a, miR-29b1, miR-410, and miR-1277 on the human LPL transcripts harboring the wild-type Hap1 haplotype, disrupted by the minor alleles of the Hap4 haplotype SNPs.

Assessment of miRs endogenous functionality on the Hap1 construct

The Hap1 or Hap4 luciferase expression vectors were co-transfected with specific miR inhibitors (anti-miR) or anti-neg in HEK-293T cells. Compared to anti-neg, luciferase activity from Hap1 construct was significantly increased in presence of anti-29a-3p and anti-29a-5p and anti-410-3p, to a similar level as from the Hap4 construct (Figure 3C). Luciferase activity from Hap1 construct was unchanged in presence of anti-29b-3p and miR-1277-3p and only partially restored in presence of anti-29b-5p (Figure 3C).

p.Ser474Ter is not involved in the miR regulation of LPL Hap1 or Hap4 haplotype.

Our bio-informatic study identified a potential loss of miR-29a and miR-29b1 binding sites in presence of the p.Ser474Ter (rs328) minor allele (Figure 4). We mutated the Hap4 construct to re-introduce the major C allele (Hap4-rs328C construct) and tested whether the rs328C allele specifically restored miR-29a and miR-29b1 binding.

In co-transfection experiments with Hap4-rs328C, luciferase activity was similar in presence of miR-29a or miR-29b1 compared to miR-CTRL (Figure 4A). Therefore, the rs328C allele does not restore miR-29a or miR-29b1 or binding on Hap4 LPL haplotype. Conversely, we mutated the Hap1 construct to introduce the minor G rs328 allele (Hap1-rs328G construct) and tested whether the rs328G allele specifically suppressed miR-29a and miR-29b1 binding. As observed with Hap1 construct, luciferase activity from Hap1-rs328G construct was

significantly decreased in presence of miR-29a or miR-29b1 compared to miR-CTRL (Figure 4A). Therefore, the rs328G minor allele does not suppress miR-29b1 or miR-29a binding on Hap1 LPL haplotype. These results indicate that the rs328 area is not targeted by miR-29b1 or miR-29a.

Moreover, in HEK-293T cells the luciferase activity of Hap1-328G or Hap4-328C constructs were not significantly different from those of Hap1 and Hap4 constructs respectively (Figure 4B). These results indicate that p.Ser474Ter (rs328) does not bind any endogenous miR expressed in HEK-293T cells and is therefore not involved in LPL Hap1 miR regulation.

Discussion

We identified a specific LPL haplotype (Hap4), combining the minor alleles of 8 SNP in strong linkage disequilibrium, closely associated with lower TG concentrations in 4 general population samples. We further established that the Hap1 (wild type) haplotype endowed functional binding sites for miR-29a, miR-29-b, miR-410 and miR-1277 and demonstrated that these binding sites were abolished by genetic variation within Hap4 haplotype. The losses of miRNA regulation in the LPL Hap4 haplotype carriers could increase LPL expression resulting in reduced plasma triglyceride levels in these subjects.

In agreement with our results, a LPL haplotype, similar to Hap4, named 19-4 was previously studied by Goodarzi et al.: carriers exhibited a significant increase of post-heparin LPL activity and HDLc concentration and a mild, although non-significant, decrease in plasma TG concentrations (23). In addition, some of the SNPs variants present on the LPL Hap4 haplotype were previously found to be associated with low plasma TG concentration. The p.Ser474Ter (rs328) was the first and most documented variant (11), followed by some 3'UTR variants: rs13702 (5, 8, 24-28), rs15285 (8), rs1059611 (28-30), rs3208305 and

rs3735964 (28). Interestingly, the variant rs1059611 was subsequently found to be associated with a significant increase of LPL mass (29).

There is growing evidence that 3'UTR polymorphism may modulate the regulation of gene expression by miRNA, as recently shown for gene involved in TG metabolism (5, 7). We provide evidence that the common human LPL 3'UTR is targeted by several miRs, which may cooperatively down-regulate LPL gene expression as shown for other genes (22, 31). Given the high degree of linkage disequilibrium between alleles of the SNPs from the Hap4 haplotype, these data suggest that a wide variety of different miRs would interact in a parallel manner across these sites, even though some are widely separated physically.

We therefore tested whether the loss of miR regulation in Hap4 resulted from the p.Ser474Ter (rs328) variation. The p.Ser474Ter variant was a well-established putative candidate to drive the TG lowering effect of the Hap4 haplotype (11-13). A direct effect of the p.Ser474Ter variant was suggested by LPL overexpression study in mice (13). However, extensive functional analysis of LPL-p.Ser474Ter mutant failed to identify a "gain of function" which could account for a TG lowering effect (11, 32, 33). Interestingly, another study showed that the rs328 minor allele was associated with an increase in LPL translational efficiency, either alone, or in association with 3'UTR variants within the 19-4 haplotype (34). Our bioinformatics analysis of the p.Ser474Ter (rs328) area predicted a binding site for the miR-29 family within Hap1 but not Hap4 (Figure 2).). We demonstrated that the observed regulation of Hap1 by the miR-29 family was independent on the rs328 allele status and consequently that the p.Ser474Ter (rs328) area on LPL mRNA is not involved in miRs regulation in HEK-293T cells. Our findings provide a mechanistic explanation consistent with previous studies suggesting that the putative p.Ser474Ter "gain of function" may at least partially result from linkage disequilibrium with 3'UTR variation (24, 35).

In summary, this work provides functional evidence for a post-transcriptional regulation of wild type LPL by a specific set of miRNA. Moreover, we confirm in 4 French general population samples the association with low plasma TG concentration with the specific Hap4 haplotype, as previously reported for the haplotype 19-4 in a Mexican-American population. We further demonstrate a loss of multiple miRNA target sites on Hap4 haplotype likely to account for an increased LPL activity leading to lower plasma triglyceride concentration. Thereby, our results provide an explanation for the association of low plasma TG concentrations with the p.Ser474Ter (rs328) variation present on the Hap4 haplotype. Finally, this study highlights a complex LPL miR regulation and provides an additional layer of complexity in TG metabolism regulation.

Acknowlegments

The authors would like to thank Hubert Vidal for helpful discussions.

Fundings

Professor Philippe Moulin received a grant from the Fondation de France (grant number 2013 38587). Cyrielle Caussy received a grant from the French Society of endocrinology (SFE).

Disclosures

None

References

1. Li Y, He P-P, Zhang D-W, et al. Lipoprotein lipase: From gene to atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):597-608. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.016.

2. Hensley LL, Ranganathan G, Wagner EM, et al. Transgenic mice expressing lipoprotein lipase in adipose tissue. Absence of the proximal 3'-untranslated region causes translational upregulation. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32702-32709. doi:10.1074/jbc.M304200200.

3. Ranganathan G, Vu D, Kern PA. Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with the 3' untranslated region. *J Biol Chem*. 1997;272(4):2515-2519.

4. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.

5. Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, et al. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. *Am J Hum Genet*. 2013;92(1):5-14. doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.020.

6. Gong J, Tong Y, Zhang H-M, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*. 2012;33(1):254-263. doi:10.1002/humu.21641.

7. Caussy C, Charrière S, Marçais C, et al. An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site. *Am J Hum Genet*. 2014;94(1):129-134. doi:10.1016/j.ajhg.2013.12.001.

8. Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, et al. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes*. 2011;60(4):1329-1339. doi:10.2337/db10-1011.

9. Kathiresan S, Manning AK, Demissie S, et al. A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*. 2007;8 Suppl 1:S17. doi:10.1186/1471-2350-8-S1-S17.

10. Middelberg RPS, Ferreira MAR, Henders AK, et al. Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40/APOE-C1-C2-C4 genes are associated with multiple cardiovascular-related traits. *BMC Med Genet*. 2011;12:123. doi:10.1186/1471-2350-12-123.

11. Rip J, Nierman MC, Ross CJ, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1236-1245. doi:10.1161/01.ATV.0000219283.10832.43.

12. Groenemeijer BE, Hallman MD, Reymer PW, et al. Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients.

The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. REGRESS Study Group. *Circulation*. 1997;95(12):2628-2635.

13. Ross CJD, Liu G, Kuivenhoven JA, et al. Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2143-2150. doi:10.1161/01.ATV.0000176971.27302.b0.

14. Bernard S, Sérusclat A, Targe F, et al. Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1158-1162.

15. Charriere S, Bernard S, Aqallal M, et al. Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2008;394(1-2):99-103. doi:10.1016/j.cca.2008.04.013.

16. Marçais C, Bernard S, Merlin M, et al. Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. *Diabetologia*. 2000;43(11):1346-1352. doi:10.1007/s001250051537.

17. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-989. doi:10.1086/319501.

18. Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P. Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 2000;24(3):382-387.

19. Goumidi L, Cottel D, Dallongeville J, Amouyel P, Meirhaeghe A. Effects of established BMI-associated loci on obesity-related traits in a French representative population sample. *BMC Genet*. 2014;15:62. doi:10.1186/1471-2156-15-62.

20. Luc G, Empana J-P, Morange P, et al. Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME Study. *Int J Obes 2005*. 2010;34(1):118-126. doi:10.1038/ijo.2009.204.

21. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007;39(10):1278-1284. doi:10.1038/ng2135.

22. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol*. 2003;5(1):R1. doi:10.1186/gb-2003-5-1-r1.

23. Goodarzi MO, Wong H, Quiñones MJ, et al. The 3' untranslated region of the lipoprotein lipase gene: haplotype structure and association with post-heparin plasma lipase activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4816-4823. doi:10.1210/jc.2005-0389.

24. Smith AJP, Palmen J, Putt W, Talmud PJ, Humphries SE, Drenos F. Application of statistical and functional methodologies for the investigation of genetic determinants of

coronary heart disease biomarkers: lipoprotein lipase genotype and plasma triglycerides as an exemplar. *Hum Mol Genet*. 2010;19(20):3936-3947. doi:10.1093/hmg/ddq308.

25. Tang W, Apostol G, Schreiner PJ, Jacobs DR, Boerwinkle E, Fornage M. Associations of lipoprotein lipase gene polymorphisms with longitudinal plasma lipid trends in young adults: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(2):179-186. doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.913426.

26. Lanktree MB, Anand SS, Yusuf S, Hegele RA, SHARE Investigators. Replication of genetic associations with plasma lipoprotein traits in a multiethnic sample. *J Lipid Res*. 2009;50(7):1487-1496. doi:10.1194/jlr.P900008-JLR200.

27. Evans D, Beil FU, Aberle J. Resequencing the untranslated regions of the lipoprotein lipase (LPL) gene reveals that variants in microRNA target sequences are associated with triglyceride levels. *J Clin Lipidol*. 2013;7(6):610-614. doi:10.1016/j.jacl.2013.09.006.

28. Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, et al. Genetic variations at the lipoprotein lipase gene influence plasma lipid concentrations and interact with plasma n-6 polyunsaturated fatty acids to modulate lipid metabolism. *Atherosclerosis*. 2011;218(2):416-422. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.092.

29. Mo X, Liu X, Wang L, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphism rs1059611 functionally influences serum lipid concentrations. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):511-516. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.005.

30. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500. doi:10.1038/ng1536.

31. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e363. doi:10.1371/journal.pbio.0020363.

32. Zhang H, Henderson H, Gagne SE, et al. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302(2):159-166.

33. Turlo K, Leung CS, Seo JJ, et al. Equivalent binding of wild-type lipoprotein lipase (LPL) and S447X-LPL to GPIHBP1, the endothelial cell LPL transporter. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(7):963-969. doi:10.1016/j.bbalip.2014.03.011.

34. Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya ID, et al. The lipoprotein lipase (LPL) S447X gain of function variant involves increased mRNA translation. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):143-147. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.028.

35. Deo RC, Reich D, Tandon A, et al. Genetic differences between the determinants of lipid profile phenotypes in African and European Americans: the Jackson Heart Study. *PLoS Genet*. 2009;5(1):e1000342. doi:10.1371/journal.pgen.1000342.

Figures legends

Figure 1. Meta-analysis of the effect of *LPL* haplotype 4 on TG concentration.

LPL haplotype combining the 4 SNPs (rs328, rs13702, rs1059611, rs10645926) were studied in 4 general population samples MONICA (n=852), MONA LISA (n=1194), PRIME (n=594) and CES (n=357), total number of individuals: 2997. Beta coefficient of LogTG concentration for haplotype 2222 corresponding to Hap4 and harboring all 4 SNP minor alleles compared to wild-type haplotype 1111 (Hap1). The test for heterogeneity was not significant (p=0.89). Heterogeneity quantified the effect of inconsistency across the studies and was calculated using Cochrane Q test with 3 degrees of freedom.

Figure 2. Putative loss of miRNA binding sites induced by LPL Hap4 haplotype.

Bio-informatic analyses identified several putative miRNA binding sites that may be disrupted by the minor alleles of the Hap4 haplotype SNPs**.**

Figure 3. Multiple miR binding on LPL Hap1, disrupted on Hap4 haplotype

Expression of LPL Hap1 and Hap4 luciferase constructs in HEK-293T cells. **(A)** Basal expression showed as raw luciferase activity. **(B)** Co-transfection with the precursor of candidate miRNA (miR-29a, miR-29b1, miR-410 or miR-1277) compared to control mimic (CTRL). Data are expressed as luciferase activity relative to control samples. **(C)** Co-transfection with specific miRNA inhibitors (anti-miR) or negative control (anti-neg). Data are expressed as luciferase activity relative to control (Hap1 anti-neg). All experiments were performed in triplicates, p values were determined by Student's t test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4. p.Ser474Ter (rs328) is not involved in the miR regulation of LPL Hap1 or Hap4 haplotype.

Assessment of p.Ser474Ter effect from LPL Hap1-rs328G and Hap4-rs328C expression in HEK-293T cells, obtained by introducing rs328 minor (G) or major (C) allele in Hap1 and Hap4 construct respectively. **(A)** Co-transfection with miR-29a and miR-29b1 precursor compared to control (CTRL). Data are expressed as luciferase activity relative to control samples. **(B)** Basal expression of Hap1, Hap1-rs328G, and Hap4, Hap4-rs328C constructs showed as raw luciferase activity compared to control Hap1. All experiments were performed in triplicates, p-values were determined by Student's t test. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

Table legend

Table 1. Haplotype reconstruction from 271 type 2 diabetic patients

The most frequent haplotypes (frequency >1%) are reported in the table. The miscellaneous haplotypes correspond to the haplotype predicted with a frequency <1%.

N: normotriglyceridemic , M : mildly hypertriglyceridemic, S: severely hypertriglyceridemic

1 : major allele, 2 : minor allele. The LPL Haplotype 4 corresponds to the minor allele of all 8 SNPs: rs328 (NC_000008.10:g.19819724C>G), rs3208305 (NC_000008.10:g.19823648A>T), rs1803924 (NC_000008.10:g.19823674C>T), rs3735964 (NC_000008.10:g.19824045C>A), rs13702 (NC_000008.10:g.19824492T>C), rs1059611 (NC_000008.10:g.19824563T>C), rs10645926 (NC_000008.10:g.19824626_19824627insTT) and rs15285 (NC_000008.10:g.19824667C>T), Refseq accession number NM_000237.2

LPL Haplotype	rs328	rs3208305	rs1803924	rs3735964	rs13702	rs1059611	rs10645926	rs15285	Haplotype frequency (%)			
									Total	N	M	S
Hap1	1	1	1	1	1	1	1	1	70.8	61.2	70.1	77.7
Hap2	1	2	1	1	2	1	1	2	11.0	13.2	11.1	9.0
Hap3	1	1	1	2	1	1	1	1	2.4	2.2	3.5	0.9
Hap4	2	2	2	2	2	2	2	2	2.0	8.5	0	0
Hap5	1	2	1	1	1	1	1	1	1.8	1.0	2.7	1.1
Hap6	1	1	1	1	2	1	1	2	1.6	0.0	2.7	1.1
Hap7	1	1	1	1	2	1	1	1	1.4	0.7	0.0	2.9
Hap8	2	2	2	2	1	2	2	2	1.4	0.8	2.5	0.0
Hap9	1	2	2	1	2	1	1	2	1.0	1.3	0.2	1.9
Miscellaneous haplotypes									6.6	11.1	7.2	5.4

Figure 1

Click here to download high resolution image

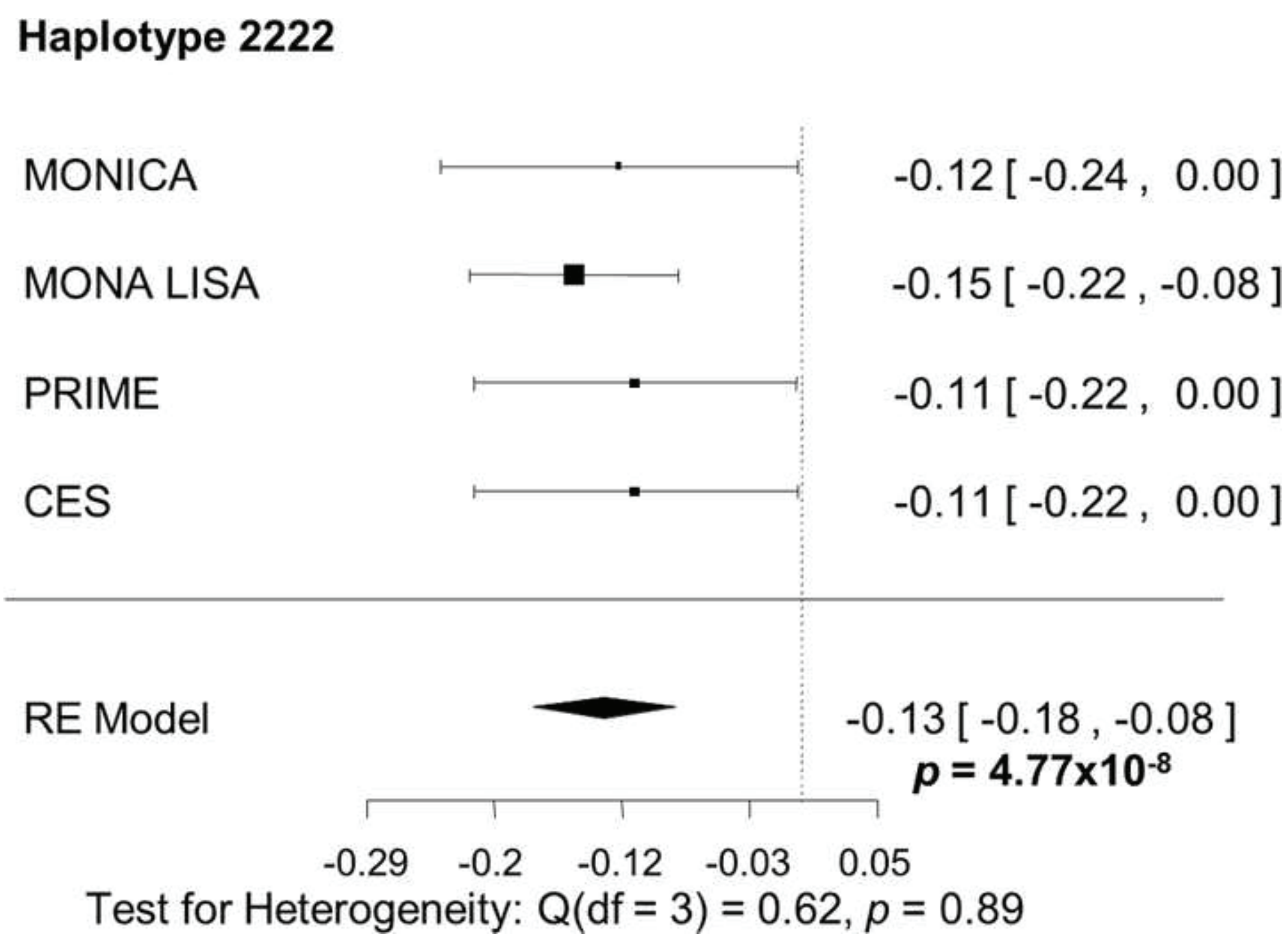


Figure 2

Click here to download high resolution image

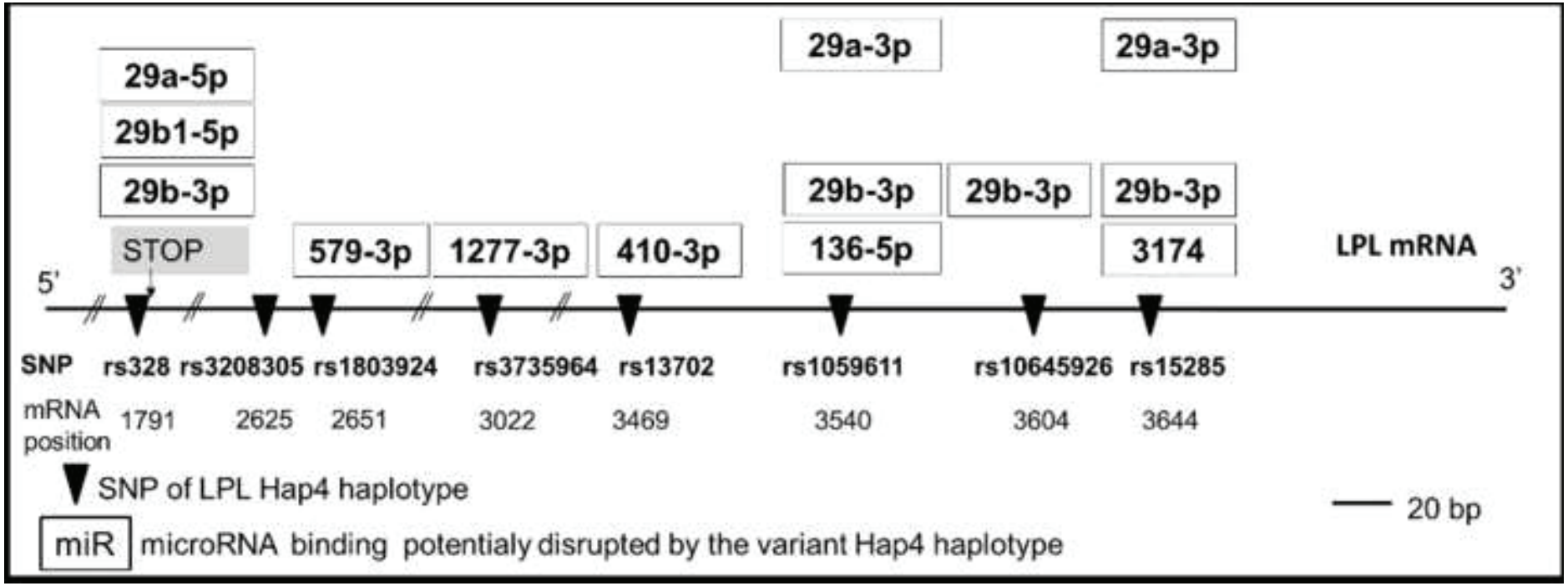


Figure 3

Click here to download high resolution image

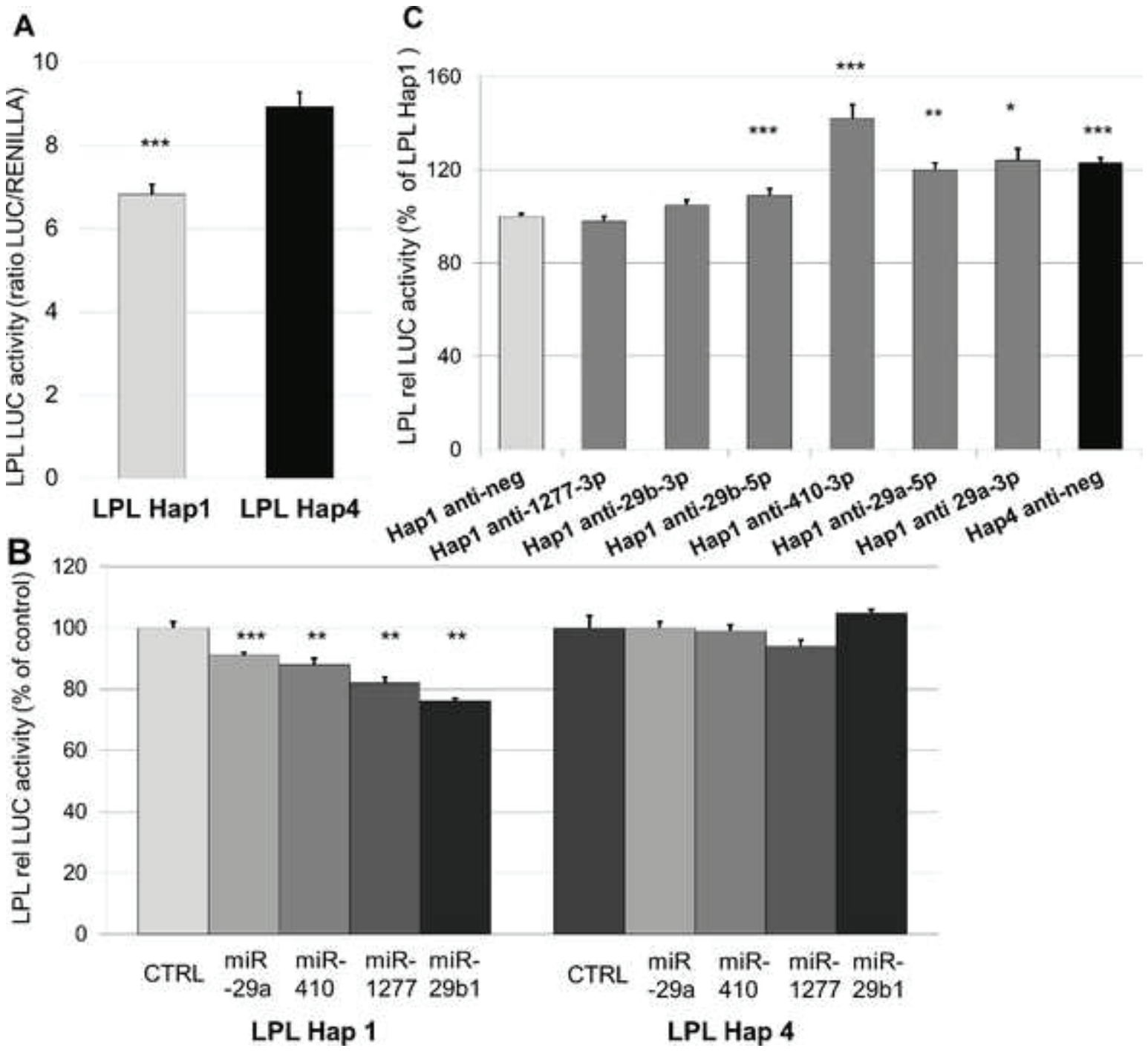
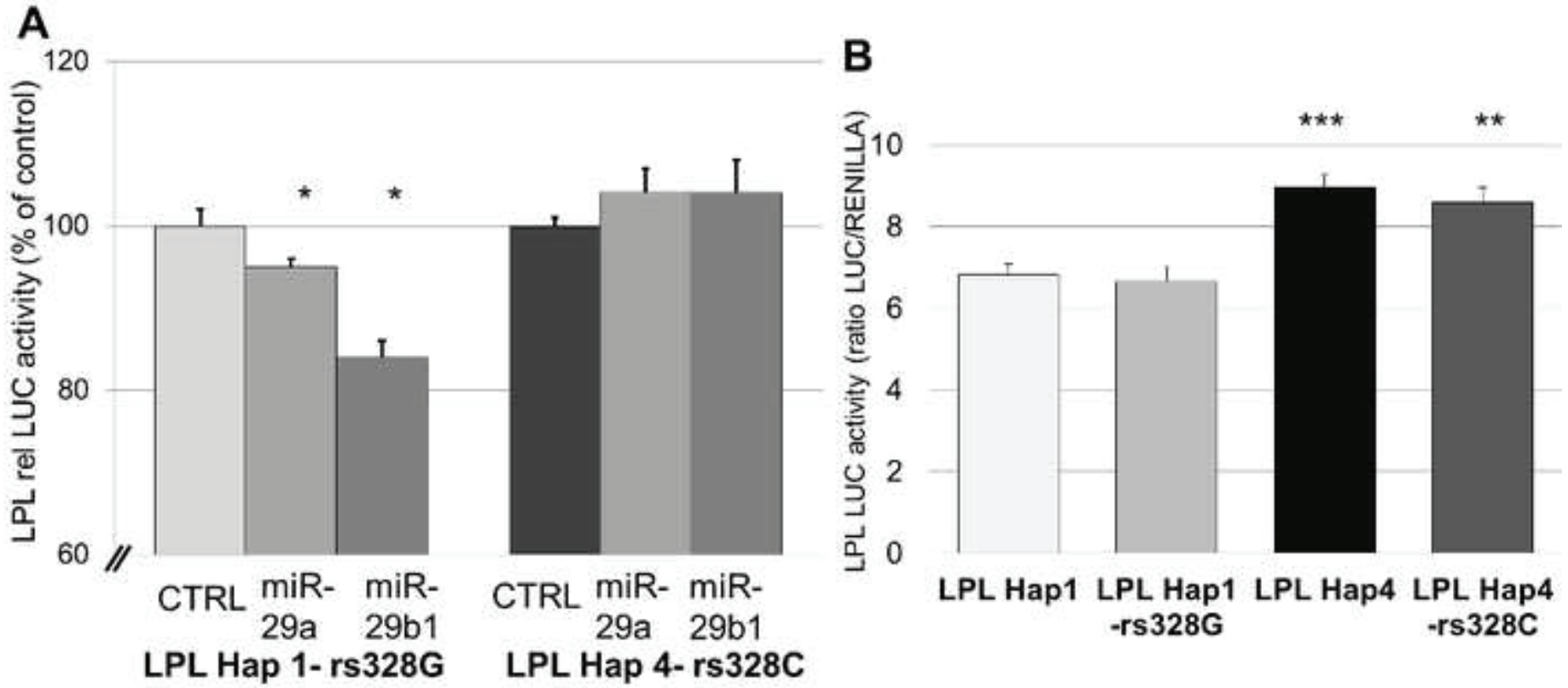


Figure 4
Click here to download high resolution image



Multiple microRNA regulation of Lipoprotein Lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a Triglyceride-lowering Haplotype harboring p.Ser474Ter

Supplementary data

Supplemental material

French general population studies

Population

Four polymorphisms (p.Ser474Ter (rs328), rs13702, rs1059611, rs10645926) were studied in four French population samples (MONICA, MONA LISA, PRIME, CES). The MONICA participants (n=852), were recruited within the framework of the WHO-MONICA project previously described in reference (1). MONA LISA (Monitoring National du Risque Artériel; National Monitoring of Arterial Risk) is a population-based, cross-sectional study of a representative sample of 1194 participants (aged 35-74) recruited from within the Lille urban area in northern France, described in reference (2). PRIME study *is* a population-based, prospective cohort designed to identify risk factors for coronary heart disease, as described previously (3). The present study includes 594 European-Caucasian men aged 50–59 available from the Lille center only. CES is composed of 357 non-obese (BMI<30 kg/m) men and women (77%) aged 18-65 years (mean age 40), recruited in the Centre de Prévention et d'Education pour la Santé (CPES) in the Institut Pasteur de Lille (France). The appropriate ethic committees approved all study protocols and all recruited subjects provided written informed consent.

Statistical analysis

Data were analyzed using Statistical Analysis Systems software, version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC). Associations with $p < 0.05$ were considered significant. Before analysis, the TG values were log-transformed to obtain normal distributions. Subjects taking lipid-lowering drugs were excluded from all analyses. Linear regression analyses using a general linear model were performed to analyze the associations between the LPL SNPs and TG concentrations. Adjustment variables were age, BMI and sex for all studies except for PRIME (age and BMI only). Haplotype analyses were based on the maximum likelihood model linked to the SEM algorithm (4, 5) and performed using Thesias software developed by INSERM U525, Paris, France (http://ecgene.net/genecanvas). For the meta-analysis, we combined the data of all studies using the R software metafor package and a random effect model. Associations with $p < 0.05$ were considered significant.

Supplemental References

1. Meirhaeghe, A., Helbecque, N., Cottel, D., and Amouyel, P. Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J.2000; 24:382–387.

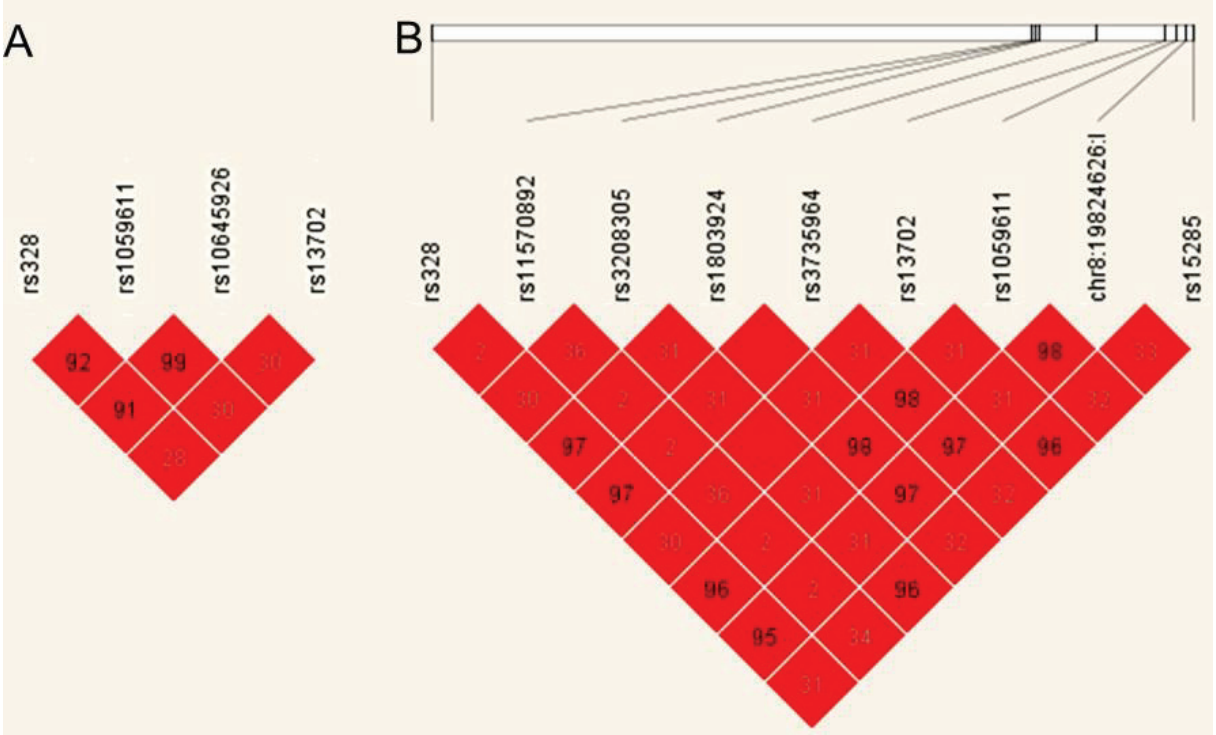
2. Goumidi, L., Cottel, D., Dallongeville, J., Amouyel, P., and Meirhaeghe, A. Effects of established BMI-associated loci on obesity-related traits in a French representative population sample. BMC Genet.2014; 15: 62.

3. Luc, G., Empana, J.-P., Morange, P., Juhan-Vague, I., Arveiler, D., Ferrieres, J.et al. Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME Study. Int. J. Obes.2010; 34:118–126.

4. Tregouet, D.-A., and Tiret, L. Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. Eur. J. Hum. Genet.2004;12:971–974.

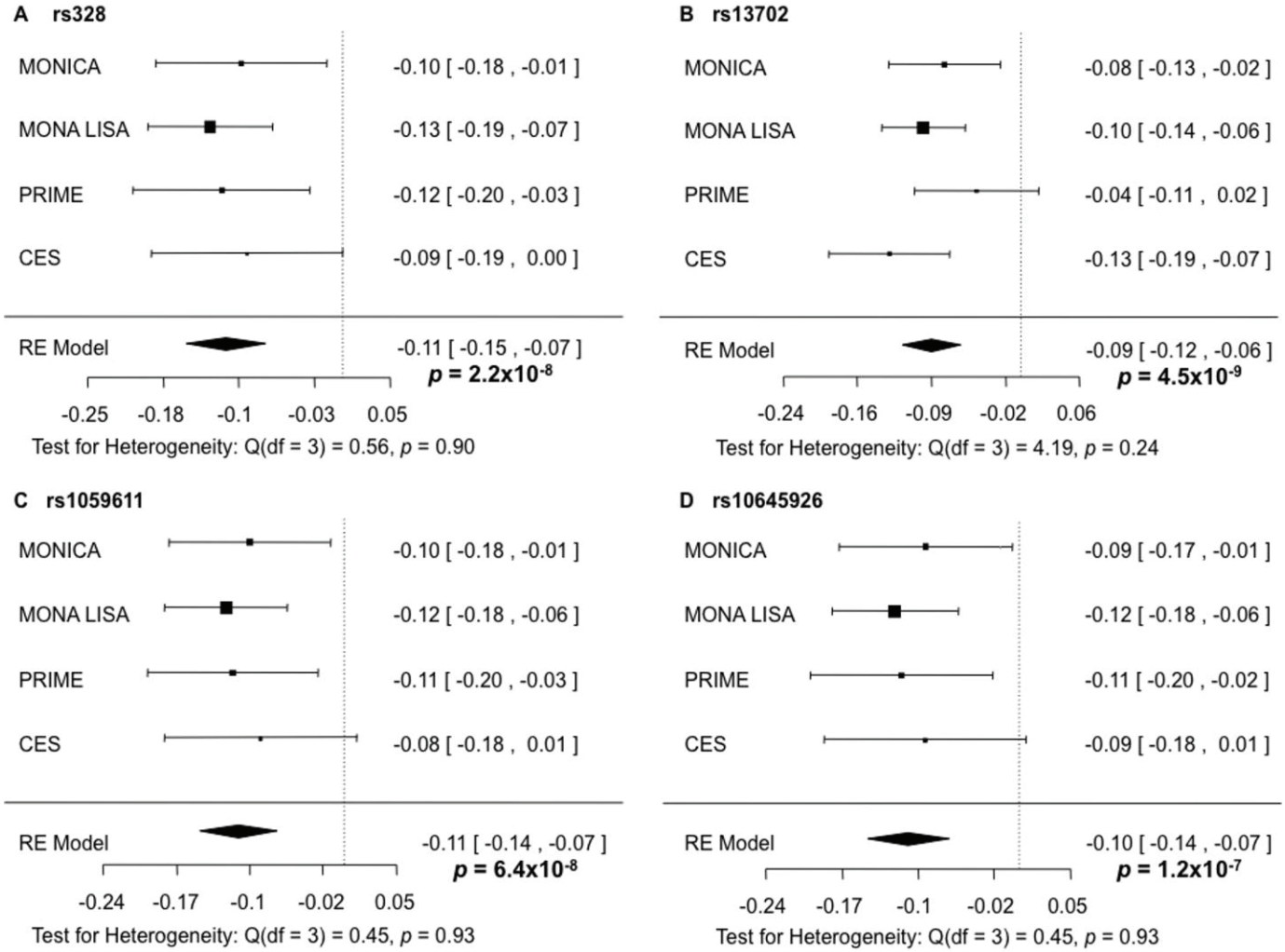
5. Tregouet, D.-A., Barbaux, S., Escolano, S., Tahri, N., Golmard, J.-L., Tiret, L.et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. Hum. Mol. Genet. 2002;11:2015–2023.

Supplemental Figures



Supplemental Figure 1. Linkage disequilibrum among *LPL* SNPs

(A) Linkage disequilibrium (LD) among 4 *LPL* SNPs (rs238, rs13702, rs1059611, rs10645926) in the MONA LISA study (n=1194). **(B)** Linkage disequilibrium (LD) among 9 *LPL* SNPs in the 1000 Genomes project database. D' and r^2 values were calculated using Haploview software. D' values are represented by a colour (red ($0.95 \leq D' \leq 1$)) and r values are given within the diamonds (0.02 (no LD) $\leq r \leq 1$ (high LD)).



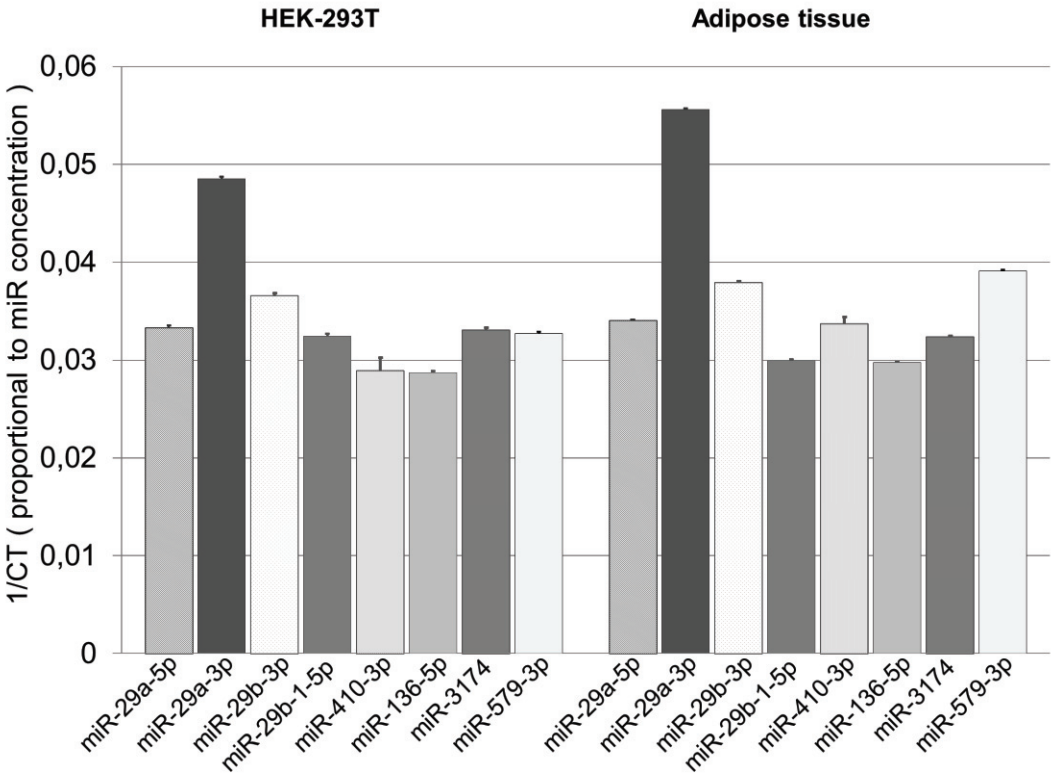
Supplemental Figure 2. Meta-analysis of individual effects of *LPL* SNPs from Haplotype 4 on TG concentration in general population samples.

Beta coefficient of LogTG concentration for (**A**) p.Ser474Ter (rs238), (**B**) rs13702, (**C**) rs1059611 and (**D**) rs10645926 minor alleles in 4 independent general population samples MONICA(n=852), MONA LISA (n=1194), PRIME (n=594) and CES (n=357). The test for heterogeneity was not significant (p=0.89.Heterogeneity quantified the effect of inconsistency across the studies and was calculated using Cochrane Q test with 3 degrees of freedom.

hsa-miR-29a-3p	rs10645926	miRNA: 3' auuGGC-UAAA-GUCU----ACCACGAu 5' Target:5' tatCTGCATTTATAAATGTGTGGTGCTaact(-/tt)3'
	rs1059611	miRNA: 3' auuggCUA-AAGUCUACCACGAu 5' Target:5' gtgtgGATGTGTAAATGGAGCTt 3'
hsa-miR-29b-3p	rs10645926	miRNA: 3' uuguGAC-UAAA-GUUU----ACCACGAu 5' Target:5' ctatCTGCATTTATAAATGTGTGGTGCTaact(-/tt)g 3'
	rs1059611	miRNA: 3' uugugaCUA-AAGUUUACCACGAu 5' Target:5' tgtgtgGATGTGTAAATGGAGCTt 3'
	rs15285	miRNA: 3' uuGUGACUAAAGUUUACCACGAu 5' Target:5' ctCACTCTTATGAAATGG-GCTt 3'
hsa-miR-1277	rs37355964	miRNA: 3' uuUUAUGUAUAUAUAGAUGCAu 5' Target:5' agAATGC---TCT-TCTACGTa 3'
hsa-miR-410	rs13702	miRNA: 3' uguccggUAGACACAAUAUAa 5' Target:5' tccgaaaAACTTTGTTATATa 3'

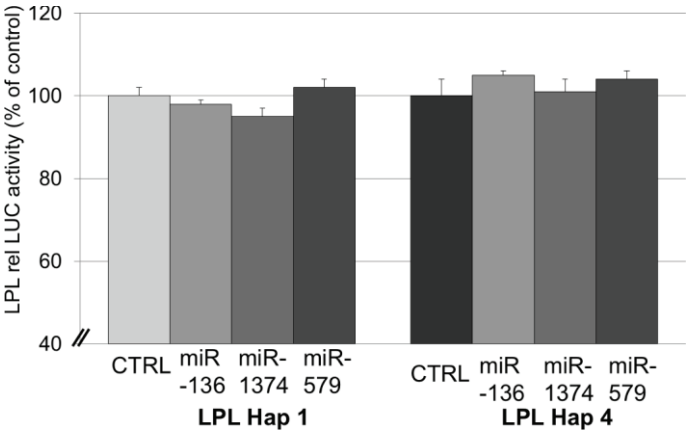
Supplemental Figure 3. miRs binding-site alignment with the wild-type *LPL* 3'UTR sequence.

Each SNPs major allele localization is identified by a red character in the LPL target sequence according to RegRNA software data.



Supplemental Figure 4. Expression profile of candidate miRNAs in adipose tissue and HEK-293T cells.

Total RNA from HEK-293T, or human visceral adipose tissue from surgical biopsies of 3 controls subjects (generous gift from team2 CarMen laboratory, Pierre Bénite) was isolated using TriPure Isolation reagent (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. miRNA-specific reverse transcription was performed with 500ng of purified total RNA, using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) and miRNA qPCR using TaqMan 2x Universal PCR master Mix, (Life Technologies) on Rotor-Gene Q thermocycler (QIAGEN). Data for miR-1277 expression could not be obtained due to the commercial unavailability of primers. miRNA expression was expressed in 1/cycle threshold, proportional to the miRNA concentration. All experiments were performed in triplicate.



Supplemental Figure 5. miR-136, miR-1374 and miR-579 do not target LPL Hap1 or Hap4 haplotype.

Expression of LPL Hap1 and Hap4 luciferase constructs in HEK-293T cells co-transfected with the precursor of candidate miRNA (136, 1374 or 579) compared to control mimic (CTRL). Data are expressed as luciferase activity relative to control samples. All experiments were performed in triplicates, p values were determined by Student's t test.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1. Baseline clinical characteristics and lipid parameters of the 271 type 2 diabetic patients according to their plasma triglyceride concentration.

	Group N n=68	**Group M n=114**	**Group S n=89**	**p value**
Age (years)	55.4 ± 8.7	55.2 ± 7.6	51.7 ± 11.4	0.013
Sex : M/F	55/13	70/44	65/24	0.016
BMI (kg/m^2)	28.9 ± 4.7	30.5 ± 5.6	30.6 ± 5.3	0.114
Hba1c (%)	8.9 ± 2.3	9.1 ± 2.1	8.5 ± 2.4	0.218
TC (mmol/l)	5.0 ± 0.9	5.7 ± 1.0	7.6 ± 4.3	<0.001
HDLc (mmol/l)	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.3	<0.001
LDLc (mmol/l)	3.3 ± 0.8	3.6 ± 0.9	3.1 ± 1.7	0.010
TG (mmol/l)	1.1 ± 0.2	2.8 ± 1.2	10.1 ± 11.0	<0.001

Group N : normotriglyceridemic , Group M : mildly hypertriglyceridemic , Group S : severely hypertriglyceridemic (TG>15 mmol/L), BMI: body mass index, M: male, F: female, Data are expressed as means +/−SEM. p-value were determined by one way ANOVA test for quantitative variables or Chi test for categorical variables.

Supplemental Table 2. Primers sequence and PCR condition used for LPL sequencing

LPL	Primer	Sequence	Annealing temperature
Exon9	LPL-ex9-F	5'-CTTTGTGAACAGTGCTTTTGATTG-3'	56.3°C
	LPL-ex9-R	5'-GCTGGTGATGGGGTGAA-3'	
Exon10	LPL-ex10-F1	5'-GCGGGAATTGTAAAACACTCA-3'	55°C
	LPL-ex10-R1	5'-TTTTAACGTTGGAGGATGTGC-3'	
	LPL-ex10-F2	5'-TTATGGGGTATAGTGGCCAAA-3'	56.8°C
	LPL-ex10-R2	5'-AAAACATCATTCATACTGCTGTGTAG-3'	
	LPL-ex10-F3	5'-CGGCACGAATCAGACTCA-3'	56.5°C
	LPL-ex10-R3	5'-AAAAAGAAGGGGGAGAGAGG-3'	
	LPL-ex10-F4	5'-TAGGCTTTATCGTTTATTGCTTAAT-3'	55°C
	LPL-ex10-R4	5'-TCATGTCAAAGCCAGGAACA-3'	
	LPL-ex10-F5	5'-CAGTTGTACTTCCAGTGCGTCT-3'	61.4°C, (-0.5°C/cycle)
	LPL-ex10-R5	5'-ACGTAGAAGAGCATTCTGAAAAA-3	
	LPL-ex10-F6	5'-AACAACTAATCAAGAGTGAGTGAACAA-3'	58.2°C
	LPL-ex10-R6	5'-TCAGAGAAAGGGTCGAAGTTCT-3'	
	LPL-ex10-F7	5'-AGTAGAAATTGTTCCTGATGTGC-3'	56.5°C
	LPL-ex10-R7	5'-GTAAAGCCAGAACATCCTTGAT-3'	
	LPL-ex10-F8	5'-TCTGGCTCCGAAAAACTTTG-3'	61°C, (-0.5°C/cycle)
	LPL-ex10-R8	5'-TGCTGAGTGAATCTGACCTAAGAA-3'	

PCR was performed with Taq-polymerase (25 mU/µl) (Optimase, Transgenomic), primers (0.4 µmol/l each), MgCl2 (1.5 mM/l), and dNTP (0.2 µm/l). A total of 30 cycles were performed at a denaturing temperature of 95°C for 30 seconds followed by an annealing temperature for 30 seconds and an extension temperature of 72°C (40 sec)

Supplemental Table 3. Allele frequency of p.Ser474Ter and *LPL* 3'UTR SNPs significantly associated with hypertriglyceridemia in a sample of 271 type 2 diabetic patients.

		Group N n=68	**Group M n=114**	**Group S n=89**	
SNP rs ID	**HGVS rs ID**	**minor allele n (frequency)**	**minor allele n (frequency)**	**minor allele n (frequency)**	**p**
rs328	c.1421C>G ; p.Ser474Ter	20 (15)	13 (6)	5 (3)	<0.001
rs3208305	c.*827A>C	46 (34)	48 (21)	27 (15)	<0.001
rs1803924	c.*853C>T	21 (15)	15 (7)	9 (5)	<0.01
rs3735964	c.*1224C>A	23 (17)	21 (9)	6 (3)	<0.001
rs13702	c.*1671T>C	41 (30)	33 (14)	33 (19)	<0.01
rs1059611	c.*1742T>C	20 (15)	11 (5)	7 (4)	<0.001
rs10645926	c.*1805_*1806insTT	20 (15)	11 (5)	7 (4)	<0.001
rs15285	c.*1846C>T	42 (31)	46 (20)	24 (13)	<0.01

Group N : normotriglyceridemic, Group M : mildly hypertriglyceridemic, Group S : severely hypertriglyceridemic, mA: minor allele. p-value were obtained with Chi test. All genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium

Supplemental Table 4. Score predictions of miRNA binding potentially disrupted by SNPs of the *LPL* Hap4 haplotype.

SNP	MicroRNA	RegRNA score*		PITA score*	
		MA	mA	MA	mA
rs328	miR-29a-5p	143	<120	No binding	No binding
	miR-29b-1-5p	135	122	No binding	No binding
	miR-29b-3p	128	120	No binding	No binding
rs3208305	No binding	No binding	No binding	No binding	No binding
rs1803924	miR-579-3p	151	<120	-10.8	-8.5
rs3735964	miR-1277-3p	148	<120	NT	NT
rs13702	miR-410	154	<120	-11.43	No binding
rs1059611	miR-136	151	<120	-12.2	No binding
	miR-29a-3p	133	<120	-16.2	-4.28
	miR-29b-3p	125	<120	-16.2	-0.37
rs10645926	miR-29a-3p	149	149	-14.22	-1.52
	miR-29b-3p	161	161	-1.08	-0.58
rs15285	miR-3174	147	<120	NT	NT
	miR-29b-3p	121	<120	No binding	No binding

MA : SNP major allele, mA : SNP minor allele NT: not tested (the miRNA sequence is not tested by the software).* Indicative relevant score threshold : RegRNA >160, PITA <-10.

3 DISCUSSION

3.1 IMPORTANCE DES POLYMORPHISMES DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE LA LIPOLYSE INTRAVASCULAIRE

De nombreux variants du gène de la LPL ou de ses gènes régulateurs sont significativement associés à la concentration plasmatique des triglycérides (revu dans la première partie de ce travail). Ces polymorphismes sont localisés aussi bien en région codante et non codante. Ces associations suggèrent que ces polymorphismes sont susceptibles de réguler l'activité de la LPL et d'influencer ainsi les concentrations de TG plasmatiques.

Toutefois, la majorité des polymorphismes identifiés n'apporte pas de preuve de leur fonctionnalité. Un hiatus persiste entre le nombre de SNPs associés aux concentrations de TG mis en évidence par le génotypage de masse des populations et le nombre de polymorphismes pour lesquels la fonctionnalité est prouvée. Cet écart pourrait s'expliquer par l'existence de polymorphismes non fonctionnels en déséquilibre de liaison avec un ou plusieurs autres SNPs fonctionnels, localisés sur le même gène ou à distance. Nos travaux suggèrent par exemple que l'association très significative du variant p.Ser474Ter (rs328) de la LPL, pourrait être au moins en partie liée à son déséquilibre de liaison avec des polymorphismes fonctionnels de la région 3'UTR de la LPL.

Alors que la fonctionnalité de la plupart des polymorphismes des régions codantes a fait l'objet de nombreuses études, celle de la majorité des polymorphismes des régions non codantes n'a pas été explorée. Ces polymorphismes pourraient interagir avec des facteurs de régulation à plusieurs niveaux tels que la transcription, l'épissage ou la stabilité des ARNm. Ils pourraient également être impliqués dans des mécanismes de régulation de l'expression des gènes non connus à ce jour. Ainsi, la découverte des miRs apporte de nouvelles perspectives pouvant expliquer la fonctionnalité de polymorphismes des régions 3'UTR. Nous avons démontré le rôle d'un polymorphisme du gène APOA5 et de plusieurs polymorphismes de la LPL dans la régulation de leurs expressions via des modifications de site de liaison de miRs. Ceci suggère que d'autres polymorphismes de ces gènes ou d'autres gènes impliqués dans la régulation de la LPL puissent également interagir avec les miRs.

3.2 AUTRES GÈNES OU POLYMORPHISMES POTENTIELLEMENT RÉGULÉS PAR LES MICROARNS

3.2.1 APOC3

L'importance de variants génétiques d'*APOC3* a dernièrement été mise en évidence par l'identification de mutations perte de fonction de ce gène inhibiteur de la LPL. Les sujets porteurs de ces mutations présentent une triglycéridémie basse et une diminution du risque cardiovasculaire (280,281). Inversement, d'autres polymorphismes d'APOC3 sont associés à une augmentation des concentrations de TG plasmatiques. En particulier le polymorphisme c.*40G>C (rs5128, SstI), localisé en région 3'UTR, est étroitement associé aux hypertriglycéridémies dans de nombreuses études. En revanche, sa fonctionnalité n'est pas clairement élucidée à ce jour ; mais les patients porteurs de l'allèle mineur (S2) ont une concentration d'apoC-III plasmatique plus importante que les non porteurs suggérant une augmentation d'expression d'APOC3 (293–297). Une des hypothèses possibles serait la perte de liaison de miR induite par ce polymorphisme.

3.2.2 ANGPTL 3 et 4

Les gènes ANGPTL 3 et 4 sont également des candidats potentiels d'une régulation médiée par les miRs. Tous deux, sont la cible fonctionnelle de miRs. L'interaction entre ANGPTL3 et le miR-27b a été mise en évidence in vitro. De plus la surexpression hépatique de miR-27b induit une diminution significative de l'expression d'*ANGPTL3 in vivo* chez la souris (569,570). Le miR-1562 réduit également l'expression d'ANGPTL3 chez le poulet (571). ANGPTL4 est, quant à lui, la cible du miR-29b *in vitro* (572). Plusieurs polymorphismes introniques d'ANGPTL3 sont significativement associés à la triglycéridémie dans les études GWAS. En revanche, curieusement, aucun polymorphisme n'a été identifié pour ANGPTL4. Cependant, des variants rares de la région 3'UTR pourraient néanmoins favoriser les hyperchylomicronémies par la suppression de site de liaison de miR. Cela induirait une augmentation de l'expression de ces gènes et par conséquent une inhibition plus marquée de l'activité LPL.

3.2.3 GPIHBP1, LMF1, APOC2, APOC3

La régulation d'aucun de ces gènes par les miRs n'a pas encore été mise en évidence. Les études d'associations génétiques n'ont pas non plus identifié de polymorphismes en région 3'UTR associés à la triglycéridémie et susceptibles d'interagir avec les miRs. APOC1 et APOC2 possèdent des régions 3'UTR relativement courtes (respectivement 119 et 311 paires de bases) alors que celle de LMF1 est intermédiaire : 825 paires de bases. Il y a donc peu d'argument pour une régulation médiée par les miRs. Par contre, GPIHBP1 est constitué d'une région 3'UTR relativement longue 3'UTR de 1650 paires de base, soit plus d'un tiers de la longueur total du gène. Cette caractéristique est habituellement rapportée pour les gènes régulés par les miRs (532). Comme pour le gène APOA5, la création d'un site de liaison d'un miR par un SNP pourrait induire une diminution d'expression de GPIHBP1 et conduire à une hypertriglycéridémie.

L'implication des miRs avec les polymorphismes des gènes impliqués dans la régulation de la triglycéridémie ajoute un nouveau niveau de complexité dans la régulation de la lipolyse intravasculaire. La découverte des miRs a permis de mettre en lumière l'importance des régions 3'UTR dans la régulation du génome. Etant donné, le nombre de polymorphismes des régions non-codantes associés à des traits phénotypiques, il est possible qu'à l'avenir d'autres mécanismes de régulation impliquant les régions non-codantes soient découverts.

3.3 IMPLICATION DES POLYMORPHISMES DANS L'ACCESSIBILITÉ DES MIRS POUR LEURS CIBLES

Du fait de la petite taille de la séquence « seed » d'un miR permettant sa liaison sur son ARNm cible, la modification d'une seule paire de base induite par un SNP peut modifier les sites des liaisons des miRs (9). Cette observation a été à la base de nos travaux et nous a amené à démontrer l'implication de plusieurs polymorphismes de la LPL ou du gène *APOA5* capable de modifier des sites de liaison soit par une création ou suppression. Des données complémentaires peuvent laisser penser que les mécanismes sous-tendant les modifications des sites de liaison des miRs induites par les SNP pourraient être plus complexes que le simple mésappariement d'une paire de base au sein de la séquence cible.

3.3.1 Hypothèse de régulation de l'APOA5 par plusieurs microARN

Nos travaux concernant la création de site de liaison du miR-485-5p avec le variant rare C du rs22667882 d'APOA5 ont été les premiers à identifier l'implication d'un miR dans la régulation de ce gène. Les travaux de Cui *et al*, ont ensuite rapporté, la suppression du site de liaison du miR-3201 par l'allèle C du rs22667882 (239). Contrairement à nos observations, les auteurs concluent que la suppression de site de liaison du miR-3210 explique l'augmentation de la triglycéridémie chez les porteurs de l'allèle C via une augmentation de l'expression d'APOA5 (239). Cette observation est contradictoire aussi bien avec nos travaux mettant en évidence une diminution d'expression du vecteur APOA5 muté pour l'allèle C dans des cellules hépatiques humaines, qu'avec les données de la littérature montrant une diminution d'expression d'APOA5 chez les porteurs de l'allèle C (241–245).

Néanmoins, Cui *et al*. rapporte des concentrations plasmatiques d'ApoA-V significativement plus importantes chez les porteurs homozygotes de l'allèle C comparées aux porteurs de l'allèle sauvage T. D'autres études ont observé une augmentation en apparence contradictoire des concentrations plasmatiques d'ApoA-V parallèlement à l'augmentation des concentrations de TG plasmatiques (revue dans (197)). Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène dénommée le « paradoxe d'APOA5 » pourrait être la diminution de la dégradation d'ApoA-V liée à sa liaison importante aux lipoprotéines et à sa capacité de transfert entre les différentes classes de lipoprotéines lors de la diminution de la lipolyse des LRTG (197).

Toutefois, la suppression du site de liaison du miR-3201 par l'allèle T du rs22667882 illustre la complexité de la régulation des miRs. En effet, plusieurs miRs sont donc susceptibles d'interagir avec le même polymorphisme. La suppression du miR-3201, induite par ce polymorphisme, pourrait ainsi favoriser l'accessibilité du miR485-5p sur sa séquence cible (Figure 21).

Enfin, la régulation de l'haplotype 2 d'APOA5 pourrait également faire intervenir les autres polymorphismes de cet haplotype qui interagiraient de manière à diminuer l'expression d'APOA5. Une étude de l'interaction des polymorphismes d'APOA5*2 démontre que la diminition d'expression d'APOA5 est maximale en présence des allèles rares des trois SNP de l'haplotype (c.-644C>T, c.-3A>G et c.*158C>T) (245). De plus l'association de c.-3A>G et c.*158C>T était la plus fonctionelle dans cette étude (245). Le polymophisme c.-3A>G est

situé trois nucléotides en amont d'un site d'initiation de la traduction dans la séquence « Kozak » (216), il pourrait favoriser l'action inhibitrice du miR-485-5p. Plusieurs hypothèses sont possible : soit l'interaction directe du miR-485-5p avec la région 5'UTR d'APOA5 pouvant former un pont entre les régions 5'UTR et 3'UTR en réprimant ainsi la traduction de l'ARNm (573) ; ou bien une modification de la structure secondaire de l'ARNm induite par le laison qui miR en région 3'UTR qui modifierait l'accessibilité d'autres facteurs de régulation de la région 5'UTR (574) (Figure 21).

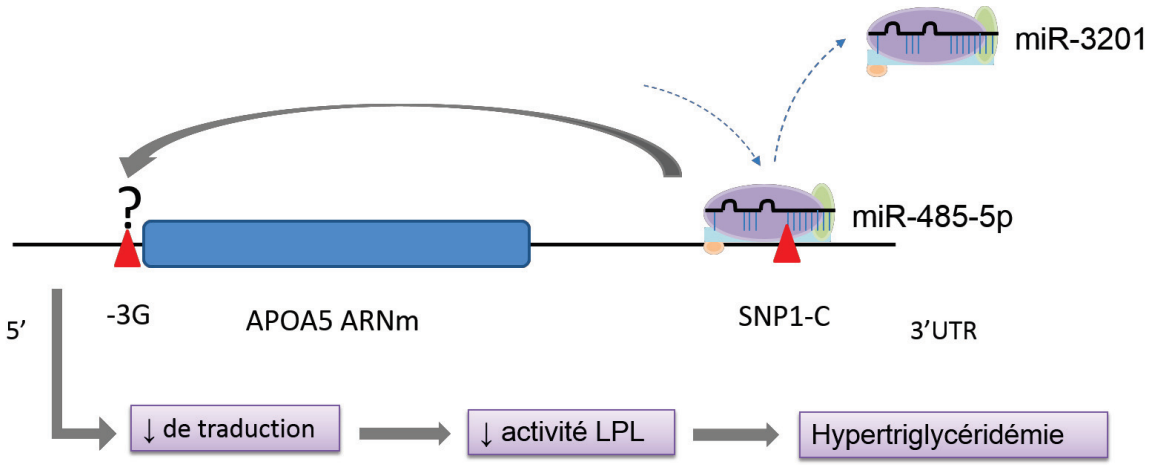


Figure 21 Hypothèse de régulation de l'haplotype 2 d'APOA5 par les microARNs.

*En présence de l'allèle C du SNP1 (c.*158C>T, rs22667882) le site du miR-3201 est supprimé et la liaison du miR-485-5p est créée. La liaison du miR-485-p pourrait induire la répression de traduction d'APOA5 qui pourrait être renforcée par son interaction avec l'allèle G du polymorphisme c.-3A>G du même haplotype*.

3.3.2 Implication des structures secondaires de l'ARNm dans la liaison des miRs

La liaison des miR-136, miR-3174 et miR-579 prédite par plusieurs logiciels de prédiction n'a pas été confirmée *in vitro*. De même, la liaison prédite in silico des miR-3188 et miR-1255a avec le variant rare du rs22667882 d'APOA5 n'a pas non plus été confirmée.

La discordance entre les prédictions bio-informatiques et les validations fonctionnelles suggèrent l'implication de facteurs additionnels à ceux classiquement pris en compte par les algorithmes de prédiction. L'accessibilité des miRs pour leur cible pourrait jouer un rôle

déterminant dans la reconnaissance des séquences cibles par les miRs. Quelques exemples d'altération de sites de liaison de miR induite par des polymorphismes localisés à distance de la séquence de liaison des miRs ont été rapportés. Le polymorphisme c.*1011C>T (rs9818870) du gène MRAS modifie la liaison du miR-195 alors qu'il est localisé en amont de son site de liaison (575). Un haplotype du gène ABCC2 induit également la suppression du miR-379 dans les cellules monocytaires (576). Une des hypothèses avancées par ces équipes est la modification de la structure secondaire de l'ARNm induite par ces SNPs qui altérerait ainsi l'accessibilité des miRs.

Il est intéressant de noter que la prédiction de la structure secondaire de l'ARNm de l'haplotype 1 de la LPL est différente de l'haplotype 4. De plus, la zone comportant le changement le plus important correspond à la localisation des SNPs de l'haplotype 4 (rs13702, rs1059611, rs10645926 and rs15285) (Figure 22). Ainsi la modification de la structure secondaire de l'ARNm de l'haplotype 4 de la LPL pourrait contribuer à la suppression des multiples sites de liaison de miRs en modifiant leurs accessibilités. Cette hypothèse nécessite d'autres études pour être validée, mais elle concorde avec d'autres études bio-informatiques et fonctionnelles démontrant l'importance des structures secondaires et tertiaires des ARNm pour la liaison des miRs (577,578). Ceci pourrait en partie expliquer les discordances entre les prédictions *in silico* des cibles de miR et les validations fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo*. Enfin, il est possible que d'autres mécanismes d'interaction à distance de la séquence « seed » avec des éléments du complexe RISC encore non connus soient également impliqués.

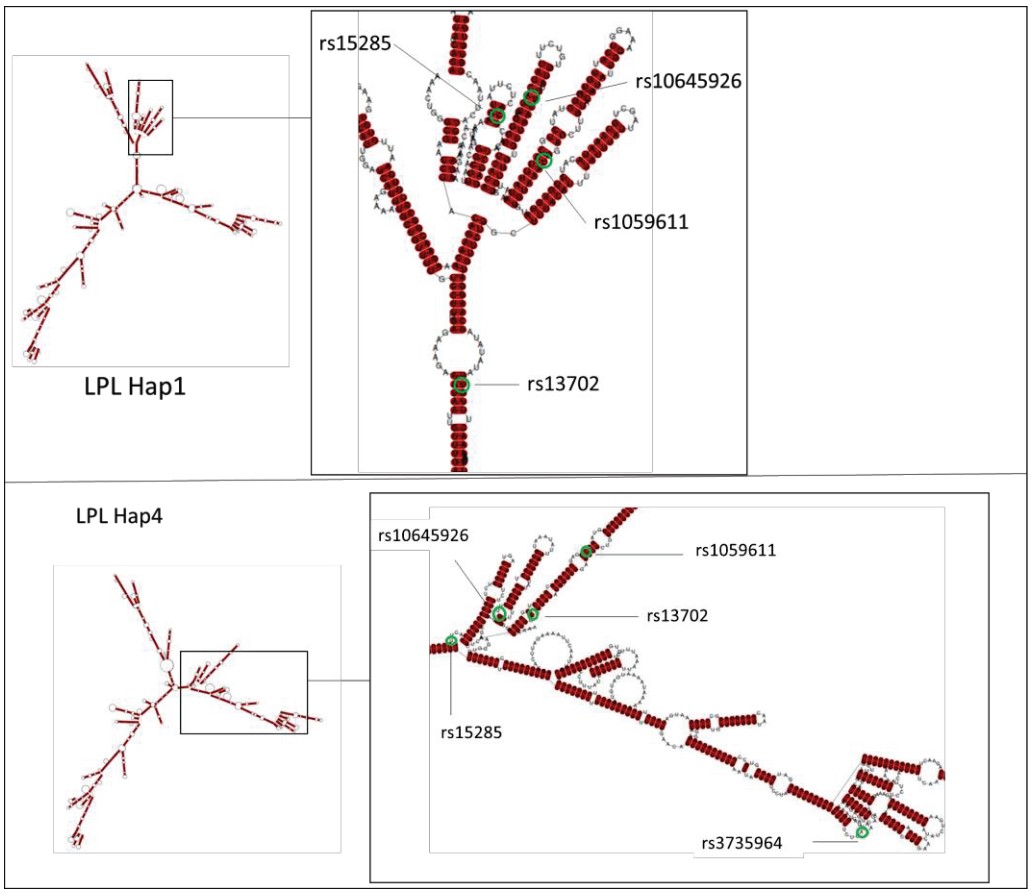


Figure 22 Prédictions des structures secondaires de l'ARN des Haplotype 1 et 4 de la LPL.

Les prédictions des structures secondaires des ARN des régions 3'UTR de la séquence sauvage (Hap1) ou de l'haplotype 4 (Hap4) de la LPL ont été déterminées selon le minimum d'énergie libre par le logiciel LocARN http://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp (579).

3.4 RÉGULATION PHYSIOLOGIQUE DE LA LPL PAR LES MICROARNS

3.4.1 Différentiation et régulation tissu-spécifique de la LPL par de multiples microARNs

De nombreux miRs sont capables de se lier sur la LPL dans différents modèles cellulaires. Nos travaux ont confirmé la liaison des miR-410 et miR-29a avec la LPL précédemment décrite (140,557,558) et ont également démontré la liaison fonctionnelle des miRs miR-1277a et miR-29b-1. Ces miRs complètent la liste des miRs dont l'interaction avec la LPL a déjà été établie : miR-27a/b, miR-467b, miR-590 (534,534,556,559,560).

Ainsi, la LPL est régulée par plusieurs miRs qui ont été mis en évidence dans différents types cellulaires. Leurs rôles dans la régulation physiologique de la LPL sont encore peu connus. Il est fort probable que cette régulation joue un rôle dans l'expression tissu-spécifique de la LPL et permette également sa modulation d'expression en fonction du stade de développement. Les travaux récemment publiés par Mattis *et al*., démontrent que l'expression de la LPL diminue parallèlement à l'augmentation de l'expression du miR-29a au cours du développement hépatique depuis la phase post-natale jusqu'à l'âge adulte de la souris. Ces travaux illustrent donc le rôle du miR-29a dans la régulation physiologique de l'expression hépatique de la LPL (558).

Le miR-29a est également impliqué dans la différentiation des adipocytes en coordonnant l'expression de la LPL en fonction du stade de différentiation des adipocytes en collaboration avec le miR-27a (556). De plus, le miR-27a cible le facteur de transcription PPARγ lui-même régulateur de le LPL. Ainsi, les miR-27a et miR-29a pourrait servir à réprimer l'expression de PPARγ et de la LPL dans les pré-adipocytes en formant une boucle de régulation dynamique (556).

3.4.2 Les miRs : possibles acteurs de la régulation nutritionnelle de l'activité LPL ?

L'expression des miRs est hautement régulée par l'environnement nutritionnel. Par exemple l'expression hépatique du miR-467b est significativement diminuée chez les souris

nourries par un régime riche en graisse et conduit à la suppression de la répression de la LPL. Les miRs sont différemment exprimés en fonction du régime alimentaire. Les travaux d'Ortega *et al*. démontrent qu'un régime enrichis en acides gras polyinsaturés durant 8 semaines, modifie significativement le profil de 11 miRs circulants chez des sujets sains. Ces variations de miR seraient également associées à des modifications métaboliques. Il a été observé que l'augmentation du miR-125a-5p circulant est significativement associée à une diminution de la triglycéridémie (579).

Parallèlement, les facteurs nutritionnels engendrent la modulation de l'activité LPL. En effet l'expression de la LPL, en particulier dans le tissu adipeux, fluctue en fonction de l'état nutritionnel. L'activité de la LPL est fortement diminuée en période de jeûne alors qu'elle est stimulée en période post-prandiale (2). Les mécanismes mis en jeu dans cette régulation sont multiples et encore mal compris. Ils font intervenir divers facteurs tels que l'insuline ou des facteurs de transcription comme PPARγ et SREBP-1 (revue dans (3)). Le rôle d'ANGPTL4 est également déterminant dans la régulation nutritionnelle de l'activité LPL (67,68).

Il est très intéressant de noter que ces différents facteurs sont régulés par les miRs également identifiés comme régulateurs de la LPL. En effet, ANGPTL4 peut être régulé in vitro par le miR-29b (572), PPARγ est la cible du miR-27a (556) et SREBP-1 est régulé par miR-132, miR-185, miR-342 (580) (581) et une étude suggère que le miR-29b pourrait réguler l'expression de SREBP-1 via la modification de la méthylation de son promoteur lors de la lactation chez la vache (582).

Il existe donc un faisceau d'arguments suggérant que les miRs pourraient être des facteurs supplémentaires impliqués dans la régulation nutritionnelle de la LPL. Ces miRs interviendraient à différents niveaux en ciblant directement la LPL ou ses facteurs de régulation. Ces différents miRs pourraient agir de manière coordonnée et constitueraient ainsi des boucles de régulation fines pouvant contribuer à expliquer la complexité de la régulation de la LPL. Cette nouvelle voie de régulation potentielle encore peu explorée devra être confirmée par des études complémentaires.

3.4.3 miR-29a, LPL et insulino-résistance

L'activité LPL est altérée dans des situations d'insulino-résistance en particulier chez les sujets diabétiques de type 2 (583). Les mécanismes impliqués sont mal connus et probablement plurifactoriels. L'expression de la famille du miR-29 dépend également de l'homéostasie glucidique. L'expression des miR-29a et miR-29b est augmentée dans le muscle, le tissu adipeux blanc et le foie des rats diabétiques (584,585). Les concentrations plasmatiques de miR-29a sont également augmentées chez les patients diabétiques de type 2 et lors de diabète gestationnel ou lors d'intolérance au glucose (586,587) Il n'est pas clairement déterminé si ces variations induisent l'insulino-résistance ou bien si elles en sont la conséquence. Toutefois, il est possible que l'augmentation de l'expression du miR-29a, dans ces situations d'insulino-résistance, puisse contribuer à diminuer l'expression de la LPL et favoriser ainsi l'hypertriglycéridémie de ces patients.

3.5 PERSPECTIVES DE THÉRAPEUTIQUE ANTI-MIR

Les thérapeutiques classiquement utilisées dans le traitement des hypertriglycéridémies modérées telles que les fibrates, la niacine ou encore les statines sont peu efficaces dans le traitement des hyperchylomicronémies. Le traitement de première intention de celles-ci demeure donc diététique, contraignant les patients atteints à suivre des régimes très stricts pauvres en graisse (15 à 25% des apports caloriques). Plusieurs approches différentes visent à développer de nouvelles thérapeutiques en ciblant différents régulateurs de la LPL (revu dans (4). La meilleure compréhension de la régulation de la LPL par les miRs pourrait conduire au développement de thérapeutiques ciblant l'inhibition spécifique de ces miRs. Ces anti-miR pourraient ainsi constituer de nouvelles pistes dans le traitement des hyperchylomicronémies.

3.5.1 Exemple de traitement anti-miR : miravirsen

Le traitement anti-miR le plus avancé dans son développement est l'inhibiteur du miR-122 dans le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) : miravirsen. Il s'agit d'un oligonucléotide anti-sens inhibiteur spécifique du miR-122 au niveau hépatique qui permet de de diminuer la réplication du virus de l'hépatite C induite par le mir-122. L'efficacité de ce traitement a été validée chez l'homme lors d'un essai clinique de phase IIa et les auteurs ne rapportent pas la survenue d'effets indésirables majeurs (588). Le suivi à

long terme (60 semaines d'un échantillon des patients traités par miravirsen) n'a pas non plus mis en évidence d'effets secondaires (589). Le développement de cette thérapeutique innovante se poursuit et plusieurs essais cliniques de phase II sont actuellement en cours.

3.5.2 Anti-miR-33 et HDL-cholestérol

Un autre exemple de thérapeutiques anti-miR concerne la régulation du HDL-c. Le rôle clé du miR-33 dans le métabolisme du HDL-c (revu dans (590)) a conduit au développement d'oligonucléotides anti-sens inhibiteurs de miR-33 dans le but d'augmenter les concentrations du HDL-c et ainsi de lutter contre le développement de l'athérosclérose. L'administration d'anti-miR-33a/b chez les primates augmente la concentration du HDL-c et diminue également la concentration des VLDL (540). De plus, l'inhibition du miR-33a favorise la diminution de la plaque d'athérome chez les souris ko pour le récepteur du LDL et dans un modèle de souris diabétiques (541,591,592). Néanmoins, l'inhibition à long terme du miR-33 pourrait avoir des effets secondaires. En effet, l'inhibition du miR-33 chez la souris nourrie par un régime riche en graisse induit des hypertriglycéridémies et des stéatoses hépatiques (593).

3.5.3 Perspectives de traitement anti-miR des hypertriglycéridémies

Nos travaux démontrent que l'inhibition *in vitro* des miR-410 et miR-29a pourrait augmenter l'expression de la LPL sauvage à un niveau identique de celle de la LPL muté pour l'haplotype 4. Cet haplotype est associé significativement à une diminution de la triglycéridémie. Ainsi l'inhibition de ces deux miRs pourrait contribuer à lutter contre l'hypertriglycéridémie.

3.5.3.1 Inhibition du miR-29

L'inhibition du miR-29, pourrait être une piste thérapeutique en particulier chez les patients diabétique de type 2. Son inhibition pourrait lever l'inhibition de l'activité LPL de ces sujets et en améliorer ainsi le profil lipidique. Néanmoins, l'expression du miR-29 est ubiquitaire (594) et il est impliqué dans de nombreux processus biologiques : maturation des neurones (595), le développement de fibrose (561), l'hématopoïèse (596) les défenses immunitaires (597) la sénescence cellulaire (598), le développement des cancers (599) ou de

pathologies rénales et cardiovasculaires (600). Ainsi, l'inhibition du miR-29 risquerait d'induire des effets indésirables prévisibles ou non par modification de ces autres voies de régulation. Toutefois, cette inhibition pourrait être envisagée à condition de développer un anti-miR-29a spécifique du tissu adipeux.

3.5.3.2 Inhibition du miR-410

L'inhibition du miR-410 dans le tissu adipeux pourrait être envisagée de la même façon. Son rôle dans d'autres voies de régulation est moins documenté. Son expression peut être augmentée ou bien diminuée lors de cancers (601–605). Il pourrait également favoriser l'insulino-sécrétion en réponse à une stimulation glucidique dans les cellules β pancréatiques de souris MIN6 (606). Son inhibition risquerait donc d'avoir des effets secondaires dans la régulation de l'homéostasie glucidique.

3.5.3.3 Inhibition du miR-485-5p

Nos travaux ont démontré que le miR-485-5p est probablement responsable d'une diminution de l'activité LPL via sa création de site de liaison induit par le variant rare du rs22667882 de l'haplotype 2 d'*APOA5*. L'inhibition hépatique du miR-485-5p pourrait être envisagée dans le traitement des hyperchylomicronémies. Du fait du premier passage hépatique, l'inoculation d'un anti-miR-485-5p par voie intraveineuse pourrait concentrer l'action de cet anti-miR au niveau hépatique en limitant ainsi ses potentiels effets secondaires. Une thérapeutique anti-miR-485-5p ciblée en fonction du génotype des patient et s'adressant aux sujets porteurs de l'haplotype 2 d'APOA5 pourrait ainsi être envisagée.

Ces perspectives thérapeutiques demeurent très hypothétiques mais apportent de nouvelles pistes de réflexion dans la recherche de traitements pouvant moduler l'activité de la LPL lors des hyperchylomicronémies et des hypertriglycéridémies consécutives à une accumulation de VLDL.

4 CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La LPL est une enzyme essentielle de la lipolyse intravasculaire. Sa régulation est complexe impliquant de nombreux facteurs qui ne sont pas encore tous élucidés. Parmi eux, les variants génétiques de la LPL ainsi que de ses gènes régulateurs peuvent jouer un rôle dans la modulation de la concentration des TG plasmatiques. En effet, certains polymorphismes ou SNPs de ces gènes sont significativement associés à la triglycéridémie, mais les mécanismes impliqués ne sont toujours compris. La découverte des miRs comme régulateurs de l'expression post-transcriptionnelle des gènes via leurs interactions avec les régions 3'UTR apporte de nouvelles perspectives pour la compréhension de la régulation de la LPL et de ses gènes activateurs.

L'étude de l'implication des miRs dans la régulation du gène APOA5 médié par le polymorphisme c.*158C>T (rs22667882) localisé en région 3'UTR, nous a permis d'identifier la création d'un site de liaison du miR-485-5p induite par l'allèle rare C du polymorphisme c.*158C>T (rs22667882). La diminution d'expression potentielle d'APOA5 induite par cette création de site de liaison nous a ainsi permis d'apporter une explication potentielle de la fonctionnalité de ce polymorphisme appartenant à l'haplotype 2 d'APOA5, significativement associé aux hypertriglycéridémies sévères et modérées en population générale.

L'étude de polymorphismes de la région 3'UTR de la LPL, nous a conduits à identifier un haplotype de la LPL, l'haplotype 4, composé de sept polymorphismes de la région 3'UTR de la LPL et de p.Ser474Ter (rs328) en déséquilibre de liaison. Cet haplotype est significativement associé à une diminution des concentrations de TG plasmatiques dans notre cohorte de patients diabétiques de type 2 et également en population générale. L'étude de la fonctionnalité de cet haplotype a mis en évidence la régulation de la LPL sauvage par de multiples miRs. La suppression de ces sites liaison, induite par les SNP de la région 3'UTR de l'haplotype 4 a permis d'une part, d'apporter une explication fonctionnelle potentielle de l'haplotype 4 médiée par les miRs, et d'autre part, d'expliquer l'association de la mutation p.Ser474Ter (rs328) à la diminution des TG plasmatiques par son déséquilibre de liaison avec les SNPs de la région 3'UTR de l'haplotype 4.

Nos travaux sont parmi les premiers à mettre en évidence l'implication des miRs dans la régulation de la LPL et de ses gènes régulateurs chez l'homme. Ils permettent ainsi d'accroitre

la connaissance des mécanismes impliqués dans la régulation de la lipolyse intravasculaire. Ils permettent également d'apporter des explications sur la fonctionnalité de polymorphismes significativement associés à la triglycéridémie jusqu'ici non élucidé. D'autres études seront nécessaires pour préciser le rôle des miRs dans la régulation physiologique de la LPL. L'étude de l'implication des miRs dans la régulation d'autres gènes régulateurs de la LPL tels qu'APOAC3, ANGPTL3, ANGPTL4, GPIHBP1, LMF1 devra également être poursuivie.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med Berl Ger. déc 2002;80(12):753-69.
2. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. Genes Dev. 1 mars 2013;27(5):459-84.
3. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. Biochim Biophys Acta. juill 2014;1841(7):919-33.
4. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. Nat Rev Endocrinol. juin 2015;11(6):352-62.
5. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR, et al. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. Nat Genet. août 2010;42(8):684-7.
6. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. Circ Cardiovasc Genet. 1 févr 2012;5(1):66-72.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 23 janv 2004;116(2):281-97.
8. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 23 janv 2009;136(2):215-33.
9. Gong J, Tong Y, Zhang H-M, Wang K, Hu T, Shan G, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. Hum Mutat. janv 2012;33(1):254-63.
10. Mahley R, Weisgraber KH, Farese R. Disorders of lipid metabolism. In: Williams Textbook of endocrinology. 10e éd. Philadelphia : Saunders; 2003. p. 1642-705.
11. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. Curr Opin Lipidol. juin 2014;25(3):200-6.
12. Anant S, Davidson NO. Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. Curr Opin Lipidol. avr 2001;12(2):159-65.
13. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. Am J Physiol Endocrinol Metab. juin 2009;296(6):E1183-94.
14. Mansbach CM, Siddiqi SA. The biogenesis of chylomicrons. Annu Rev Physiol. 2010;72:315-33.
15. Hamilton RL, Wong JS, Cham CM, Nielsen LB, Young SG. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. J Lipid Res. août 1998;39(8):1543-57.
16. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. J Cell Sci. 15 janv 2003;116(Pt 2):415-27.
17. Berriot-Varoqueaux N, Dannoura AH, Moreau A, Verthier N, Sassolas A, Cadiot G, et al. Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. Gastroenterology. nov 2001;121(5):1101-8.
18. Olofsson SO, Bjursell G, Boström K, Carlsson P, Elovson J, Protter AA, et al. Apolipoprotein B: structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. Atherosclerosis. nov 1987;68(1-2):1-17.
19. Williams KJ. Some things just have to be done in vivo: GPIHBP1, caloric delivery, and the generation of remnant lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2009;29(6):792-5.
20. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. Trends Endocrinol Metab TEM. sept 2011;22(9):353-63.
21. Rustaeus S, Lindberg K, Stillemark P, Claesson C, Asp L, Larsson T, et al. Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. J Nutr. févr 1999;129(2S Suppl):463S - 466S.
22. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. J Biol Chem. 5 déc 1987;262(34):16394-402.
23. Alexander CA, Hamilton RL, Havel RJ. Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. J Cell Biol. mai 1976;69(2):241-63.
24. Yang LY, Kuksis A, Myher JJ, Steiner G. Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: structural studies. J Lipid Res. janv 1995;36(1):125-36.

25. Tran K, Thorne-Tjomsland G, DeLong CJ, Cui Z, Shan J, Burton L, et al. Intracellular assembly of very low density lipoproteins containing apolipoprotein B100 in rat hepatoma McA-RH7777 cells. J Biol Chem. 23 août 2002;277(34):31187-200.
26. Gusarova V, Seo J, Sullivan ML, Watkins SC, Brodsky JL, Fisher EA. Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. J Biol Chem. 6 juill 2007;282(27):19453-62.
27. Swift LL. Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. J Biol Chem. 6 déc 1996;271(49):31491-5.
28. Hossain T, Riad A, Siddiqi S, Parthasarathy S, Siddiqi SA. Mature VLDL triggers the biogenesis of a distinct vesicle from the trans-Golgi network for its export to the plasma membrane. Biochem J. 1 avr 2014;459(1):47-58.
29. Asp L, Magnusson B, Rutberg M, Li L, Borén J, Olofsson S-O. Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mars 2005;25(3):566-70.
30. Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. J Lipid Res. févr 1992;33(2):167-78.
31. Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1989;86(24):9647-51.
32. Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. Biochem J. 15 oct 1992;287 (Pt 2):337-47.
33. Olafsen T, Young SG, Davies BSJ, Beigneux AP, Kenanova VE, Voss C, et al. Unexpected expression pattern for glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1 (GPIHBP1) in mouse tissues revealed by positron emission tomography scanning. J Biol Chem. 10 déc 2010;285(50):39239-48.
34. 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. 11 févr 1994;269(6):4626-33.
35. Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, et al. Lipoprotein lipase domain function. J Biol Chem. 8 avr 1994;269(14):10319-23.
36. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. Nat Genet. déc 2007;39(12):1483-7.
37. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. Curr Opin Lipidol. juin 2010;21(3):198-203.
38. Faustinella F, Smith LC, Semenkovich CF, Chan L. Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. J Biol Chem. 25 mai 1991;266(15):9481-5.
39. 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. sept 1994;35(9):1511-23.
40. Mailly F, Palmen J, Muller DP, Gibbs T, Lloyd J, Brunzell J, et al. Familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a catalogue of LPL gene mutations identified in 20 patients from the UK, Sweden, and Italy. Hum Mutat. 1997;10(6):465-73.
41. Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. J Lipid Res. août 2001;42(8):1180-6.
42. Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. Eur J Biochem FEBS. sept 2002;269(18):4701-10.
43. Wong H, Yang D, Hill JS, Davis RC, Nikazy J, Schotz MC. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. Proc Natl Acad Sci U S A. 27 mai 1997;94(11):5594-8.
44. Peterson J, Fujimoto WY, Brunzell JD. Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. J Lipid Res. août 1992;33(8):1165-70.
45. Olivecrona T, Liu G, Hultin M, Bengtsson-Olivecrona G. Regulation of lipoprotein lipase. Biochem Soc Trans. mai 1993;21(2):509-13.
46. Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. Biochim Biophys Acta. 3 janv 1992;1123(1):1-17.

47. Lookene A, Groot NB, Kastelein JJ, Olivecrona G, Bruin T. Mutation of tryptophan residues in lipoprotein lipase. Effects on stability, immunoreactivity, and catalytic properties. J Biol Chem. 10 janv 1997;272(2):766-72.
48. Goulbourne CN, Gin P, Tatar A, Nobumori C, Hoenger A, Jiang H, et al. The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. Cell Metab. 6 mai 2014;19(5):849-60.
49. Sivaram P, Choi SY, Curtiss LK, Goldberg IJ. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells. J Biol Chem. 1 avr 1994;269(13):9409-12.
50. Choi SY, Sivaram P, Walker DE, Curtiss LK, Gretch DG, Sturley SL, et al. Lipoprotein lipase association with lipoproteins involves protein-protein interaction with apolipoprotein B. J Biol Chem. 7 avr 1995;270(14):8081-6.
51. Hussain MM, Obunike JC, Shaheen A, Hussain MJ, Shelness GS, Goldberg IJ. High affinity binding between lipoprotein lipase and lipoproteins involves multiple ionic and hydrophobic interactions, does not require enzyme activity, and is modulated by glycosaminoglycans. J Biol Chem. 22 sept 2000;275(38):29324-30.
52. Ma Y, Henderson HE, Liu MS, Zhang H, Forsythe IJ, Clarke-Lewis I, et al. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. J Lipid Res. nov 1994;35(11):2049-59.
53. Wassef L, Quadro L. Uptake of dietary retinoids at the maternal-fetal barrier: in vivo evidence for the role of lipoprotein lipase and alternative pathways. J Biol Chem. 16 sept 2011;286(37):32198-207.
54. Argraves KM, Battey FD, MacCalman CD, McCrae KR, Gåfvels M, Kozarsky KF, et al. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. J Biol Chem. 3 nov 1995;270(44):26550-7.
55. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. J Lipid Res. sept 1997;38(9):1722-9.
56. Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. Curr Opin Lipidol. oct 2002;13(5):471-81.
57. Mamputu JC, Levesque L, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 2000;20(10):2212-9.
58. Kota RS, Ramana CV, Tenorio FA, Enelow RI, Rutledge JC. Differential effects of lipoprotein lipase on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma-mediated gene expression in human endothelial cells. J Biol Chem. 2 sept 2005;280(35):31076-84.
59. Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VEH, Rensen PCN, Pijl H, Romijn JA, et al. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. Diabetes. mars 2003;52(3):614-20.
60. Enerbäck S, Semb H, Tavernier J, Bjursell G, Olivecrona T. Tissue-specific regulation of guinea pig lipoprotein lipase; effects of nutritional state and of tumor necrosis factor on mRNA levels in adipose tissue, heart and liver. Gene. 15 avr 1988;64(1):97-106.
61. Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK. Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. Am J Physiol. mai 1991;260(5 Pt 2):R953-9.
62. Picard F, Naïmi N, Richard D, Deshaies Y. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. Diabetes. mars 1999;48(3):452-9.
63. Ong JM, Simsolo RB, Saffari B, Kern PA. The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes. Endocrinology. avr 1992;130(4):2310-6.
64. Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. J Clin Invest. nov 1993;92(5):2191-8.
65. Ottosson M, Mårin P, Karason K, Elander A, Björntorp P. Blockade of the glucocorticoid receptor with RU 486: effects in vitro and in vivo on human adipose tissue lipoprotein lipase activity. Obes Res. mai 1995;3(3):233-40.
66. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. J Biol Chem. 25 mai 1989;264(15):9030-8.
67. Lichtenstein L, Berbée JFP, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A, Kema IP, et al. Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2007;27(11):2420-7.

68. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 14 nov 2006;103(46):17450-5.
69. Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, et al. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. Mol Endocrinol Baltim Md. sept 1990;4(9):1416-22.
70. Yukht A, Davis RC, Ong JM, Ranganathan G, Kern PA. Regulation of lipoprotein lipase translation by epinephrine in 3T3-L1 cells. Importance of the 3' untranslated region. J Clin Invest. nov 1995;96(5):2438-44.
71. Wu G, Brouckaert P, Olivecrona T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF-alpha is involved. Am J Physiol Endocrinol Metab. mai 2004;286(5):E711-7.
72. Sugden MC, Holness MJ, Howard RM. Changes in lipoprotein lipase activities in adipose tissue, heart and skeletal muscle during continuous or interrupted feeding. Biochem J. 15 mai 1993;292 (Pt 1):113-9.
73. Quig DW, Layman DK, Bechtel PJ, Hackler LR. The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats. J Nutr. juin 1983;113(6):1150-6.
74. Hildebrandt AL, Neufer PD. Exercise attenuates the fasting-induced transcriptional activation of metabolic genes in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. juin 2000;278(6):E1078-86.
75. Kamei Y, Mizukami J, Miura S, Suzuki M, Takahashi N, Kawada T, et al. A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. FEBS Lett. 11 févr 2003;536(1-3):232-6.
76. Hamilton MT, Etienne J, McClure WC, Pavey BS, Holloway AK. Role of local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise. Am J Physiol. déc 1998;275(6 Pt 1):E1016-22.
77. Greiwe JS, Holloszy JO, Semenkovich CF. Exercise induces lipoprotein lipase and GLUT-4 protein in muscle independent of adrenergic-receptor signaling. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. juill 2000;89(1):176-81.
78. Oscai LB, Caruso RA, Wergeles AC. Lipoprotein lipase hydrolyzes endogenous triacylglycerols in muscle of exercised rats. J Appl Physiol. avr 1982;52(4):1059-63.
79. Pilegaard H, Keller C, Steensberg A, Helge JW, Pedersen BK, Saltin B, et al. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. J Physiol. 15 mai 2002;541(Pt 1):261-71.
80. Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MKC, Moonen-Kornips E, Schaart G, Kooi ME, Saris WHM, et al. Short-term training is accompanied by a down regulation of ACC2 mRNA in skeletal muscle. Int J Sports Med. oct 2006;27(10):786-91.
81. Seip RL, Mair K, Cole TG, Semenkovich CF. Induction of human skeletal muscle lipoprotein lipase gene expression by short-term exercise is transient. Am J Physiol. févr 1997;272(2 Pt 1):E255-61.
82. Pedersen SB, Bak JF, Holck P, Schmitz O, Richelsen B. Epinephrine stimulates human muscle lipoprotein lipase activity in vivo. Metabolism. avr 1999;48(4):461-4.
83. Deshaies Y, Géloën A, Paulin A, Marette A, Bukowiecki LJ. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme. janv 1993;25(1):13-6.
84. Lithell H, Orlander J, Schéle R, Sjödin B, Karlsson J. Changes in lipoprotein-lipase activity and lipid stores in human skeletal muscle with prolonged heavy exercise. Acta Physiol Scand. nov 1979;107(3):257-61.
85. Nikkilä EA, Taskinen MR, Rehunen S, Härkönen M. Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of runners: relation to serum lipoproteins. Metabolism. nov 1978;27(11):1661-7.
86. Taskinen MR, Nikkilä EA. Effect of acute vigorous exercise on lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in physically active men. Artery. 1980;6(6):471-83.
87. Kuwajima M, Foster DW, McGarry JD. Regulation of lipoprotein lipase in different rat tissues. Metabolism. juin 1988;37(6):597-601.
88. Ruge T, Bergö M, Hultin M, Olivecrona G, Olivecrona T. Nutritional regulation of binding sites for lipoprotein lipase in rat heart. Am J Physiol Endocrinol Metab. févr 2000;278(2):E211-8.
89. Ruge T, Wu G, Olivecrona T, Olivecrona G. Nutritional regulation of lipoprotein lipase in mice. Int J Biochem Cell Biol. févr 2004;36(2):320-9.
90. Sambandam N, Abrahani MA, St Pierre E, Al-Atar O, Cam MC, Rodrigues B. Localization of lipoprotein lipase in the diabetic heart: regulation by acute changes in insulin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 1999;19(6):1526-34.

91. Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B. Cold-induced beta-adrenergic recruitment of lipoprotein lipase in brown fat is due to increased transcription. Am J Physiol. févr 1988;254(2 Pt 1):E155-61.
92. Klingenspor M, Ebbinghaus C, Hülshorst G, Stöhr S, Spiegelhalter F, Haas K, et al. Multiple regulatory steps are involved in the control of lipoprotein lipase activity in brown adipose tissue. J Lipid Res. août 1996;37(8):1685-95.
93. Kuusela P, Jacobsson A, Klingenspor M, Rehnmark S, Heldmaier G, Cannon B, et al. Contrasting adrenergic effects on lipoprotein lipase gene expression in the brown adipose tissue of intact mice and in cultured brown adipocytes from mice. Biochim Biophys Acta. 21 avr 1997;1345(3):327-37.
94. Goldberg DI, Khoo JC. Regulation of lipoprotein lipase secretion by mouse peritoneal macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 15 janv 1987;142(1):1-6.
95. Hill MR, Kelly K, Wu X, Wanker F, Bass H, Morgan C, et al. Lipopolysaccharide regulation of lipoprotein lipase expression in murine macrophages. Infect Immun. mars 1995;63(3):858-64.
96. Sopher O, Goldman R. Bacterial lipopolysaccharide suppresses the expression of lipoprotein lipase in murine macrophages: a process independent of tumor necrosis factor or interleukin 1. Immunol Lett. juill 1987;15(3):261-5.
97. White JR, Chait A, Klebanoff SJ, Deeb S, Brunzell JD. Bacterial lipopolysaccharide reduces macrophage lipoprotein lipase levels: an effect that is independent of tumor necrosis factor. J Lipid Res. oct 1988;29(10):1379-85.
98. Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. Cytokine. juill 1996;8(7):525-33.
99. Chokshi N, Blumenschein SD, Ahmad Z, Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. J Clin Lipidol. juin 2014;8(3):287-95.
100. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. Atherosclerosis. déc 1997;135(2):145-59.
101. Sagoo GS, Tatt I, Salanti G, Butterworth AS, Sarwar N, van Maarle M, et al. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. Am J Epidemiol. 1 déc 2008;168(11):1233-46.
102. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. Circulation. 8 juin 1999;99(22):2901-7.
103. Samuels ME, Forbey KC, Reid JE, Abkevich V, Bulka K, Wardell BR, et al. Identification of a common variant in the lipoprotein lipase gene in a large Utah kindred ascertained for coronary heart disease: the -93G/D9N variant predisposes to low HDL-C/high triglycerides. Clin Genet. févr 2001;59(2):88-98.
104. van Hoek M, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Sijbrands EJG. Diagnostic value of post-heparin lipase testing in detecting common genetic variants in the LPL and LIPC genes. Eur J Hum Genet EJHG. nov 2009;17(11):1386-93.
105. Kastelein JJ, Groenemeyer BE, Hallman DM, Henderson H, Reymer PW, Gagné SE, et al. The Asn9 variant of lipoprotein lipase is associated with the -93G promoter mutation and an increased risk of coronary artery disease. The Regress Study Group. Clin Genet. janv 1998;53(1):27-33.
106. Mailly F, Tugrul Y, Reymer PW, Bruin T, Seed M, Groenemeyer BF, et al. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9-->Asn). Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol. avr 1995;15(4):468-78.
107. Razzaghi H, Day BW, McClure RJ, Kamboh MI. Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. J Mol Graph Model. 2001;19(6):487-94, 587-90.
108. Ma Y, Ooi TC, Liu MS, Zhang H, McPherson R, Edwards AL, et al. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. J Lipid Res. juin 1994;35(6):1066-75.
109. Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. J Lipid Res. sept 2006;47(9):1908-14.
110. Reymer PW, Gagné E, Groenemeyer BE, Zhang H, Forsyth I, Jansen H, et al. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. Nat Genet. mai 1995;10(1):28-34.
111. Zhang H, Henderson H, Gagne SE, Clee SM, Miao L, Liu G, et al. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. Biochim Biophys Acta. 26 juill 1996;1302(2):159-66.
112. Faustinella F, Smith LC, Chan L. Functional topology of a surface loop shielding the catalytic center in lipoprotein lipase. Biochemistry (Mosc). 18 août 1992;31(32):7219-23.

113. Stocks J, Thorn JA, Galton DJ. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. J Lipid Res. juin 1992;33(6):853-7.
114. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Deeb SS, Brunzell JD, Jensen G, et al. Mutations in the lipoprotein lipase gene associated with ischemic heart disease in men. The Copenhagen city heart study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 1999;19(6):1535-40.
115. Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS). Arterioscler Thromb Vasc Biol. avr 1998;18(4):526-34.
116. Yamada Y, Matsuo H, Warita S, Watanabe S, Kato K, Oguri M, et al. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. Genomics. nov 2007;90(5):551-8.
117. Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Influence of lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism on tracking of triglycerides and HDL cholesterol from childhood to adulthood and familial risk of coronary artery disease: the Bogalusa heart study. Atherosclerosis. déc 2001;159(2):367-73.
118. Tan A, Sun J, Xia N, Qin X, Hu Y, Zhang S, et al. A genome-wide association and gene-environment interaction study for serum triglycerides levels in a healthy Chinese male population. Hum Mol Genet. 1 avr 2012;21(7):1658-64.
119. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. Nat Genet. févr 2008;40(2):189-97.
120. Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJP, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2006;26(6):1236-45.
121. Kozaki K, Gotoda T, Kawamura M, Shimano H, Yazaki Y, Ouchi Y, et al. Mutational analysis of human lipoprotein lipase by carboxy-terminal truncation. J Lipid Res. oct 1993;34(10):1765-72.
122. Faustinella F, Chang A, Van Biervliet JP, Rosseneu M, Vinaimont N, Smith LC, et al. Catalytic triad residue mutation (Asp156----Gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency. Co-inheritance with a nonsense mutation (Ser447----Ter) in a Turkish family. J Biol Chem. 5 août 1991;266(22):14418-24.
123. Salinelli S, Lo JY, Mims MP, Zsigmond E, Smith LC, Chan L. Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. J Biol Chem. 6 sept 1996;271(36):21906-13.
124. Previato L, Guardamagna O, Dugi KA, Ronan R, Talley GD, Santamarina-Fojo S, et al. A novel missense mutation in the C-terminal domain of lipoprotein lipase (Glu410-->Val) leads to enzyme inactivation and familial chylomicronemia. J Lipid Res. sept 1994;35(9):1552-60.
125. Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fisher RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. Atherosclerosis. avr 2003;167(2):311-7.
126. Nierman MC, Rip J, Kuivenhoven J-A, van Raalte DH, Hutten BA, Sakai N, et al. Carriers of the frequent lipoprotein lipase S447X variant exhibit enhanced postprandial apoprotein B-48 clearance. Metabolism. nov 2005;54(11):1499-503.
127. Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya ID, Tripathi P, Rotter JI, Goodarzi MO, et al. The lipoprotein lipase (LPL) S447X gain of function variant involves increased mRNA translation. Atherosclerosis. mars 2012;221(1):143-7.
128. Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. Curr Opin Lipidol. août 2012;23(4):310-20.
129. Talmud PJ, Hall S, Holleran S, Ramakrishnan R, Ginsberg HN, Humphries SE. LPL promoter -93T/G transition influences fasting and postprandial plasma triglycerides response in African-Americans and Hispanics. J Lipid Res. juin 1998;39(6):1189-96.
130. Ehrenborg E, Clee SM, Pimstone SN, Reymer PW, Benlian P, Hoogendijk CF, et al. Ethnic variation and in vivo effects of the -93t-->g promoter variant in the lipoprotein lipase gene. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 1997;17(11):2672-8.
131. Hall S, Chu G, Miller G, Cruickshank K, Cooper JA, Humphries SE, et al. A common mutation in the lipoprotein lipase gene promoter, -93T/G, is associated with lower plasma triglyceride levels and increased promoter activity in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 1997;17(10):1969-76.
132. Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. J Lipid Res. déc 1996;37(12):2627-37.

133. Chen Q, Razzaghi H, Demirci FY, Kamboh MI. Functional significance of lipoprotein lipase HindIII polymorphism associated with the risk of coronary artery disease. Atherosclerosis. sept 2008;200(1):102-8.
134. Vohl MC, Lamarche B, Moorjani S, Prud'homme D, Nadeau A, Bouchard C, et al. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism modulates plasma triglyceride levels in visceral obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mai 1995;15(5):714-20.
135. Middelberg RPS, Ferreira MAR, Henders AK, Heath AC, Madden PAF, Montgomery GW, et al. Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40/APOE-C1-C2-C4 genes are associated with multiple cardiovascular-related traits. BMC Med Genet. 2011;12:123.
136. Deo RC, Reich D, Tandon A, Akylbekova E, Patterson N, Waliszewska A, et al. Genetic differences between the determinants of lipid profile phenotypes in African and European Americans: the Jackson Heart Study. PLoS Genet. janv 2009;5(1):e1000342.
137. Smith AJP, Palmen J, Putt W, Talmud PJ, Humphries SE, Drenos F. Application of statistical and functional methodologies for the investigation of genetic determinants of coronary heart disease biomarkers: lipoprotein lipase genotype and plasma triglycerides as an exemplar. Hum Mol Genet. 15 oct 2010;19(20):3936-47.
138. Tang W, Apostol G, Schreiner PJ, Jacobs DR Jr, Boerwinkle E, Fornage M. Associations of lipoprotein lipase gene polymorphisms with longitudinal plasma lipid trends in young adults: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. Circ Cardiovasc Genet. avr 2010;3(2):179-86.
139. Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, et al. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. Diabetes. avr 2011;60(4):1329-39.
140. Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, Tanaka T, Smith CE, Lai C-Q, et al. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. Am J Hum Genet. 10 janv 2013;92(1):5-14.
141. Lanktree MB, Anand SS, Yusuf S, Hegele RA, SHARE Investigators. Replication of genetic associations with plasma lipoprotein traits in a multiethnic sample. J Lipid Res. juill 2009;50(7):1487-96.
142. Goodarzi MO, Wong H, Quiñones MJ, Taylor KD, Guo X, Castellani LW, et al. The 3' untranslated region of the lipoprotein lipase gene: haplotype structure and association with post-heparin plasma lipase activity. J Clin Endocrinol Metab. août 2005;90(8):4816-23.
143. Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Phillips CM, Ferguson JF, Gjelstad IMF, et al. Genetic variations at the lipoprotein lipase gene influence plasma lipid concentrations and interact with plasma n-6 polyunsaturated fatty acids to modulate lipid metabolism. Atherosclerosis. oct 2011;218(2):416-22.
144. Mo X, Liu X, Wang L, Li H, Lu X, Huang J, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphism rs1059611 functionally influences serum lipid concentrations. Atherosclerosis. août 2013;229(2):511-6.
145. Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL, Warnes GR, et al. Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. Nat Genet. févr 2008;40(2):149-51.
146. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nat Genet. févr 2008;40(2):161-9.
147. Mo X, Liu X, Wang L, Lu X, Chen S, Li H, et al. Association of lipoprotein lipase polymorphism rs2197089 with serum lipid concentrations and LPL gene expression. J Hum Genet. mars 2013;58(3):160-4.
148. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. Nat Genet. janv 2009;41(1):47-55.
149. Liu Y, Zhou D, Zhang Z, Song Y, Zhang D, Zhao T, et al. Effects of genetic variants on lipid parameters and dyslipidemia in a Chinese population. J Lipid Res. févr 2011;52(2):354-60.
150. Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S, et al. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2010;30(11):2264-76.
151. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2007;27(11):2450-5.
152. Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y, Saito Y, Yamada N, Oikawa S, et al. Polymorphisms in four genes related to triglyceride and HDL-cholesterol levels in the general Japanese population in 2000. J Atheroscler Thromb. 2005;12(5):240-50.
153. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. Nat Genet. janv 2009;41(1):56-65.

154. Angelakopoulou A, Shah T, Sofat R, Shah S, Berry DJ, Cooper J, et al. Comparative analysis of genome-wide association studies signals for lipids, diabetes, and coronary heart disease: Cardiovascular Biomarker Genetics Collaboration. Eur Heart J. févr 2012;33(3):393-407.
155. Paterniti JR, Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K. Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. Science. 8 juill 1983;221(4606):167-9.
156. Doolittle MH, Neher SB, Ben-Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM, Hosseini M, et al. Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 27 nov 2009;284(48):33623-33.
157. Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. Atherosclerosis. juill 2010;211(1):1-8.
158. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. J Clin Endocrinol Metab. nov 2009;94(11):4584-90.
159. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. Circ Cardiovasc Genet. 1 févr 2012;5(1):66-72.
160. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. J Intern Med. août 2012;272(2):185-96.
161. Lamiquiz-Moneo I, Bea AM, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L, Cenarro A, Pocoví M, et al. [Identification of variants in LMF1 gene associated with primary hypertriglyceridemia]. Clin E Investig En Arterioscler Publicacion Of Soc Espanola Arterioscler. 25 mars 2015;
162. Ioka RX, Kang M-J, Kamiyama S, Kim D-H, Magoori K, Kamataki A, et al. Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. J Biol Chem. 28 févr 2003;278(9):7344-9.
163. Beigneux AP, Davies BSJ, Tat S, Chen J, Gin P, Voss CV, et al. Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. J Biol Chem. 3 juin 2011;286(22):19735-43.
164. Davies BSJ, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. Cell Metab. 7 juill 2010;12(1):42-52.
165. Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. Cell Metab. avr 2007;5(4):279-91.
166. Gin P, Yin L, Davies BSJ, Weinstein MM, Ryan RO, Bensadoun A, et al. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. J Biol Chem. 24 oct 2008;283(43):29554-62.
167. Beigneux AP, Gin P, Davies BSJ, Weinstein MM, Bensadoun A, Ryan RO, et al. Glycosylation of Asn-76 in mouse GPIHBP1 is critical for its appearance on the cell surface and the binding of chylomicrons and lipoprotein lipase. J Lipid Res. juin 2008;49(6):1312-21.
168. Reimund M, Larsson M, Kovrov O, Kasvandik S, Olivecrona G, Lookene A. Evidence for Two Distinct Binding Sites for Lipoprotein Lipase on Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1). J Biol Chem. 29 mai 2015;290(22):13919-34.
169. Young SG, Davies BSJ, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. J Lipid Res. nov 2011;52(11):1869-84.
170. Adeyo O, Goulbourne CN, Bensadoun A, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 and the intravascular processing of triglyceride-rich lipoproteins. J Intern Med. déc 2012;272(6):528-40.
171. Weinstein MM, Yin L, Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Estrada K, et al. Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. J Biol Chem. 12 déc 2008;283(50):34511-8.
172. Weinstein MM, Goulbourne CN, Davies BSJ, Tu Y, Barnes RH, Watkins SM, et al. Reciprocal metabolic perturbations in the adipose tissue and liver of GPIHBP1-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2012;32(2):230-5.
173. Sonnenburg WK, Yu D, Lee E-C, Xiong W, Gololobov G, Key B, et al. GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. J Lipid Res. déc 2009;50(12):2421-9.
174. Beigneux AP, Fong LG, Bensadoun A, Davies BSJ, Oberer M, Gårdsvoll H, et al. GPIHBP1 missense mutations often cause multimerization of GPIHBP1 and thereby prevent lipoprotein lipase binding. Circ Res. 13 févr 2015;116(4):624-32.

175. Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, Makoveichuk E, Lindberg A, Hayden MR, et al. Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. J Lipid Res. juin 2010;51(6):1535-45.
176. Guay SP, Gaudet D, Brisson D. The g.-469G>A polymorphism in the GPIHBP1 gene promoter is associated with hypertriglyceridemia and has an additive effect on the risk conferred by LPL defective alleles. Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD. avr 2013;23(4):358-65.
177. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, et al. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. J Clin Endocrinol Metab. oct 2011;96(10):E1675-9.
178. Martín-Campos JM, Julve J, Roig R, Martínez S, Errico TL, Martínez-Couselo S, et al. Molecular analysis of chylomicronemia in a clinical laboratory setting: diagnosis of 13 cases of lipoprotein lipase deficiency. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 15 févr 2014;429:61-8.
179. Yamamoto H, Onishi M, Miyamoto N, Oki R, Ueda H, Ishigami M, et al. Novel combined GPIHBP1 mutations in a patient with hypertriglyceridemia associated with CAD. J Atheroscler Thromb. 2013;20(10):777-84.
180. Rios JJ, Shastry S, Jasso J, Hauser N, Garg A, Bensadoun A, et al. Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. J Inherit Metab Dis. mai 2012;35(3):531-40.
181. Berge KE, Retterstøl K, Romeo S, Pirazzi C, Leren TP. Type 1 hyperlipoproteinemia due to a novel deletion of exons 3 and 4 in the GPIHBP1 gene. Atherosclerosis. mai 2014;234(1):30-3.
182. Wang J, Hegele RA. Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPI-HBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650). Lipids Health Dis. 2007;6:23.
183. Franssen R, Young SG, Peelman F, Hertecant J, Sierts JA, Schimmel AWM, et al. Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIHBP1 defects. Circ Cardiovasc Genet. avr 2010;3(2):169-78.
184. Coca-Prieto I, Kroupa O, Gonzalez-Santos P, Magne J, Olivecrona G, Ehrenborg E, et al. Childhood-onset chylomicronaemia with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel GPIHBP1 mutation. J Intern Med. sept 2011;270(3):224-8.
185. Ahmad Z, Wilson DP. Familial chylomicronemia syndrome and response to medium-chain triglyceride therapy in an infant with novel mutations in GPIHBP1. J Clin Lipidol. déc 2014;8(6):635-9.
186. Buonuomo PS, Bartuli A, Rabacchi C, Bertolini S, Calandra S. A 3-day-old neonate with severe hypertriglyceridemia from novel mutations of the GPIHBP1 gene. J Clin Lipidol. avr 2015;9(2):265-70.
187. Plengpanich W, Young SG, Khovidhunkit W, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, et al. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. J Biol Chem. 11 juill 2014;289(28):19491-9.
188. Gonzaga-Jauregui C, Mir S, Penney S, Jhangiani S, Midgen C, Finegold M, et al. Whole-exome sequencing reveals GPIHBP1 mutations in infantile colitis with severe hypertriglyceridemia. J Pediatr Gastroenterol Nutr. juill 2014;59(1):17-21.
189. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, et al. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2009;29(6):956-62.
190. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science. 5 oct 2001;294(5540):169-73.
191. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. Clin Chem. févr 2005;51(2):351-9.
192. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JHM, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2 août 2002;295(5):1156-9.
193. Alborn WE, Johnson MG, Prince MJ, Konrad RJ. Definitive N-terminal protein sequence and further characterization of the novel apolipoprotein A5 in human serum. Clin Chem. mars 2006;52(3):514-7.
194. Talmud PJ, Cooper JA, Hattori H, Miller IP, Miller GJ, Humphries SE. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II. Diabetologia. oct 2006;49(10):2337-40.
195. Sun G, Bi N, Li G, Zhu X, Zeng W, Wu G, et al. Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. Chem Phys Lipids. sept 2006;143(1-2):22-8.

196. Gin P, Beigneux AP, Davies B, Young MF, Ryan RO, Bensadoun A, et al. Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. Biochim Biophys Acta. déc 2007;1771(12):1464-8.
197. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. Atherosclerosis. nov 2011;219(1):15-21.
198. Mendoza-Barberá E, Julve J, Nilsson SK, Lookene A, Martín-Campos JM, Roig R, et al. Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. J Lipid Res. mars 2013;54(3):649-61.
199. Helleboid-Chapman A, Nowak M, Helleboid S, Moitrot E, Rommens C, Dehondt H, et al. Apolipoprotein A-V modulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through its interaction with midkine. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2009;24(5-6):451-60.
200. Wang F, Kohan AB, Lo C-M, Liu M, Howles P, Tso P. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. J Lipid Res. août 2015;56(8):1403-18.
201. Grosskopf I, Baroukh N, Lee S-J, Kamari Y, Harats D, Rubin EM, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. Arterioscler Thromb Vasc Biol. déc 2005;25(12):2573-9.
202. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. J Biol Chem. 3 juin 2005;280(22):21553-60.
203. Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu L-S, Pham T, Thomas B, Rommens C, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. Biochem Biophys Res Commun. 25 juin 2004;319(2):397-404.
204. Lookene A, Beckstead JA, Nilsson S, Olivecrona G, Ryan RO. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. J Biol Chem. 8 juill 2005;280(27):25383-7.
205. Schaap FG, Rensen PCN, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RAFM, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. J Biol Chem. 2 juill 2004;279(27):27941-7.
206. Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, Burgess BL, Beckstead JA, Young SG, et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav-/- mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. déc 2010;30(12):2504-9.
207. Gonzales JC, Gordts PLSM, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. J Clin Invest. juin 2013;123(6):2742-51.
208. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DDO, Gallagher JW, Shelness GS, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. J Biol Chem. 5 sept 2003;278(36):34438-44.
209. Beckstead JA, Oda MN, Martin DDO, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. Biochemistry (Mosc). 12 août 2003;42(31):9416-23.
210. Gao X, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. Biochem Biophys Res Commun. 19 oct 2012;427(2):361-5.
211. Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. Curr Opin Lipidol. août 2011;22(4):247-53.
212. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. Hum Mol Genet. 15 nov 2002;11(24):3031-8.
213. Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. Hum Mol Genet. 15 nov 2002;11(24):3039-46.
214. Lai C-Q, Tai E-S, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu Y-P, et al. The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. J Lipid Res. déc 2003;44(12):2365-73.
215. Austin MA, Talmud PJ, Farin FM, Nickerson DA, Edwards KL, Leonetti D, et al. Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans. Biochim Biophys Acta. 20 janv 2004;1688(1):1-9.
216. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. J Biol Chem. 5 août 2005;280(31):28215-20.

217. Adams JN, Raffield LM, Freedman BI, Langefeld CD, Ng MCY, Carr JJ, et al. Analysis of common and coding variants with cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. Cardiovasc Diabetol. 2014;13:77.
218. Bhanushali AA, Das BR. Influence of genetic variants in the apolipoprotein A5 and C3 gene on lipids, lipoproteins, and its association with coronary artery disease in Indians. J Community Genet. sept 2010;1(3):139-48.
219. Ken-Dror G, Talmud PJ, Humphries SE, Drenos F. APOE/C1/C4/C2 gene cluster genotypes, haplotypes and lipid levels in prospective coronary heart disease risk among UK healthy men. Mol Med Camb Mass. oct 2010;16(9-10):389-99.
220. Liu Z-K, Hu M, Baum L, Thomas GN, Tomlinson B. Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese. Atherosclerosis. févr 2010;208(2):427-32.
221. Zhu W-F, Wang C-L, Liang L, Shen Z, Fu J-F, Liu P-N, et al. Triglyceride-raising APOA5 genetic variants are associated with obesity and non-HDL-C in Chinese children and adolescents. Lipids Health Dis. 2014;13:93.
222. Li S, Hu B, Wang Y, Wu D, Jin L, Wang X. Influences of APOA5 variants on plasma triglyceride levels in Uyghur population. PloS One. 2014;9(10):e110258.
223. Hubacek JA, Skodová Z, Adámková V, Lánská V, Poledne R. The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. Clin Genet. févr 2004;65(2):126-30.
224. Lai C-Q, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, et al. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. J Lipid Res. nov 2004;45(11):2096-105.
225. Klos KLE, Hamon S, Clark AG, Boerwinkle E, Liu K, Sing CF. APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA Study. J Lipid Res. mars 2005;46(3):564-71.
226. Elosua R, Ordovas JM, Cupples LA, Lai C-Q, Demissie S, Fox CS, et al. Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. J Lipid Res. mai 2006;47(5):990-6.
227. Grallert H, Sedlmeier E-M, Huth C, Kolz M, Heid IM, Meisinger C, et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. J Lipid Res. déc 2007;48(12):2614-21.
228. Lai C-Q, Arnett DK, Corella D, Straka RJ, Tsai MY, Peacock JM, et al. Fenofibrate effect on triglyceride and postprandial response of apolipoprotein A5 variants: the GOLDN study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2007;27(6):1417-25.
229. Dallongeville J, Cottel D, Wagner A, Ducimetière P, Ruidavets J-B, Arveiler D, et al. The APOA5 Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. BMC Med Genet. 2008;9:84.
230. De Castro-Orós I, Cenarro A, Tejedor MT, Baila-Rueda L, Mateo-Gallego R, Lamiquiz-Moneo I, et al. Common genetic variants contribute to primary hypertriglyceridemia without differences between familial combined hyperlipidemia and isolated hypertriglyceridemia. Circ Cardiovasc Genet. déc 2014;7(6):814-21.
231. Ko A, Cantor RM, Weissglas-Volkov D, Nikkola E, Reddy PMVL, Sinsheimer JS, et al. Amerindian-specific regions under positive selection harbour new lipid variants in Latinos. Nat Commun. 2014;5:3983.
232. Iqbal R, Jahan N, Sun Y, Xue H. Genetic association of lipid metabolism related SNPs with myocardial infarction in the Pakistani population. Mol Biol Rep. mars 2014;41(3):1545-52.
233. Ariza M-J, Sánchez-Chaparro M-A, Barón F-J, Hornos A-M, Calvo-Bonacho E, Rioja J, et al. Additive effects of LPL, APOA5 and APOE variant combinations on triglyceride levels and hypertriglyceridemia: results of the ICARIA genetic sub-study. BMC Med Genet. 2010;11:66.
234. Keebler ME, Sanders CL, Surti A, Guiducci C, Burtt NP, Kathiresan S. Association of blood lipids with common DNA sequence variants at 19 genetic loci in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey III. Circ Cardiovasc Genet. juin 2009;2(3):238-43.
235. Webster RJ, Warrington NM, Weedon MN, Hattersley AT, McCaskie PA, Beilby JP, et al. The association of common genetic variants in the APOA5, LPL and GCK genes with longitudinal changes in metabolic and cardiovascular traits. Diabetologia. janv 2009;52(1):106-14.
236. Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T, Kennedy BA, et al. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. Hum Mol Genet. 15 sept 2008;17(18):2894-9.
237. Yin R-X, Li Y-Y, Lai C-Q. Apolipoprotein A1/C3/A5 haplotypes and serum lipid levels. Lipids Health Dis. 2011;10:140.

238. Shou W, Wang Y, Xie F, Wang B, Yang L, Wu H, et al. A functional polymorphism affecting the APOA5 gene expression is causally associated with plasma triglyceride levels conferring coronary atherosclerosis risk in Han Chinese Population. Biochim Biophys Acta. nov 2014;1842(11):2147-54.
239. Cui G, Li Z, Li R, Huang J, Wang H, Zhang L, et al. A functional variant in APOA5/A4/C3/A1 gene cluster contributes to elevated triglycerides and severity of CAD by interfering with microRNA 3201 binding efficiency. J Am Coll Cardiol. 22 juill 2014;64(3):267-77.
240. Ahituv N, Akiyama J, Chapman-Helleboid A, Fruchart J, Pennacchio LA. In vivo characterization of human APOA5 haplotypes. Genomics. déc 2007;90(6):674-9.
241. Hahne P, Krempler F, Schaap FG, Soyal SM, Höffinger H, Miller K, et al. Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. J Intern Med. nov 2008;264(5):452-62.
242. Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. J Lipid Res. sept 2005;46(9):2015-22.
243. Dallinga-Thie GM, van Tol A, Hattori H, van Vark-van der Zee LC, Jansen H, Sijbrands EJG. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. Diabetologia. juill 2006;49(7):1505-11.
244. Vaessen SFC, Schaap FG, Kuivenhoven J-A, Groen AK, Hutten BA, Boekholdt SM, et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. J Lipid Res. sept 2006;47(9):2064-70.
245. Palmen J, Smith AJP, Dorfmeister B, Putt W, Humphries SE, Talmud PJ. The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels. Biochim Biophys Acta. août 2008;1782(7-8):447-52.
246. Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2005;25(2):411-7.
247. Talmud PJ. Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. Atherosclerosis. oct 2007;194(2):287-92.
248. Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 2008;28(10):1866-71.
249. Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, et al. Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. J Clin Invest. oct 2005;115(10):2862-9.
250. Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. J Intern Med. avr 2008;263(4):450-8.
251. Charrière S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, Charcosset M, et al. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. Atherosclerosis. nov 2009;207(1):150-6.
252. Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S, et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. Atherosclerosis. sept 2006;188(1):215-7.
253. Albers K, Schlein C, Wenner K, Lohse P, Bartelt A, Heeren J, et al. Homozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide results in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia in a breast-fed infant. Atherosclerosis. mars 2014;233(1):97-103.
254. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Guido V, Priore Oliva C, Calandra S, et al. Two novel rare variants of APOA5 gene found in subjects with severe hypertriglyceridemia. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 20 nov 2011;412(23-24):2194-8.
255. Kao J-T, Wen H-C, Chien K-L, Hsu H-C, Lin S-W. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. Hum Mol Genet. 1 oct 2003;12(19):2533-9.
256. Pullinger CR, Aouizerat BE, Movsesyan I, Durlach V, Sijbrands EJ, Nakajima K, et al. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients. J Lipid Res. août 2008;49(8):1846-54.
257. Sharma V, Witkowski A, Witkowska HE, Dykstra A, Simonsen JB, Nelbach L, et al. Aberrant hetero-disulfide bond formation by the hypertriglyceridemia-associated p.Gly185Cys APOA5 variant (rs2075291). Arterioscler Thromb Vasc Biol. oct 2014;34(10):2254-60.
258. Huang Y-J, Lin Y-L, Chiang C-I, Yen C-T, Lin S-W, Kao J-T. Functional importance of apolipoprotein A5 185G in the activation of lipoprotein lipase. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 18 janv 2012;413(1-2):246-50.

259. Henneman P, Schaap FG, Rensen PCN, van Dijk KW, Smelt AHM. Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. J Intern Med. janv 2008;263(1):107-8.
260. Okubo M, Ishihara M, Iwasaki T, Ebara T, Aoyama Y, Murase T, et al. A novel APOA5 splicing mutation IVS2+1g>a in a Japanese chylomicronemia patient. Atherosclerosis. nov 2009;207(1):24-5.
261. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mars 1999;19(3):472-84.
262. Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low density lipoproteins. Biochim Biophys Acta. 15 juin 1978;541(2):234-40.
263. Sacks FM, Zheng C, Cohn JS. Complexities of plasma apolipoprotein C-III metabolism. J Lipid Res. juin 2011;52(6):1067-70.
264. Holleboom AG, Karlsson H, Lin R-S, Beres TM, Sierts JA, Herman DS, et al. Heterozygosity for a loss-of-function mutation in GALNT2 improves plasma triglyceride clearance in man. Cell Metab. 7 déc 2011;14(6):811-8.
265. Carlson LA, Ballantyne D. Changing relative proportions of apolipoproteins CII and CIII of very low density lipoproteins in hypertriglyceridaemia. Atherosclerosis. juin 1976;23(3):563-8.
266. Schonfeld G, George PK, Miller J, Reilly P, Witztum J. Apolipoprotein C-II and C-III levels in hyperlipoproteinemia. Metabolism. oct 1979;28(10):1001-10.
267. Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. PPAR Res. 2008;2008:132960.
268. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, et al. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. J Biol Chem. 24 oct 1997;272(43):27307-12.
269. Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. J Biol Chem. 23 sept 1994;269(38):23610-6.
270. Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, van der Boom H, van Berkel TJ, Havekes LM. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. J Lipid Res. oct 2001;42(10):1578-85.
271. de Silva HV, Lauer SJ, Wang J, Simonet WS, Weisgraber KH, Mahley RW, et al. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. J Biol Chem. 21 janv 1994;269(3):2324-35.
272. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. Science. 17 août 1990;249(4970):790-3.
273. Reaven GM, Mondon CE, Chen YD, Breslow JL. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. J Lipid Res. mai 1994;35(5):820-4.
274. Wei J, Ouyang H, Wang Y, Pang D, Cong NX, Wang T, et al. Characterization of a hypertriglyceridemic transgenic miniature pig model expressing human apolipoprotein CIII. FEBS J. janv 2012;279(1):91-9.
275. Larsson M, Vorrsjö E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. J Biol Chem. 22 nov 2013;288(47):33997-4008.
276. Gangabadage CS, Zdunek J, Tessari M, Nilsson S, Olivecrona G, Wijmenga SS. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. J Biol Chem. 20 juin 2008;283(25):17416-27.
277. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juill 1995;15(7):963-71.
278. Qin W, Sundaram M, Wang Y, Zhou H, Zhong S, Chang C-C, et al. Missense mutation in APOC3 within the C-terminal lipid binding domain of human ApoC-III results in impaired assembly and secretion of triacylglycerol-rich very low density lipoproteins: evidence that ApoC-III plays a major role in the formation of lipid precursors within the microsomal lumen. J Biol Chem. 5 août 2011;286(31):27769-80.
279. Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Links PH, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. J Lipid Res. janv 2010;51(1):150-61.
280. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjærg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. N Engl J Med. 3 juill 2014;371(1):32-41.

281. TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitziel NO, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. N Engl J Med. 3 juill 2014;371(1):22-31.
282. Tachmazidou I, Dedoussis G, Southam L, Farmaki A-E, Ritchie GRS, Xifara DK, et al. A rare functional cardioprotective APOC3 variant has risen in frequency in distinct population isolates. Nat Commun. 2013;4:2872.
283. Crawford DC, Dumitrescu L, Goodloe R, Brown-Gentry K, Boston J, McClellan B, et al. Rare variant APOC3 R19X is associated with cardio-protective profiles in a diverse population-based survey as part of the Epidemiologic Architecture for Genes Linked to Environment Study. Circ Cardiovasc Genet. déc 2014;7(6):848-53.
284. Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. Science. 12 déc 2008;322(5908):1702-5.
285. Liu H, Labeur C, Xu CF, Ferrell R, Lins L, Brasseur R, et al. Characterization of the lipid-binding properties and lipoprotein lipase inhibition of a novel apolipoprotein C-III variant Ala23Thr. J Lipid Res. nov 2000;41(11):1760-71.
286. Bochem AE, van Capelleveen JC, Dallinga-Thie GM, Schimmel AWM, Motazacker MM, Tietjen I, et al. Two novel mutations in apolipoprotein C3 underlie atheroprotective lipid profiles in families. Clin Genet. mai 2014;85(5):433-40.
287. Timpson NJ, Walter K, Min JL, Tachmazidou I, Malerba G, Shin S-Y, et al. A rare variant in APOC3 is associated with plasma triglyceride and VLDL levels in Europeans. Nat Commun. 2014;5:4871.
288. Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T. Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. J Clin Invest. déc 1995;96(6):2601-5.
289. Dallongeville J, Meirhaeghe A, Cottel D, Fruchart JC, Amouyel P, Helbecque N. Polymorphisms in the insulin response element of APOC-III gene promoter influence the correlation between insulin and triglycerides or triglyceride-rich lipoproteins in humans. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. juill 2001;25(7):1012-7.
290. Tilly P, Sass C, Vincent-Viry M, Aguillon D, Siest G, Visvikis S. Biological and genetic determinants of serum apoC-III concentration: reference limits from the Stanislas Cohort. J Lipid Res. févr 2003;44(2):430-6.
291. Hoffer MJ, Sijbrands EJ, De Man FH, Havekes LM, Smelt AH, Frants RR. Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism. Eur J Clin Invest. oct 1998;28(10):807-12.
292. Ruiz-Narváez EA, Yang Y, Nakanishi Y, Kirchdorfer J, Campos H. APOC3/A5 haplotypes, lipid levels, and risk of myocardial infarction in the Central Valley of Costa Rica. J Lipid Res. déc 2005;46(12):2605-13.
293. Herron KL, Lofgren IE, Adiconis X, Ordovas JM, Fernandez ML. Associations between plasma lipid parameters and APOC3 and APOA4 genotypes in a healthy population are independent of dietary cholesterol intake. Atherosclerosis. janv 2006;184(1):113-20.
294. Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JD, Wilson PW, et al. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. Atherosclerosis. sept 2001;158(1):173-81.
295. Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusis AJ, de Bruin TW. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. J Lipid Res. janv 1996;37(1):136-47.
296. Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Cantor RM, Bu X, Lusis AJ, et al. Complex genetic contribution of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. J Clin Invest. 1 mars 1997;99(5):953-61.
297. Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, et al. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. Atherosclerosis. avr 1991;87(2-3):239-47.
298. Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. Atherosclerosis. juill 2001;157(1):1-11.
299. Ordovas JM, Civeira F, Genest J, Craig S, Robbins AH, Meade T, et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. Atherosclerosis. mars 1991;87(1):75-86.

300. Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Humphries S, Turner PR, Masana L. A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. J Lipid Res. juin 1997;38(6):1061-9.
301. Groenendijk M, Cantor RM, Blom NH, Rotter JI, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apoC-III promoter region in familial combined hyperlipidemia. J Lipid Res. juin 1999;40(6):1036-44.
302. Antonarakis SE, Oettgen P, Chakravarti A, Halloran SL, Hudson RR, Feisee L, et al. DNA polymorphism haplotypes of the human apolipoprotein APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster. Hum Genet. nov 1988;80(3):265-73.
303. Dammerman M, Sandkuijl LA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 mai 1993;90(10):4562-6.
304. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang X-M, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 25 mars 2010;362(12):1082-9.
305. Chhabra S, Narang R, Krishnan LR, Vasisht S, Agarwal DP, Srivastava LM, et al. Apolipoprotein C3 SstI polymorphism and triglyceride levels in Asian Indians. BMC Genet. 6 juin 2002;3:9.
306. Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G, et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. J Lipid Res. nov 2001;42(11):1879-90.
307. Waterworth DM, Talmud PJ, Humphries SE, Wicks PD, Sagnella GA, Strazzullo P, et al. Variable effects of the APOC3-482C > T variant on insulin, glucose and triglyceride concentrations in different ethnic groups. Diabetologia. févr 2001;44(2):245-8.
308. Hubacek JA, Waterworth DM, Poledne R, Pitha J, Skodová Z, Humphries SE, et al. Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech population. Clin Biochem. mars 2001;34(2):113-8.
309. Shoulders CC, Grantham TT, North JD, Gaspardone A, Tomai F, de Fazio A, et al. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. Hum Genet. nov 1996;98(5):557-66.
310. Li G-P, Wang J-Y, Yan S-K, Chen B-S, Xue H, Wu G. Genetic effect of two polymorphisms in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. Clin Genet. juin 2004;65(6):470-6.
311. Pollex RL, Ban MR, Young TK, Bjerregaard P, Anand SS, Yusuf S, et al. Association between the -455T>C promoter polymorphism of the APOC3 gene and the metabolic syndrome in a multi-ethnic sample. BMC Med Genet. 2007;8:80.
312. Miller M, Rhyne J, Chen H, Beach V, Ericson R, Luthra K, et al. APOC3 promoter polymorphisms C-482T and T-455C are associated with the metabolic syndrome. Arch Med Res. mai 2007;38(4):444-51.
313. Qi L, Liu S, Rifai N, Hunter D, Hu FB. Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. Atherosclerosis. mai 2007;192(1):204-10.
314. Paul-Hayase H, Rosseneu M, Robinson D, Van Bervliet JP, Deslypere JP, Humphries SE. Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. Hum Genet. févr 1992;88(4):439-46.
315. Peacock RE, Hamsten A, Johansson J, Nilsson-Ehle P, Humphries SE. Associations of genotypes at the apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B and lipoprotein lipase gene loci with coronary atherosclerosis and high density lipoprotein subclasses. Clin Genet. oct 1994;46(4):273-82.
316. Peacock RE, Temple A, Gudnason V, Rosseneu M, Humphries SE. Variation at the lipoprotein lipase and apolipoprotein AI-CIII gene loci are associated with fasting lipid and lipoprotein traits in a population sample from Iceland: interaction between genotype, gender, and smoking status. Genet Epidemiol. 1997;14(3):265-82.
317. Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S. Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. Clin Genet. déc 1994;46(6):385-97.
318. Aalto-Setälä K, Kontula K, Sane T, Nieminen M, Nikkilä E. DNA polymorphisms of apolipoprotein A-I/C-III and insulin genes in familial hypertriglyceridemia and coronary heart disease. Atherosclerosis. juill 1987;66(1-2):145-52.
319. Song J, Park JW, Park H, Kim JQ. Linkage disequilibrium of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster and their relationship to plasma triglyceride, apolipoprotein AI and CIII levels in Koreans. Mol Cells. 28 févr 1998;8(1):12-8.

320. Surguchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. août 1996;16(8):941-7.
321. Waterworth DM, Talmud PJ, Bujac SR, Fisher RM, Miller GJ, Humphries SE. Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. déc 2000;20(12):2663-9.
322. Marçais C, Bernard S, Merlin M, Ulhmann M, Mestre B, Rochet-Mingret L, et al. Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apoC-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. Diabetologia. nov 2000;43(11):1346-52.
323. Jiang Y, Ma J, Li H, Liu Y, You C. Effect of apolipoprotein C3 genetic polymorphisms on serum lipid levels and the risk of intracerebral hemorrhage. Lipids Health Dis. 2015;14:48.
324. Huang M-C, Wang T-N, Liu Y-L, Pa T-H, Tu H-P, Huang Y-C, et al. Effect of SstI polymorphism of the apolipoprotein CIII gene and environmental factors on risks of hypertriglyceridemia in Taiwan aborigines. Circ J Off J Jpn Circ Soc. août 2006;70(8):1030-6.
325. Ko YL, Ko YS, Wu SM, Teng MS, Chen FR, Hsu TS, et al. Interaction between obesity and genetic polymorphisms in the apolipoprotein CIII gene and lipoprotein lipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in Chinese. Hum Genet. sept 1997;100(3-4):327-33.
326. Zeng Q, Dammerman M, Takada Y, Matsunaga A, Breslow JL, Sasaki J. An apolipoprotein CIII marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasians also confers increased risk in a west Japanese population. Hum Genet. avr 1995;95(4):371-5.
327. Wick U, Witt E, Engel W. Restriction fragment length polymorphisms at the apoprotein genes AI, CIII and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as possible markers of coronary heart disease. Clin Genet. avr 1995;47(4):184-90.
328. Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Gerdes LU, Faergeman O, Humphries SE. Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis. Atherosclerosis. mai 1993;100(2):157-69.
329. Ahn YI, Valdez R, Reddy AP, Cole SA, Weiss KM, Ferrell RE. DNA polymorphisms of the apolipoprotein AI/CIII/AIV gene cluster influence plasma cholesterol and triglyceride levels in the Mayans of the Yucatán Peninsula, Mexico. Hum Hered. 1991;41(5):281-9.
330. Stocks J, Paul H, Galton D. Haplotypes identified by DNA restriction-fragment-length polymorphisms in the A-1 C-III A-IV gene region and hypertriglyceridemia. Am J Hum Genet. août 1987;41(2):106-18.
331. Hayden MR, Kirk H, Clark C, Frohlich J, Rabkin S, McLeod R, et al. DNA polymorphisms in and around the Apo-A1-CIII genes and genetic hyperlipidemias. Am J Hum Genet. mai 1987;40(5):421-30.
332. Rees A, Stocks J, Sharpe CR, Vella MA, Shoulders CC, Katz J, et al. Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein A-1-C-III gene cluster. Association with hypertriglyceridemia. J Clin Invest. sept 1985;76(3):1090-5.
333. Tsai MY, Hanson NQ, Copeland KR, Beheshti I, Garg U. Determination of a T/G polymorphism at nucleotide 3206 of the apolipoprotein C III gene by amplification refractory mutation system. Clin Chem. déc 1994;40(12):2235-9.
334. Karathanasis SK, Zannis VI, Breslow JL. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apoC-III alleles. J Lipid Res. avr 1985;26(4):451-6.
335. Wang CS. Structure and functional properties of apolipoprotein C-II. Prog Lipid Res. 1991;30(2-3):253-8.
336. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. Metabolism. juill 2012;61(7):906-21.
337. Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. J Biol Chem. 8 févr 2002;277(6):4334-42.
338. Shachter NS, Hayek T, Leff T, Smith JD, Rosenberg DW, Walsh A, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. J Clin Invest. avr 1994;93(4):1683-90.
339. Pullinger CR, Zysow BR, Hennessy LK, Frost PH, Malloy MJ, Kane JP. Molecular cloning and characteristics of a new apolipoprotein C-II mutant identified in three unrelated individuals with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Hum Mol Genet. janv 1993;2(1):69-74.
340. Zysow BR, Pullinger CR, Hennessy LK, Farese RV, Ghassemzadeh M, Kane JP. The apolipoprotein C-II variant apoC-IILys19-->Thr is not associated with dyslipidemia in an affected kindred. Clin Genet. juin 1994;45(6):292-7.
341. Hegele RA, Connelly PW, Maguire GF, Huff MW, Leiter L, Wolfe BM, et al. An apolipoprotein CII mutation, CIILys19----Thr' identified in patients with hyperlipidemia. Dis Markers. avr 1991;9(2):73-80.

342. Wiebusch H, Nofer JR, von Eckardstein A, Funke H, Wahrburg U, Martin H, et al. Electrophoretic screening for human apolipoprotein C-II variants: repeated identification of apolipoprotein C-II(K19T). J Mol Med Berl Ger. juill 1995;73(7):373-8.
343. Streicher R, Geisel J, Weisshaar C, Avci H, Oette K, Müller-Wieland D, et al. A single nucleotide substitution in the promoter region of the apolipoprotein C-II gene identified in individuals with chylomicronemia. J Lipid Res. déc 1996;37(12):2599-607.
344. de Graaf J, Hoffer MJ, Stuyt PM, Frants RR, Stalenhoef AF. Familial chylomicronemia caused by a novel type of mutation in the APOE-CI-CIV-CII gene cluster encompassing both the APOCII gene and the first APOCIV gene mutation: APOCII-CIV(Nijmegen). Biochem Biophys Res Commun. 14 juill 2000;273(3):1084-7.
345. Fojo SS, de Gennes JL, Chapman J, Parrott C, Lohse P, Kwan SS, et al. An initiation codon mutation in the apoC-II gene (apoC-II Paris) of a patient with a deficiency of apolipoprotein C-II. J Biol Chem. 15 déc 1989;264(35):20839-42.
346. Parrott CL, Alsayed N, Rebourcet R, Santamarina-Fojo S. ApoC-IIParis2: a premature termination mutation in the signal peptide of apoC-II resulting in the familial chylomicronemia syndrome. J Lipid Res. mars 1992;33(3):361-7.
347. Reina M, Brunzell JD, Deeb SS. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. J Lipid Res. déc 1992;33(12):1823-32.
348. Fojo SS, Stalenhoef AF, Marr K, Gregg RE, Ross RS, Brewer HB. A deletion mutation in the ApoC-II gene (ApoC-II Nijmegen) of a patient with a deficiency of apolipoprotein C-II. J Biol Chem. 5 déc 1988;263(34):17913-6.
349. Beil FU, Fojo SS, Brewer HB, Greten H, Beisiegel U. Apolipoprotein C-II deficiency syndrome due to apo C-IIHamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism. Eur J Clin Invest. févr 1992;22(2):88-95.
350. Okubo M, Hasegawa Y, Aoyama Y, Murase T. A G+1 to C mutation in a donor splice site of intron 2 in the apolipoprotein (apo) C-II gene in a patient with apo C-II deficiency. A possible interaction between apo C-II deficiency and apo E4 in a severely hypertriglyceridemic patient. Atherosclerosis. avr 1997;130(1-2):153-60.
351. Xiong WJ, Li WH, Posner I, Yamamura T, Yamamoto A, Gotto AM, et al. No severe bottleneck during human evolution: evidence from two apolipoprotein C-II deficiency alleles. Am J Hum Genet. févr 1991;48(2):383-9.
352. Huff MW, Evans AJ, Wolfe BM, Connelly PW, Maguire GF, Strong WL. Identification and metabolic characteristics of an apolipoprotein C-II variant isolated from a hypertriglyceridemic subject. J Lipid Res. mars 1990;31(3):385-96.
353. Inadera H, Hibino A, Kobayashi J, Kanzaki T, Shirai K, Yukawa S, et al. A missense mutation (Trp 26-->Arg) in exon 3 of the apolipoprotein CII gene in a patient with apolipoprotein CII deficiency (apo CII-Wakayama). Biochem Biophys Res Commun. 30 juin 1993;193(3):1174-83.
354. Tuzgöl S, Bijvoet SM, Bruin T, Kastelein JJ, Hayden MR. Apolipoprotein CII-Padova (Tyr37-->stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. J Med Genet. août 1994;31(8):622-6.
355. Crecchio C, Capurso A, Pepe G. Identification of the mutation responsible for a case of plasmatic apolipoprotein CII deficiency (Apo CII-Bari). Biochem Biophys Res Commun. 16 mai 1990;168(3):1118-27.
356. Wilson CJ, Priore Oliva C, Maggi F, Catapano AL, Calandra S. Apolipoprotein C-II deficiency presenting as a lipid encephalopathy in infancy. Ann Neurol. juin 2003;53(6):807-10.
357. Cox DW, Breckenridge WC, Little JA. Inheritance of apolipoprotein C-II deficiency with hypertriglyceridemia and pancreatitis. N Engl J Med. 28 déc 1978;299(26):1421-4.
358. Cox DW, Wills DE, Quan F, Ray PN. A deletion of one nucleotide results in functional deficiency of apolipoprotein CII (apo CII Toronto). J Med Genet. oct 1988;25(10):649-52.
359. Connelly PW, Maguire GF, Hofmann T, Little JA. Structure of apolipoprotein C-IIToronto, a nonfunctional human apolipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. janv 1987;84(1):270-3.
360. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. Apolipoprotein CIISt. Michael. Familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. J Clin Invest. déc 1987;80(6):1597-606.
361. Lam C-W, Yuen Y-P, Cheng W-F, Chan Y-W, Tong S-F. Missense mutation Leu72Pro located on the carboxyl terminal amphipathic helix of apolipoprotein C-II causes familial chylomicronemia syndrome. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. févr 2006;364(1-2):256-9.
362. Rozek A, Buchko GW, Cushley RJ. Conformation of two peptides corresponding to human apolipoprotein C-I residues 7-24 and 35-53 in the presence of sodium dodecyl sulfate by CD and NMR spectroscopy. Biochemistry (Mosc). 6 juin 1995;34(22):7401-8.

363. Lauer SJ, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. J Biol Chem. 25 mai 1988;263(15):7277-86.
364. Curry MD, McConathy WJ, Fesmire JD, Alaupovic P. Quantitative determination of apolipoproteins C-I and C-II in human plasma by separate electroimmunoassays. Clin Chem. avr 1981;27(4):543-8.
365. Cohn JS, Tremblay M, Boulet L, Jacques H, Davignon J, Roy M, et al. Plasma concentration and lipoprotein distribution of ApoC-I is dependent on ApoE genotype rather than the Hpa I ApoC-I promoter polymorphism. Atherosclerosis. juill 2003;169(1):63-70.
366. Shulman RS, Herbert PN, Wehrly K, Fredrickson DS. Thf complete amino acid sequence of C-I (apoLp-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. J Biol Chem. 10 janv 1975;250(1):182-90.
367. Ekman R, Nilsson-Ehle P. Effects of apolipoproteins on lipoprotein lipase activity of human adipose tissue. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 18 août 1975;63(1):29-35.
368. Berbée JFP, van der Hoogt CC, Sundararaman D, Havekes LM, Rensen PCN. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. J Lipid Res. févr 2005;46(2):297-306.
369. Westerterp M, de Haan W, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. J Lipid Res. juin 2006;47(6):1203-11.
370. Smit M, van der Kooij-Meijs E, Woudt LP, Havekes LM, Frants RR. Exact localization of the familial dysbetalipoproteinemia associated HpaI restriction site in the promoter region of the APOC1 gene. Biochem Biophys Res Commun. 16 mai 1988;152(3):1282-8.
371. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, et al. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. J Lipid Res. janv 1999;40(1):50-8.
372. Hubácek JA, Pitha J, Adámková V, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms. Physiol Res Acad Sci Bohemoslov. 2003;52(2):195-200.
373. Waterworth DM, Hubacek JA, Pitha J, Kovar J, Poledne R, Humphries SE, et al. Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOCI-APOE cluster. J Lipid Res. juill 2000;41(7):1103-9.
374. Lichtenstein L, Kersten S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. Biochim Biophys Acta. avr 2010;1801(4):415-20.
375. Cazes A, Galaup A, Chomel C, Bignon M, Bréchot N, Le Jan S, et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. Circ Res. 24 nov 2006;99(11):1207-15.
376. Köster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. Endocrinology. nov 2005;146(11):4943-50.
377. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. J Biol Chem. 15 sept 2000;275(37):28488-93.
378. Mattijssen F, Alex S, Swarts HJ, Groen AK, van Schothorst EM, Kersten S. Angptl4 serves as an endogenous inhibitor of intestinal lipid digestion. Mol Metab. avr 2014;3(2):135-44.
379. Lafferty MJ, Bradford KC, Erie DA, Neher SB. Angiopoietin-like protein 4 inhibition of lipoprotein lipase: evidence for reversible complex formation. J Biol Chem. 4 oct 2013;288(40):28524-34.
380. Nilsson SK, Anderson F, Ericsson M, Larsson M, Makoveichuk E, Lookene A, et al. Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4. Biochim Biophys Acta. oct 2012;1821(10):1370-8.
381. Chi X, Shetty SK, Shows HW, Hjelmaas AJ, Malcolm EK, Davies BSJ. Angiopoietin-like 4 Modifies the Interactions between Lipoprotein Lipase and Its Endothelial Cell Transporter GPIHBP1. J Biol Chem. 8 mai 2015;290(19):11865-77.
382. Kroupa O, Vorrsjö E, Stienstra R, Mattijssen F, Nilsson SK, Sukonina V, et al. Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue. BMC Physiol. 2012;12:13.
383. Catoire M, Alex S, Paraskevopulos N, Mattijssen F, Evers-van Gogh I, Schaart G, et al. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. Proc Natl Acad Sci U S A. 18 mars 2014;111(11):E1043-52.

384. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. Nat Genet. avr 2007;39(4):513-6.
385. Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V, Drenos F, et al. ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. déc 2008;28(12):2319-25.
386. Holmen OL, Zhang H, Fan Y, Hovelson DH, Schmidt EM, Zhou W, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. Nat Genet. avr 2014;46(4):345-51.
387. Yin W, Romeo S, Chang S, Grishin NV, Hobbs HH, Cohen JC. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. J Biol Chem. 8 mai 2009;284(19):13213-22.
388. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. J Clin Invest. janv 2009;119(1):70-9.
389. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 5 août 2010;466(7307):707-13.
390. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. Proc Natl Acad Sci U S A. 27 nov 2012;109(48):19751-6.
391. Arca M, Minicocci I, Maranghi M. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism. Curr Opin Lipidol. août 2013;24(4):313-20.
392. Shan L, Yu X-C, Liu Z, Hu Y, Sturgis LT, Miranda ML, et al. The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. J Biol Chem. 16 janv 2009;284(3):1419-24.
393. Liu J, Afroza H, Rader DJ, Jin W. Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. J Biol Chem. 3 sept 2010;285(36):27561-70.
394. Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, Quagliarini F, Censi V, Labbadia G, et al. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. J Clin Endocrinol Metab. juill 2012;97(7):E1266-75.
395. Robciuc MR, Maranghi M, Lahikainen A, Rader D, Bensadoun A, Öörni K, et al. Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juill 2013;33(7):1706-13.
396. Noto D, Cefalù AB, Valenti V, Fayer F, Pinotti E, Ditta M, et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB gene mutations in subjects with combined hypolipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mars 2012;32(3):805-9.
397. Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, Simonelli S, Adorni MP, Sallo R, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. Circ Cardiovasc Genet. 1 févr 2012;5(1):42-50.
398. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. N Engl J Med. 2 déc 2010;363(23):2220-7.
399. Martín-Campos JM, Roig R, Mayoral C, Martinez S, Martí G, Arroyo JA, et al. Identification of a novel mutation in the ANGPTL3 gene in two families diagnosed of familial hypobetalipoproteinemia without APOB mutation. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 22 mars 2012;413(5-6):552-5.
400. Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, et al. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. Nat Genet. mars 2010;42(3):210-5.
401. Nakayama K, Bayasgalan T, Yamanaka K, Kumada M, Gotoh T, Utsumi N, et al. Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population. J Med Genet. juin 2009;46(6):370-4.
402. Wu Y, Marvelle AF, Li J, Croteau-Chonka DC, Feranil AB, Kuzawa CW, et al. Genetic association with lipids in Filipinos: waist circumference modifies an APOA5 effect on triglyceride levels. J Lipid Res. nov 2013;54(11):3198-205.
403. Kettunen J, Tukiainen T, Sarin A-P, Ortega-Alonso A, Tikkanen E, Lyytikäinen L-P, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. Nat Genet. mars 2012;44(3):269-76.
404. Hegele RA, Ban MR, Hsueh N, Kennedy BA, Cao H, Zou GY, et al. A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. Hum Mol Genet. 1 nov 2009;18(21):4189-94.
405. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. Biochem Biophys Res Commun. 10 août 2012;424(4):786-92.

406. Ren G, Kim JY, Smas CM. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1 août 2012;303(3):E334-51.
407. Yi P, Park J-S, Melton DA. Perspectives on the activities of ANGPTL8/betatrophin. Cell. 23 oct 2014;159(3):467-8.
408. Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, et al. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 oct 2013;110(40):16109-14.
409. Gusarova V, Alexa CA, Na E, Stevis PE, Xin Y, Bonner-Weir S, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. Cell. 23 oct 2014;159(3):691-6.
410. Davies BSJ, Goulbourne CN, Barnes RH, Turlo KA, Gin P, Vaughan S, et al. Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. J Lipid Res. déc 2012;53(12):2690-7.
411. Cupp M, Bensadoun A, Melford K. Heparin decreases the degradation rate of lipoprotein lipase in adipocytes. J Biol Chem. 5 mai 1987;262(13):6383-8.
412. Cisar LA, Hoogewerf AJ, Cupp M, Rapport CA, Bensadoun A. Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. J Biol Chem. 25 janv 1989;264(3):1767-74.
413. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res. avr 1996;37(4):693-707.
414. Parthasarathy N, Goldberg IJ, Sivaram P, Mulloy B, Flory DM, Wagner WD. Oligosaccharide sequences of endothelial cell surface heparan sulfate proteoglycan with affinity for lipoprotein lipase. J Biol Chem. 2 sept 1994;269(35):22391-6.
415. Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. J Clin Invest. oct 2008;118(10):3247-59.
416. Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. J Clin Invest. mars 1993;91(3):748-58.
417. Brunzell JD, Hazzard WR, Porte D, Bierman EL. Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man. J Clin Invest. juill 1973;52(7):1578-85.
418. Xiang SQ, Cianflone K, Kalant D, Sniderman AD. Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. J Lipid Res. sept 1999;40(9):1655-63.
419. Tetali SD, Budamagunta MS, Simion C, den Hartigh LJ, Kálai T, Hideg K, et al. VLDL lipolysis products increase VLDL fluidity and convert apolipoprotein E4 into a more expanded conformation. J Lipid Res. juin 2010;51(6):1273-83.
420. 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. 19 sept 1996;335(12):848-54.
421. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. J Atheroscler Thromb. 2012;19(1):1-12.
422. Waddington C. L'épigénotype. In: Endeavour. 1942. p. 18-20.
423. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 1 avr 2009;23(7):781-3.
424. Deans C, Maggert KA. What do you mean, « epigenetic »? Genetics. avr 2015;199(4):887-96.
425. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. Mutat Res. août 2008;659(1-2):40-8.
426. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet. mars 2013;14(3):204-20.
427. Baubec T, Schübeler D. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. Curr Opin Genet Dev. avr 2014;25:85-92.
428. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci. févr 2006;31(2):89-97.
429. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 1 janv 2002;16(1):6-21.
430. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. juin 2002;3(6):415-28.
431. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. Cell. 16 nov 2007;131(4):822.
432. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. Cell. 22 févr 2002;108(4):489-500.
433. Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic « language » of covalent histone modifications to cancer. Br J Cancer. 23 févr 2004;90(4):761-9.

434. Picascia A, Grimaldi V, Pignalosa O, De Pascale MR, Schiano C, Napoli C. Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. Clin Immunol Orlando Fla. mars 2015;157(1):1-15.
435. Feng Y, Jankovic J, Wu Y-C. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. J Neurol Sci. 15 févr 2015;349(1-2):3-9.
436. Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. Nat Rev Genet. févr 2015;16(2):71-84.
437. Geisler S, Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. Nat Rev Mol Cell Biol. nov 2013;14(11):699-712.
438. Spitale RC, Tsai M-C, Chang HY. RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. Epigenetics. mai 2011;6(5):539-43.
439. Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature. 22 janv 2009;457(7228):413-20.
440. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. Cell. 27 mars 2014;157(1):77-94.
441. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 3 déc 1993;75(5):843-54.
442. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. janv 2008;36(Database issue):D154-8.
443. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. Genes Dev. 15 mai 2010;24(10):992-1009.
444. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. janv 2014;42(Database issue):D68-73.
445. Wheeler BM, Heimberg AM, Moy VN, Sperling EA, Holstein TW, Heber S, et al. The deep evolution of metazoan microRNAs. Evol Dev. févr 2009;11(1):50-68.
446. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. RNA N Y N. mars 2003;9(3):277-9.
447. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. oct 2004;14(10A):1902-10.
448. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA N Y N. déc 2004;10(12):1957-66.
449. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. 13 oct 2004;23(20):4051-60.
450. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. Nat Methods. avr 2005;2(4):269-76.
451. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol. déc 2006;13(12):1097-101.
452. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature. 11 nov 2004;432(7014):231-5.
453. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature. 11 nov 2004;432(7014):235-40.
454. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature. 25 sept 2003;425(6956):415-9.
455. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 15 déc 2004;18(24):3016-27.
456. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell. 2 juin 2006;125(5):887-901.
457. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. EMBO J. 12 janv 2005;24(1):138-48.
458. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA N Y N. févr 2004;10(2):185-91.
459. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science. 2 janv 2004;303(5654):95-8.
460. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. Cell. 9 juill 2004;118(1):57-68.
461. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. août 2014;15(8):509-24.
462. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science. 13 janv 2006;311(5758):195-8.

463. Park J-E, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. Nature. 14 juill 2011;475(7355):201-5.
464. Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol. juill 2005;3(7):e236.
465. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. EMBO J. 8 févr 2006;25(3):522-32.
466. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature. 4 août 2005;436(7051):740-4.
467. Okamura K, Liu N, Lai EC. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by Drosophila Argonautes. Mol Cell. 13 nov 2009;36(3):431-44.
468. Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab TEM. nov 2009;20(9):452-9.
469. Obernosterer G, Leuschner PJF, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. RNA N Y N. juill 2006;12(7):1161-7.
470. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell. 16 juin 2006;125(6):1111-24.
471. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. Genes Dev. 15 nov 2008;22(22):3172-83.
472. Houbaviy HB, Dennis L, Jaenisch R, Sharp PA. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. RNA N Y N. août 2005;11(8):1245-57.
473. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 août 2006;103(33):12481-6.
474. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 9 juin 2005;435(7043):839-43.
475. Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 nov 2005;102(45):16426-31.
476. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 juin 2006;103(23):8721-6.
477. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature. 14 juill 2005;436(7048):214-20.
478. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. févr 2009;10(2):126-39.
479. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. sept 2010;11(9):597-610.
480. Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. J Biochem (Tokyo). oct 2010;148(4):381-92.
481. Fukunaga R, Han BW, Hung J-H, Xu J, Weng Z, Zamore PD. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. Cell. 26 oct 2012;151(3):533-46.
482. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. Nat Rev Mol Cell Biol. août 2013;14(8):475-88.
483. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S-I, Baba T, et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. Genes Dev. 15 févr 2009;23(4):433-8.
484. Backes S, Shapiro JS, Sabin LR, Pham AM, Reyes I, Moss B, et al. Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. Cell Host Microbe. 16 août 2012;12(2):200-10.
485. Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell. 28 avr 2000;101(3):235-8.
486. Kawahara Y, Megraw M, Kreider E, Iizasa H, Valente L, Hatzigeorgiou AG, et al. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. Nucleic Acids Res. sept 2008;36(16):5270-80.
487. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. Nat Struct Mol Biol. janv 2006;13(1):13-21.
488. Desterro JMP, Keegan LP, Lafarga M, Berciano MT, O'Connell M, Carmo-Fonseca M. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. J Cell Sci. 1 mai 2003;116(Pt 9):1805-18.

489. Ohman M. A-to-I editing challenger or ally to the microRNA process. Biochimie. oct 2007;89(10):1171-6.
490. Xhemalce B, Robson SC, Kouzarides T. Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. Cell. 12 oct 2012;151(2):278-88.
491. Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 févr 2008;105(5):1608-13.
492. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. EMBO J. 17 déc 2008;27(24):3300-10.
493. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell. 23 mai 2008;30(4):460-71.
494. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. Cell. 23 août 2002;110(4):513-20.
495. Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural basis for microRNA targeting. Science. 31 oct 2014;346(6209):608-13.
496. Stefani G, Slack FJ. A « pivotal » new rule for microRNA-mRNA interactions. Nat Struct Mol Biol. mars 2012;19(3):265-6.
497. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. RNA N Y N. nov 2007;13(11):1894-910.
498. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell. 6 juill 2007;27(1):91-105.
499. Lewis BP, Shih I -hun., Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell. 26 déc 2003;115(7):787-98.
500. Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. Nat Struct Mol Biol. févr 2009;16(2):144-50.
501. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science. 23 avr 2004;304(5670):594-6.
502. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 nov 2005;102(47):16961-6.
503. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell. 15 juin 2007;129(6):1141-51.
504. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science. 21 sept 2007;317(5845):1764-7.
505. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. Science. 2 sept 2005;309(5740):1573-6.
506. Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 avr 2008;105(14):5343-8.
507. Beilharz TH, Humphreys DT, Preiss T. miRNA Effects on mRNA closed-loop formation during translation initiation. Prog Mol Subcell Biol. 2010;50:99-112.
508. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. Genes Dev. 1 août 2007;21(15):1857-62.
509. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 janv 2004;101(1):360-5.
510. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. Nat Struct Mol Biol. déc 2006;13(12):1102-7.
511. Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. RNA N Y N. mars 2004;10(3):387-94.
512. Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. Mol Cell. 17 févr 2006;21(4):533-42.
513. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science. 21 déc 2007;318(5858):1931-4.
514. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem. 2010;79:351-79.
515. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat Cell Biol. juill 2005;7(7):719-23.
516. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. Nat Struct Mol Biol. avr 2008;15(4):346-53.

517. Eulalio A, Helms S, Fritzsch C, Fauser M, Izaurralde E. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. RNA N Y N. juin 2009;15(6):1067-77.
518. Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang S-F, Doerks T, et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. Genes Dev. 15 oct 2007;21(20):2558-70.
519. Leung AKL, Calabrese JM, Sharp PA. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 nov 2006;103(48):18125-30.
520. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. juin 2007;9(6):654-9.
521. Feinbaum R, Ambros V. The timing of lin-4 RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in Caenorhabditis elegans. Dev Biol. 1 juin 1999;210(1):87-95.
522. Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. Science. 18 juill 2003;301(5631):336-8.
523. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. Oncotarget. 20 avr 2015;6(11):8474-90.
524. Vecchione A, Croce CM. Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. Endocr Relat Cancer. mars 2010;17(1):F37-50.
525. Mallanna SK, Rizzino A. Systems biology provides new insights into the molecular mechanisms that control the fate of embryonic stem cells. J Cell Physiol. janv 2012;227(1):27-34.
526. Ong S-G, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. Adv Drug Deliv Rev. 1 juill 2015;88:3-15.
527. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 juill 2010;107(27):12228-32.
528. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. Science. 18 juin 2010;328(5985):1570-3.
529. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. Science. 18 juin 2010;328(5985):1566-9.
530. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 5 oct 2010;107(40):17321-6.
531. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. avr 2011;22(2):86-92.
532. Mok Y-J, Park SG, Choi SS. Comparative analysis of the structural and expressional parameters of microRNA target genes. Gene. 10 avr 2012;497(1):103-9.
533. Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function. Circ Res. 3 janv 2014;114(1):183-92.
534. Zhang M, Wu J-F, Chen W-J, Tang S-L, Mo Z-C, Tang Y-Y, et al. MicroRNA-27a/b regulates cellular cholesterol efflux, influx and esterification/hydrolysis in THP-1 macrophages. Atherosclerosis. mai 2014;234(1):54-64.
535. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. févr 2006;3(2):87-98.
536. Ramírez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Dávalos A, Li M, Goedeke L, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. Circ Res. 7 juin 2013;112(12):1592-601.
537. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. Int J Mol Med. mars 2015;35(3):847-53.
538. Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. Hepatol Baltim Md. août 2014;60(2):554-64.
539. Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X. MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. FEBS Lett. 21 mai 2012;586(10):1472-9.
540. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. Nature. 20 oct 2011;478(7369):404-7.

541. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. J Clin Invest. juill 2011;121(7):2921-31.
542. Gerin I, Clerbaux L-A, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. J Biol Chem. 29 oct 2010;285(44):33652-61.
543. Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, Suchy FJ, Wang DQ-H, Ananthanarayanan M, et al. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. EMBO Mol Med. sept 2012;4(9):882-95.
544. Wang L, Jia X-J, Jiang H-J, Du Y, Yang F, Si S-Y, et al. MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. Mol Cell Biol. mai 2013;33(10):1956-64.
545. Kim J, Yoon H, Ramírez CM, Lee S-M, Hoe H-S, Fernández-Hernando C, et al. MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases Aβ levels by repressing ABCA1 expression. Exp Neurol. juin 2012;235(2):476-83.
546. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldán Á, Esau C, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. Circ Res. 7 juin 2013;112(12):1602-12.
547. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 oct 2014;111(40):14518-23.
548. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nat Cell Biol. avr 2011;13(4):423-33.
549. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Röxe T, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2013;33(6):1392-400.
550. Meiler S, Baumer Y, Toulmin E, Seng K, Boisvert WA. MicroRNA 302a is a novel modulator of cholesterol homeostasis and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2015;35(2):323-31.
551. Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. J Lipid Res. juin 2010;51(6):1513-23.
552. Ramirez CM, Dávalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warrier N, Cirera-Salinas D, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. nov 2011;31(11):2707-14.
553. Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, et al. Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. J Clin Invest. sept 2005;115(9):2489-98.
554. Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL, et al. Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. J Clin Invest. avr 2004;113(8):1168-75.
555. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. J Lipid Res. déc 2002;43(12):1997-2006.
556. Bouvy-Liivrand M, Heinäniemi M, John E, Schneider JG, Sauter T, Sinkkonen L. Combinatorial regulation of lipoprotein lipase by microRNAs during mouse adipogenesis. RNA Biol. janv 2014;11(1):76-91.
557. Chen T, Li Z, Tu J, Zhu W, Ge J, Zheng X, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. FEBS Lett. 18 févr 2011;585(4):657-63.
558. Mattis AN, Song G, Hitchner K, Kim RY, Lee AY, Sharma AD, et al. A screen in mice uncovers repression of lipoprotein lipase by microRNA-29a as a mechanism for lipid distribution away from the liver. Hepatol Baltim Md. janv 2015;61(1):141-52.
559. Ahn J, Lee H, Chung CH, Ha T. High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis. Biochem Biophys Res Commun. 4 nov 2011;414(4):664-9.
560. Tian G-P, Chen W-J, He P-P, Tang S-L, Zhao G-J, Lv Y-C, et al. MicroRNA-467b targets LPL gene in RAW 264.7 macrophages and attenuates lipid accumulation and proinflammatory cytokine secretion. Biochimie. déc 2012;94(12):2749-55.
561. He Y, Huang C, Lin X, Li J. MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. Biochimie. juill 2013;95(7):1355-9.
562. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nat Rev Cancer. juin 2010;10(6):389-402.

563. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. Nat Genet. mars 2011;43(3):242-5.
564. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet. juill 2006;38(7):813-8.
565. Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S, et al. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. Cancer Res. 1 déc 2010;70(23):9641-9.
566. Richardson K, Louie-Gao Q, Arnett DK, Parnell LD, Lai C-Q, Davalos A, et al. The PLIN4 variant rs8887 modulates obesity related phenotypes in humans through creation of a novel miR-522 seed site. PloS One. 2011;6(4):e17944.
567. Liu Z, Wei S, Ma H, Zhao M, Myers JN, Weber RS, et al. A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Carcinogenesis. nov 2011;32(11):1668-74.
568. Evans D, Beil FU, Aberle J. Resequencing the untranslated regions of the lipoprotein lipase (LPL) gene reveals that variants in microRNA target sequences are associated with triglyceride levels. J Clin Lipidol. déc 2013;7(6):610-4.
569. Vickers KC, Shoucri BM, Levin MG, Wu H, Pearson DS, Osei-Hwedieh D, et al. MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. Hepatol Baltim Md. févr 2013;57(2):533-42.
570. Singaravelu R, Chen R, Lyn RK, Jones DM, O'Hara S, Rouleau Y, et al. Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: a novel mechanism for hepatic steatosis. Hepatol Baltim Md. janv 2014;59(1):98-108.
571. Jeong W, Lim W, Ahn SE, Lim C-H, Lee J-Y, Bae S-M, et al. Recrudescence mechanisms and gene expression profile of the reproductive tracts from chickens during the molting period. PloS One. 2013;8(10):e76784.
572. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim J, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. Nat Cell Biol. févr 2013;15(2):201-13.
573. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. Genome Res. juill 2009;19(7):1175-83.
574. Lin Y-H, Bundschuh R. RNA structure generates natural cooperativity between single-stranded RNA binding proteins targeting 5' and 3'UTRs. Nucleic Acids Res. janv 2015;43(2):1160-9.
575. Haas U, Sczakiel G, Laufer SD. MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure. RNA Biol. juin 2012;9(6):924-37.
576. Werk AN, Bruckmueller H, Haenisch S, Cascorbi I. Genetic variants may play an important role in mRNA-miRNA interaction: evidence for haplotype-dependent downregulation of ABCC2 (MRP2) by miRNA-379. Pharmacogenet Genomics. juin 2014;24(6):283-91.
577. Long D, Lee R, Williams P, Chan CY, Ambros V, Ding Y. Potent effect of target structure on microRNA function. Nat Struct Mol Biol. avr 2007;14(4):287-94.
578. Gan HH, Gunsalus KC. Tertiary structure-based analysis of microRNA-target interactions. RNA N Y N. avr 2013;19(4):539-51.
579. Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Sabater M, et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. J Nutr Biochem. 30 mai 2015;
580. Zhang L, Huang D, Wang Q, Shen D, Wang Y, Chen B, et al. MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. Cardiovasc Drugs Ther Spons Int Soc Cardiovasc Pharmacother. août 2014;28(4):303-11.
581. Li X, Chen Y-T, Josson S, Mukhopadhyay NK, Kim J, Freeman MR, et al. MicroRNA-185 and 342 inhibit tumorigenicity and induce apoptosis through blockade of the SREBP metabolic pathway in prostate cancer cells. PloS One. 2013;8(8):e70987.
582. Bian Y, Lei Y, Wang C, Wang J, Wang L, Liu L, et al. Epigenetic Regulation of miR-29s Affects the Lactation Activity of Dairy Cow Mammary Epithelial Cells. J Cell Physiol. sept 2015;230(9):2152-63.
583. Krentz AJ. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. nov 2003;5 Suppl 1:S19-27.

584. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol Baltim Md. nov 2007;21(11):2785-94.
585. Kurtz CL, Peck BCE, Fannin EE, Beysen C, Miao J, Landstreet SR, et al. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes. Diabetes. sept 2014;63(9):3141-8.
586. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. Acta Diabetol. mars 2011;48(1):61-9.
587. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. PloS One. 2011;6(8):e23925.
588. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. N Engl J Med. 2 mai 2013;368(18):1685-94.
589. van der Ree MH, van der Meer AJ, de Bruijne J, Maan R, van Vliet A, Welzel TM, et al. Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. Antiviral Res. nov 2014;111:53-9.
590. Chen W-J, Zhang M, Zhao G-J, Fu Y, Zhang D-W, Zhu H-B, et al. MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology. Atherosclerosis. avr 2013;227(2):201-8.
591. Rotllan N, Ramírez CM, Aryal B, Esau CC, Fernández-Hernando C. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in Ldlr-/- mice--brief report. Arterioscler Thromb Vasc Biol. août 2013;33(8):1973-7.
592. Distel E, Barrett TJ, Chung K, Girgis NM, Parathath S, Essau CC, et al. miR33 inhibition overcomes deleterious effects of diabetes mellitus on atherosclerosis plaque regression in mice. Circ Res. 10 oct 2014;115(9):759-69.
593. Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, Guo L, Allen RM, Yin X, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. EMBO Mol Med. sept 2014;6(9):1133-41.
594. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. BMC Genomics. 2007;8:166.
595. Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, Deshmukh M. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. Genes Dev. 15 janv 2011;25(2):125-30.
596. Han Y-C, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y, Fan J-B, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. J Exp Med. 15 mars 2010;207(3):475-89.
597. Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-γ. Nat Immunol. sept 2011;12(9):861-9.
598. Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, Steitz JA, DiMaio D. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 11 janv 2011;108(2):522-7.
599. Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J, Ren X. The role of miRNA-29 family in cancer. Eur J Cell Biol. mars 2013;92(3):123-8.
600. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. Physiol Genomics. 27 févr 2012;44(4):237-44.
601. Wang Y, Fu J, Jiang M, Zhang X, Cheng L, Xu X, et al. MiR-410 is overexpressed in liver and colorectal tumors and enhances tumor cell growth by silencing FHL1 via a direct/indirect mechanism. PloS One. 2014;9(10):e108708.
602. Shih KK, Qin L-X, Tanner EJ, Zhou Q, Bisogna M, Dao F, et al. A microRNA survival signature (MiSS) for advanced ovarian cancer. Gynecol Oncol. 1 juin 2011;121(3):444-50.
603. Gattolliat C-H, Thomas L, Ciafrè SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, et al. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. Br J Cancer. 25 oct 2011;105(9):1352-61.
604. Chen L, Zhang J, Feng Y, Li R, Sun X, Du W, et al. MiR-410 regulates MET to influence the proliferation and invasion of glioma. Int J Biochem Cell Biol. nov 2012;44(11):1711-7.
605. Shen J, Niu W, Zhou M, Zhang H, Ma J, Wang L, et al. MicroRNA-410 suppresses migration and invasion by targeting MDM2 in gastric cancer. PloS One. 2014;9(8):e104510.
606. Hennessy E, Clynes M, Jeppesen PB, O'Driscoll L. Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. Biochem Biophys Res Commun. 28 mai 2010;396(2):457-62.

6 ANNEXES

Les travaux présentés ont été valorisés à travers des posters et communications orales lors de congrès français et européens :

Prix de Poster

« Régulation du gène de la LPL par les miARN : interaction du miR-29 avec des polymorphismes de la région 3'UTR étroitement associés à la triglycéridémie »

- **Rencontres Scientifiques de CENS**, Octobre 2014 à Lyon

Poster commenté

"APOA5 down-regulation through miRNA interaction with polymorphic 3'UTR"

- Congrès de **l'European Atherosclerosis Society (EAS),** juin 2013 à Lyon

Communications orales

« Régulation épigénétique du gène APOA5 par l'interaction de miRNA avec des polymorphismes de la région 3'UTR étroitement associés aux hypertriglycéridémies »

- Congrès **de la Société Française d'Endocrinologie (SFE),** octobre 2013 à Paris

« A TG-associated minor LPL Haplotype suppresses miR-29 binding on LPL 3'UTR »

- Congrès de **l'European Lipoprotein Club (ELC),** septembre 2014 Tutzing, Allemagne
- Congrès de **l'European Atherosclerosis Society (EAS),** mars 2015 Glasgow, UK

« Régulation épigénétique du gène de la LPL par l'interaction de miRNA avec des polymorphismes de la région 3'UTR étroitement associés à la triglycéridémie »

- Congrès de la **Société Française d'Endocrinologie (SFE),** novembre 2014 à Lyon