



HAL
open science

PCSK9 études physiopathologiques et moléculaires

Yara Azar

► **To cite this version:**

Yara Azar. PCSK9 études physiopathologiques et moléculaires. Génétique. Université Paris Cité; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2022. Français. NNT : 2022UNIP5135 . tel-04608600

HAL Id: tel-04608600

<https://theses.hal.science/tel-04608600v1>

Submitted on 11 Jun 2024

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.

Université Paris Cité

En cotutelle avec Université Saint-Joseph de Beyrouth

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED562)

Laboratoire INSERM UMR_1148 « Laboratoire de sciences translationnelles vasculaires »

PCSK9 : Etudes Physiopathologiques et Moléculaires

Par Yara AZAR

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Dr. Mathilde VARRET

Et par Pr. Marianne ABI FADEL

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2022

Devant un jury composé de :

Cédric LE MAY, Directeur de recherche, Université de Nantes
Aline MILANE, Professeur associé, Lebanese American University
Nassim FARES, Professeur, Université Saint-Joseph de Beyrouth
Wilfried LE GOFF, Chargé de recherche, Université Paris Sorbonne
Mathilde DI FILIPPO, Docteur, Hospices Civils de Lyon
Mathilde VARRET, Chargé de recherche, Université Paris Cité
Marianne ABI FADEL, Professeur, Université Saint-Joseph de Beyrouth

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Titre : PCSK9 : Etudes Physiopathologiques et Moléculaires

Résumé :

Les maladies cardiovasculaires (MCV) dont fait partie l'athérosclérose, sont la principale cause de décès dans le monde et sont responsables de 17,9 millions de victimes chaque année. L'hypercholestérolémie est l'une des causes majeures de MCV et touche 1 sujet sur 20 dans la population générale. L'hypercholestérolémie familiale à transmission autosomique dominante (ADH) est caractérisée par une élévation des taux plasmatiques de cholestérol total et de LDL-C. Elle est due à des mutations dans 4 gènes principaux : *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*. La prévalence de cette maladie varie entre 1 sur 219 et 1 sur 300 et elle est plus fréquente dans certaines populations dû à la présence de mutations à effet fondateur. Au-delà de son rôle dans le catabolisme du récepteur des LDL, des études récentes ont mis en évidence d'autres mécanismes qui impliquent PCSK9 (Proprotéine Convertase Subtilisin Kexin type 9) dans le développement de l'athérosclérose indépendamment de son impact sur les lipides. L'objectif principal de cette thèse est donc d'élucider le rôle joué par PCSK9 dans le développement des MCV et cela sur le plan physiopathologique et moléculaire.

La première partie de ce travail porte sur la datation de la mutation p.(Ser127Arg) localisée dans l'exon 2 de *PCSK9*. Cette mutation a été exclusivement rapportée chez des patients ADH français et représente 67% des variants *PCSK9* en France révélant un effet fondateur. Le génotypage des marqueurs polymorphes autour de la mutation m'a permis d'identifier un haplotype commun aux porteurs de la mutation. Grâce à une méthode de datation basée sur la probabilité et qui utilise des marqueurs polymorphes, nous avons pu estimer l'âge de l'ancêtre commun le plus récent à 612 ans.

Dans la deuxième partie, j'ai dosé les taux plasmatiques de PCSK9 dans une cohorte d'écoliers libanais dans le but d'évaluer la distribution des taux de PCSK9 et leur corrélation avec les paramètres lipidiques. Parallèlement à l'étude de PCSK9 dans l'hypercholestérolémie, la troisième partie de ce travail comprend la description de la localisation de la PCSK9 à différents stades de l'athérosclérose et l'étude de son effet sur les capacités d'endocytose du cholestérol par les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) primaires. Grâce à la bio banque cardiovasculaire mise en place dans notre unité de recherche, des aortes à différents stades de l'athérosclérose et des CMLv ont été isolées à partir des cœurs humains explantés.

Ce projet de recherche a permis de montrer que la PCSK9 plasmatique, en étant corrélée positivement aux taux de cholestérol (total, LDL et non-HDL), pourrait être un biomarqueur des MCV chez les enfants et qu'elle pénètre la paroi artérielle à partir de la circulation où elle est retrouvée dans les CMLv au niveau de l'intima des aortes athéromateuses humaines. L'étude des CMLv primaires a montré qu'elles n'expriment pas PCSK9 mais peuvent l'internaliser, très probablement par les récepteurs scavengers exprimés par les CMLv notamment le récepteur LRP-1 (LDL receptor related protein 1).

L'identification d'un rôle direct de PCSK9 dans l'initiation de l'athérosclérose permettrait d'étendre l'utilisation des anti-PCSK9 du traitement des hypercholestérolémies à la prévention de l'athérosclérose.

Mots-clés : Hypercholestérolémie autosomique dominante, Athérosclérose, PCSK9, p.(Ser127Arg), haplotype, effet fondateur, cellules musculaires lisses vasculaires, récepteurs scavengers, LRP-1

Title: PCSK9: Pathophysiological and Molecular Studies**Abstract:**

Cardiovascular disease (CVD), including atherosclerosis, is the leading cause of death worldwide and is responsible for 17.9 million deaths yearly. Hypercholesterolemia is one of the major causes of CVD and affects 1 in 20 individuals in the general population. Familial autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH) is characterized by elevated plasma levels of total cholesterol and LDL-C. It is due to mutations in 4 main genes: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, and *APOE*. The prevalence of this disease varies between 1 in 219 and 1 in 300 and is more frequent in specific populations due to founder effect mutations. Beyond its role in the catabolism of the LDL receptor, recent studies have highlighted other mechanisms that implicate PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9) in the development of atherosclerosis independently of its impact on lipids. Therefore, this thesis's main objective is to elucidate the role played by PCSK9 in the development of CVD at the pathophysiological and molecular levels.

The first part of this work focused on dating the p.(Ser127Arg) mutation located in exon 2 of *PCSK9*. This mutation has been exclusively reported in French ADH patients and represents 67% of *PCSK9* variants in France, revealing a founder effect. Genotyping of polymorphic markers around the mutation allowed identifying a common haplotype for carriers of the mutation. Through a probability-based dating method that uses polymorphic markers, it was possible to estimate the age of the most recent common ancestor at 612 years.

In the second part, PCSK9 plasma levels were measured in a cohort of Lebanese schoolchildren to assess the distribution of PCSK9 levels and their correlation with lipid parameters. The third part of this work involved describing the localization of PCSK9 at different stages of atherosclerosis and studying its effect on the endocytosis capacities of cholesterol by primary vascular smooth muscle cells (vSMC). Aortas at different stages of atherosclerosis and vSMCs were isolated from explanted human hearts using the cardiovascular biobank established in our research unit.

In sum, these studies showed that plasma PCSK9, positively correlated with cholesterol levels (total, LDL, and non-HDL), could be a biomarker of CVD in children. PCSK9 penetrates the arterial wall from the circulation, and it is found in intimal vSMC of atheromatous human aortas. The study of primary vSMCs showed that the latter do not express PCSK9 but can internalize it. This process seems to happen through scavenger receptors expressed by vSMCs, including the LDL receptor-related protein 1 (LRP-1).

Identifying a direct role of PCSK9 in the initiation of atherosclerosis allows extending the use of anti-PCSK9 agents from treating hypercholesterolemia to preventing atherosclerosis.

Keywords: Autosomal dominant hypercholesterolemia, Atherosclerosis, PCSK9, p.(Ser127Arg), haplotype, founder effect, vascular smooth muscle cells, scavenger receptors, LRP-1

REMERCIEMENTS

“No one who achieves success does so without acknowledging the help of others. The wise and confident acknowledge this help with gratitude.” - Alfred North Whitehead.

Je clôture bientôt mes quatre années de thèse au sein de deux équipes exceptionnelles. Je tiens ainsi à remercier toutes les personnes qui m’ont accompagnée durant cette aventure remplie de défis mais qui m’a permis de progresser dans ma réflexion et de munir ce travail jusqu’au bout.

J’adresse tout d’abord mes remerciements aux membres du jury qui m’ont fait l’honneur de bien vouloir accepter d’évaluer mon travail de thèse. Un remerciement spécial au Professeur associé *Aline MILANE* et au Docteur *Cédric LE MAY* qui ont accepté d’être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie de votre lecture très attentive et de vos commentaires et suggestions précieux qui ont aidé à améliorer la qualité de mon manuscrit. Je tiens à remercier le Professeur *Nassim FARÈS* et les Docteurs *Wilfried Le GOFF* et *Mathilde DI-FILIPPO* d’avoir accepté d’assister à la présentation et à l’examen de ce travail. J’ai hâte de discuter mes recherches avec vous.

Je voudrais remercier tout particulièrement ma directrice de thèse en France, Docteur *Mathilde VARRET*, d’avoir accepté de m’encadrer tout au long de ce parcours. Mathilde, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta disponibilité, ton aide, tes nombreux conseils, ton intérêt à l’avancée des travaux et ton support continu. Merci pour la liberté que tu m’as accordée dans la gestion de ce travail qui m’as permis d’être autonome rapidement et de développer mes capacités intellectuelles. Cette thèse te doit beaucoup, merci.

Au Professeur *Marianne ABI FADEL*, c’est rare de rencontrer quelqu’un comme toi et je te suis à jamais redevable et reconnaissante. Je te remercie de m’avoir fait confiance et de m’avoir donné l’opportunité de poursuivre mes études de doctorat à un niveau international. Merci pour ta gentillesse, ton authenticité et ta générosité. Merci pour tes conseils judicieux, ton support continu sur les plans professionnel et personnel. Je ne peux pas imaginer comment aurait été tout mon parcours sans toi !

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements et ma gratitude au Professeur *Jean-Baptiste MICHEL*. C’est un honneur pour moi de travailler avec vous. Je vous remercie de nous avoir transmis votre passion pour la science et l’histoire et votre expertise des tissus humains et des cellules musculaires lisses. Merci pour vos conseils précieux et votre aide dans les manips, vos corrections pertinentes de l’article et du manuscrit de thèse. Merci pour votre disponibilité au quotidien et même durant les week-ends et merci également de vous soucier de mon avenir.

Je tiens à remercier Professeur *Didier LETOURNEUR*, directeur de l’unité LVTS INSERM U1148 de m’avoir acceptée comme membre au sein de son unité. J’adresse également tous mes remerciements aux directeurs de mon équipe au sein du LVTS, Professeurs *Catherine BOILEAU* et *Guillaume JONDEAU*. Je vous exprime ma profonde gratitude et mon respect et je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de votre équipe, vos conseils, vos

critiques constructives, vos discussions enrichissantes lors des réunions de l'équipe et surtout pour tout le support moral. Je remercie également Docteur *Carine LE GOFF* pour son soutien moral et scientifique continu. Je te remercie de ton enthousiasme scientifique qui me motive et de tes conseils précieux. Merci également pour les discussions épanouissantes que nous avons eues durant les pauses.

Je remercie les membres de mon équipe exceptionnelle au LBTM à Beyrouth : *Petra EL KHOURY*, *Youmna GHALEB*, *Sandy El BITAR*, *Yara ABOU KHALIL* et *Carine AYOUB*. Les mots ne suffiront pas pour vous remercier. Petra, un grand merci pour tes conseils, ton support moral infini et ta disponibilité même les samedi après-midi ou dimanche matin surtout cette année avec toutes tes occupations. Youmna, je te remercie profondément du temps que tu m'as consacré afin de répondre à toutes mes questions et à lire mon manuscrit. Merci également pour toutes les sorties en France surtout Paris et en Italie, et merci d'avoir fait le déplacement de Beyrouth pour être présente le jour de ma soutenance. Sandy, merci pour tes conseils précieux et pour toutes tes remarques avisées et merci également d'avoir changé notre humeur surtout durant les différentes saisons du confinement. Yara senior, merci d'être à mes côtés dès le premier jour de mon arrivée à Bichât et de m'avoir appris toutes les manip. Merci pour ces deux belles années que nous avons passées ensemble avec tous les hauts et les bas. Je te serai toujours reconnaissante. Carine, bientôt 10 ans d'amitié. Merci pour ton support moral tout au long de ces années et pour tous les beaux moments passés ensemble. Bonne chance pour ta dernière ligne droite.

Merci à tous les membres de l'équipe 2 au LVTS. A *Pauline*, *Zakaria* et *Julia*, merci de m'avoir accueillie parmi vous. Pauline, merci pour les conseils, l'aide et les petites discussions. Julia, nos conversations sur nos familles et tes sorties à Paris et à Barcelone vont me manquer. Je te souhaite pleines de belles choses pour l'avenir. Zak, en quelques jours tu n'étais plus un étranger pour moi mais un ami que je remercie pour sa gentillesse, sa confiance et son support. Merci également pour les discussions, les rires, les taquins, la préparation des pots de thèse, la décongélation du frigo... Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et tes projets d'avenir. Merci également au Docteur *Marie-Paule JACOB* d'avoir pris en charge mes dossiers avec campus France, au Docteur *Jean Pierre RABÈS*, à *Nadine*, *Jordan* et tous les jeunes qui ont croisé mon chemin dans l'équipe 2.

J'exprime mes remerciements à *Catherine DESCHILDRE* d'avoir partagé son expertise sur les tissus humains avec nous, à *Marie-Nathalie* pour son aide dans la collecte des aortes, la mise en culture et l'entretien des cellules musculaires lisses.

Outres les membres de mon équipe, je voudrais remercier les Professeurs *Antonino NICOLETTI* et *Giuseppina CALIGIURI* pour m'avoir accueillie dans leur étage où j'ai occupé le Luminex® pendant des mois. Merci à tous les membres du LVTS, jeunes étudiants et chercheurs. Merci à *Sara* et à *Amel* qui ont fait de mon parcours de doctorat surtout après le départ de toutes les Libanaises de l'équipe, une aventure très spéciale.

Je remercie également l'équipe Marfan au département de génétique à l'hôpital Bichat particulièrement *Alisson*, pour m'avoir accueillie chaleureusement pendant des heures pour lire les résultats des microsatellites. Merci à *Samira* de la plateforme d'imagerie Cri pour son aide.

Je souhaite remercier mes deux écoles doctorales : BioSPC à Paris Cité et l'école doctorale sciences et santé à l'université Saint-Joseph de Beyrouth, qui ont rendu possible cette thèse de cotutelle. Un merci tout particulier à « Amgen competitive grant program » pour son soutien

financier et pour m'avoir donné la possibilité de mener mes recherches doctorales sur un niveau international. Je voudrais également remercier tous ceux qui m'ont financée durant mes années de thèse : le CNRS libanais, l'Université Saint-Joseph de Beyrouth et son conseil de la recherche, et la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA) pour la bourse du congrès de l'ELC.

Un grand merci à l'ensemble de mes proches et de mes amis pour leur soutien inconditionnel. Merci à *Alexandra* d'être ma maman loin de la maison, à ma « sœur » *Elza* d'être mon support moral et scientifique tout au long de cette journée, à *Elie* et *Chantal* qui ont facilité mon séjour en France dès le premier jour de mon arrivée, à *Josée*, *Sahar*, *Jackie*, *Omar*, *Gilbert*, *Léa* et *Joy*.

J'exprime ma reconnaissance à ma famille : mon père, ma mère, ma sœur, mon frère, mon gendre et mon neveu que j'attends impatiemment. Merci pour vos prières et votre support inconditionnel. Merci de m'avoir toujours fait confiance, de m'avoir guidée et de m'avoir aidée à comprendre ce dont je suis capable afin que je puisse poursuivre mes rêves.

Finalement, je voudrais remercier mon plus grand professeur : Dieu pour m'avoir donné la chance d'être ici et de mener jusqu'au bout ce chapitre de ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	7
TABLE DES FIGURES	12
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	15
AVANT-PROPOS	19
INTRODUCTION	20
Chapitre 1 : Hypercholestérolémie familiale	21
1. Introduction	21
2. Epidémiologie	22
3. Physiopathologie de l'ADH	22
4. Diagnostic de l'ADH	25
4.1 Diagnostic clinique	26
4.1.1 Protocoles de diagnostic de l'HF	27
4.2 Diagnostic génétique	29
5. La génétique de l'HF	31
5.1 Le gène <i>LDLR</i>	33
5.1.1 Définition et Identification	33
5.1.2 Structure génique et protéique	34
5.1.3 Mécanisme d'action	35
5.1.4 Les mutations du <i>LDLR</i>	36
5.1.4.1 Classification des mutations du <i>LDLR</i>	37
5.2 Le gène <i>APOB</i>	38
5.2.1 Définition et Identification	38
5.2.2 Structure génique et protéique	39
5.2.3 Fonction de l'apoB	39
5.2.4 Mutations de l' <i>APOB</i>	40
5.3 Le gène <i>APOE</i>	43
5.3.1 Définition	43
5.3.2 Structure génique et protéique	43
5.3.3 Les isoformes de l' <i>APOE</i>	44
5.3.4 Mutations du gène <i>APOE</i>	45

5.4	Le gène <i>PCSK9</i>	47
5.4.1	Définition et Identification	47
5.4.2	Structure génique et protéique	48
5.4.3	Fonctions de <i>PCSK9</i>	49
5.4.3.1	Fonction hépatique	49
5.4.3.2	Fonctions extra hépatiques	51
5.4.3.2.1	Action de la <i>PCSK9</i> dans le tractus gastro-intestinal	52
5.4.3.2.2	Action de la <i>PCSK9</i> sur la lipémie postprandiale	52
5.4.3.2.3	Action de la <i>PCSK9</i> sur le pancréas et risque de diabète	53
5.4.3.2.4	Action de la <i>PCSK9</i> sur les reins	54
5.4.3.2.5	Action de la <i>PCSK9</i> dans le cerveau	54
5.4.3.2.6	Action de la <i>PCSK9</i> sur le cœur	55
5.4.3.2.7	<i>PCSK9</i> et risque de cancer	56
5.4.3.2.8	<i>PCSK9</i> et risque d'infection	57
5.4.3.2.9	<i>PCSK9</i> et inflammation	58
5.4.3.2.10	<i>PCSK9</i> et activation plaquettaire	58
5.4.3.3	<i>PCSK9</i> et Athérosclérose	59
5.4.3.3.1	<i>PCSK9</i> et CMLv	59
5.4.3.3.2	<i>PCSK9</i> et Récepteurs des lipoprotéines	60
5.4.4	Régulation de <i>PCSK9</i>	62
5.4.4.1	Régulation transcriptionnelle	62
5.4.4.2	Régulation post-transcriptionnelle	63
5.4.4.3	Modifications post-traductionnelles	63
5.4.5	<i>PCSK9</i> circulante	63
5.4.6	Mutations de <i>PCSK9</i>	64
5.4.6.1	Mutations gain de fonction	64
5.4.6.2	Mutations perte de fonction	66
6.	Traitement de l'HF	67
6.1	Les statines	69
6.2	Les Anti- <i>PCSK9</i>	70
6.2.1	Les anticorps monoclonaux	70
6.2.2	ARN interférant	72
6.2.3	Thérapie génique	74
6.3	Les autres traitements	75
6.3.1	Lomitapide et Mipomersen	75
6.3.2	Acide bempédoïque	76
7.	Autres formes d'hypercholestérolémie familiale	76

7.1	Hypercholestérolémie à transmission autosomique récessive (ARH)	76
7.2	La forme polygénique	78
7.3	La forme oligogénique	79
8.	HF au Liban	79
Chapitre 2 : Cellules musculaires lisses vasculaires et athérosclérose		82
1.	Physiologie de la paroi artérielle	83
1.1	Intima	83
1.2	Média	84
1.2.1	Les cellules musculaires lisses vasculaires	85
1.2.1.1	Origine des cellules musculaires lisses vasculaires	85
1.2.1.2	Structure et Fonctions des CMLv	86
1.2.1.2.1	Phénotype contractile	87
1.2.1.2.2	Phénotype sécrétoire	87
1.2.1.2.3	Phénotype endocytaire et phagocytaire	87
1.2.1.2.4	Phénotype procalcifiant	87
1.2.1.3	Différenciation et Plasticité des CMLv	88
1.2.1.3.1	Différenciation des CMLv	88
1.2.1.3.2	Plasticité des CMLv	88
1.2.1.3.3	Les marqueurs du phénotype contractile versus sécrétoire des CMLv	89
1.2.2	La Matrice Extracellulaire	92
1.2.2.1	Les collagènes	92
1.2.2.2	L'élastine	92
1.2.2.3	Les glycoprotéines de structure	93
1.2.2.4	Les protéoglycanes	93
1.3	Adventice	94
1.3.1	Vasa Vasorum	94
1.3.2	Les fibroblastes	94
2.	Physiopathologie de l'athérome humain	95
2.1	Classification des lésions athéromateuses	95
2.1.1	Les lésions pré-athéromateuses	96
2.1.2	Les lésions athéromateuses progressives	96
2.1.3	Les lésions complexes	97
2.2	Les acteurs impliqués dans la formation de la plaque athéromateuse	98
2.2.1	Les lipoprotéines	98
2.2.2	Les Récepteurs des lipoprotéines	99
2.2.2.1	Récepteurs « LDL receptor-related proteins » ou LRP	99

2.2.2.1.1	LDL Receptor related protein 1 (LRP-1)	99
i.	Structure et Régulation	99
ii.	Fonctions de LRP-1	101
2.2.2.2	Récepteurs éboueurs ou « scavengers »	104
2.2.2.2.1	Lectin-like Oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)	106
i.	Structure de LOX-1	106
ii.	Expression de LOX-1	107
iii.	Fonctions de LOX-1	107
iv.	Génétique	109
2.2.2.2.2	Cluster of Differentiation 36 (CD36)	111
i.	Structure de CD36	111
ii.	Fonctions de CD36	112
iii.	Génétique	112
2.3	Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires dans la progression de la pathologie athéromateuse	113
OBJECTIFS		116
RÉSULTATS		119
Chapitre 1 : Datation de la mutation française fondatrice p.(Ser127Arg) dans <i>PCSK9</i>		120
1.	Introduction	120
2.	Article 1	121
3.	Discussion	135
Chapitre 2 : Dosage de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique libanaise		139
1.	Introduction	139
2.	Article 2	140
3.	Discussion	155
Chapitre 3 : Rôle de PCSK9 dans le développement de l'athérosclérose		157
1.	Introduction	157
2.	Article 3	158
3.	Discussion	191
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		200
1.	Hypercholestérolémie familiale	202
2.	Dosage de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique libanaise	203
3.	Rôle de PCSK9 dans le développement de l'athérosclérose	205
CONCLUSION		208
RÉFÉRENCES		210
ANNEXES		241
Article 4		242

Article 5	253
Article 6	279
Article 7	293

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Physiopathologie de l'HF _____	25
Figure 2 : Caractéristiques cliniques extravasculaires de l'HF _____	27
Figure 3 : Différentes catégories de patients peuvent se soumettre à un test génétique de l'HF ____	31
Figure 4 : Illustration schématique du récepteur des LDL et de ses différents domaines ____	35
Figure 5 : Mécanisme d'action du récepteur des LDL _____	36
Figure 6 : Structure de l'apoB 100_____	41
Figure 7 : Différentes mutations rapportées dans <i>APOB</i> , provoquant une hypercholestérolémie (FDB) et une hypocholestérolémie (HBLF) _____	42
Figure 8 : Distribution des variants du gène <i>APOE</i> dans la protéine apoE _____	45
Figure 9 : Structure et modifications post-traductionnelles de PCSK9 _____	49
Figure 10 : Structure cristalline de la PCSK9 humaine _____	50
Figure 11 : Impact du PCSK9 sur le récepteur des LDL et le mécanisme d'action des inhibiteurs de PCSK9 _____	51
Figure 12 : PCSK9 et l'activation des cellules musculaires lisses après une lésion vasculaire _	60
Figure 13 : Distribution des taux du LDL-C chez des patients non traités présentant uniquement des mutations gain de fonction de <i>PCSK9</i> _____	66
Figure 14 : Structure de la protéine PCSK9 et localisation des variants gain et perte de fonction _	67
Figure 15 : Sécurité et efficacité des inhibiteurs de la PCSK9 _____	72
Figure 16 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de la PCSK9 _____	74
Figure 17 : Mécanisme d'action de LDLRAP1 _____	77
Figure 18 : Représentation schématique des trois tuniques de la paroi artérielle _____	83
Figure 19 : Les cellules progénitrices des CMLv durant l'embryogenèse _____	85
Figure 20 : Plasticité des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv). Les CMLv reprogramment leur modèle d'expression en réponse à des stimuli aigus et chroniques ____	89
Figure 21 : Les aspects macroscopiques des stades de l'athérome humain utilisés dans notre étude. _____	97

Figure 22 : Structure de la forme mature de LRP-1 _____	101
Figure 23 : Cinq classes différentes de SR (A, B, E, G, J) _____	105
Figure 24 : Représentation schématique de la structure de LOX-1 _____	107
Figure 25 : Mécanismes de LOX-1 dans l'athérogenèse et l'ischémie myocardique _____	109
Figure 26 : Structure et fonction du récepteur CD36 _____	111
Figure 27 : Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires dans l'athérosclérose _____	115
Figure 28 : Résultats des microsatellites _____	135
Figure 29 : Résultats de Génotypage _____	136
Figure 30 : Expression du gène <i>PCSK9</i> dans les macrophages humains contrôles ou traités avec des LDL acétylées et dans les cellules musculaires lisses vasculaires contrôles ou traitées par des LDL oxydées. _____	193
Figure 31 : Expression des gènes <i>PCSK9</i> , <i>LOX-1</i> , <i>LRP-1</i> , <i>CD36</i> et <i>LDLR</i> dans les lignées de CMLv traitées ou non par des LDL oxydées (oxLDL) et <i>PCSK9</i> . _____	196
Figure 32 : Etude de l'expression protéique de <i>PCSK9</i> dans les lignées CML traitées ou non avec des LDL oxydées (oxLDL) et <i>PCSK9</i> . _____	197
Figure 33 : Internalisation des LDL oxydées par les lignées CMLv contrôles et traitées par <i>PCSK9</i> , évaluée par cytométrie en flux. _____	198
Figure 34 : Etude de l'expression protéique de (A) LRP-1 et (B) CD36 dans les lignées de CMLv traitées ou non avec des LDL oxydées (oxLDL) et <i>PCSK9</i> . _____	199

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés et composition des particules lipoprotéiques du plasma humain ____	23
Tableau 2 : Comparaison entre les différentes stratégies de diagnostic de l'HF _____	28
Tableau 3 : Gènes associés avec l'HF _____	32
Tableau 4 : Expression des protéines des CMLv contractiles et synthétiques _____	91
Tableau 5 : Polymorphismes nucléotidiques du gène OLR1 codant LOX-1 et leur signification fonctionnelle _____	110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A :

ABCA1 :	ATP-binding cassette transporter A1
ACAT :	Acyl-CoA cholestérol acyltransférase
ADAM :	Disintegrin and Metalloproteinase
ADH :	Autosomal Dominant Hypercholesterolemia (hypercholestérolémie à transmission autosomique dominante)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AHA :	American Heart Association
apoA1 :	Apolipoprotéine A1
apoA2 :	Apolipoprotéine A2
apoA4 :	Apolipoprotéine A4
apoB :	Apolipoprotéine B
apoC1 :	Apolipoprotéine C1
apoC2 :	Apolipoprotéine C2
apoC3 :	Apolipoprotéine C3
apoE :	Apolipoprotéine E
ARH :	Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (hypercholestérolémie à transmission autosomique récessive)
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messager
ASCVD :	Atherosclerotic Cardiovascular Disease (maladie cardiovasculaire athérosclérotique)
ACSVL1 :	Very Long-chain Acyl-CoA Synthetase-1
ATP :	Adénosine triphosphate
AVC :	Accident Vasculaire Cérébral

C :

CD36 :	Cluster of Differentiation 36
CD68 :	Cluster of Differentiation 68
CE :	Cellules Endothéliales
CM :	Chylomicrons
CML :	Cellules Musculaires Lisses
CMLv :	Cellules Musculaires Lisses vasculaires
CNV :	Copy Number Variant (variation du nombre de copies)
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT :	Cholestérol Total
CTLD :	C-terminal extracellulaire lectin like
CV :	Cardiovasculaire
CYP7A1 :	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1

D :

DL :	Déséquilibre de liaison
DLCN :	Dutch Lipid Clinic Network
DIT :	Diffusion Intimal Thickening (épaississement intimal diffus)

E:

EAS :	European Atherosclerosis Society (société européenne d'athérosclérose)
ECS :	European Cardiology Society (société européenne de cardiologie)
EGF :	Epidermal Growth Factor
EMA :	European Medicines Agency (agence européenne des médicaments)

F:

FB :	Fibroblaste
FDA :	Food and Drug Administration
FDB :	Familial Defective Apolipoprotein B-100 (déficit familial en apoB-100)
FXR :	Farnesoide X Receptor (récepteur farnésoïde X)

G:

GAG :	Glycosaminoglycanes
GWAS :	Genome Wide Association Studies

H:

HBLF :	Hypobêtalipoprotéïnémie Familiale
HCV :	Hepatitis C Virus (virus de l'hépatite C)
HDL :	High Density Lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)
HF :	Hypercholestérolémie familiale
HIF-1 α :	Hypoxia Inducible Factor-1 α
HMG-CoA :	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HNF-1 :	Facteur de transcription nucléaire hépatocytaire 1

I:

IDL :	Intermediate Density Lipoproteins (lipoprotéines de densité intermédiaire)
IMC :	Indice de Masse Corporelle

K:

Kb :	Kilobase
KDa :	Kilo Daltons
KLF4 :	Krüppel-like factor 4
KO :	Knock-out

L:

LDL :	Low Density Lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)
LDL-C :	Low Density Lipoproteins-Cholesterol
LDLr :	Low Density Lipoproteins receptor (récepteur des lipoprotéines de basse densité)
LDLRAP1 :	Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (protéine adaptatrice 1 du récepteur des LDL)
LOX-1 :	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
Lp(a) :	Lipoprotéine (a)
LPS :	Lipopolysaccharides
LRP-1 :	Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 1
LRP6 :	Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 6
LXR :	Liver X Receptor

M:

MCV :	Maladies Cardiovasculaires
MEDPED :	Make Early Diagnosis to Prevent Early Death
MEC :	Matrice Extra-cellulaire
MHC :	Myosin Heavy Chain (chaîne lourde de la myosine)
miRNA :	Micro ARN
MMP :	Matrix Metalloproteinase (métalloprotéinase de la matrice)
MT1-MMP :	Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase
mtROS :	ROS mitochondriaux
MTTP :	Microsomal Triglyceride Transfer Protein (protéine microsomale de transfert des triglycérides)
MYH11 :	Myosin Heavy Chain 11 (chaîne lourde de la myosine 11)

N:

NARC1 :	Neural Apoptosis Regulated Convertase 1
NGS :	Next Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération)

O:

oxLDL :	LDL oxydées
---------	-------------

P:

Pb :	Paire de bases
PC :	Proprotéine Convertase
PCSK9 :	Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexin de type 9
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PDGF-BB :	Platelet Derived Growth Factor-BB
PPAR γ :	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
PRS :	Polygenic Risk Score

R:

RAP :	Receptor Associated Protein
RE :	Réticulum Endoplasmique
RISC :	RNA-Induced Silencing Complex
ROS :	Reactive Oxygen Species (espèces réactives à l'oxygène)

S:

siARN :	Small Interfering RNA (petits ARN interférents)
sLRP-1 :	Soluble LRP-1 (forme soluble du LRP-1)
SM :	Smooth Muscle (muscle lisse)
α SMA :	α -Smooth muscle actin
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisme (polymorphisme d'un seul nucléotide)
SR :	Scavenger Receptor (récepteurs éboueurs)
SRA :	Scavenger Receptor Class A (récepteurs scavengers classe A)
SBR :	UK Simon Broome Register
SR-B1 :	Scavenger Receptor B type 1 (récepteur scavenger B de type 1)
SREBP :	Sterol Regulatory Element Binding Protein

T:

- TG : Triglycérides
TGFβ : Transforming growth factor beta (facteur de croissance transformant-β)
TICE : Trans-intestinal cholesterol excretion (excrétion trans-intestinale du cholestérol)
TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

U:

- UE : Union Européenne

V:

- VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion protein 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VLDL : Very Low Density Lipoproteins (lipoprotéines de très basse densité)

W:

- WGS : Whole Genome Sequencing (séquençage du génome entier)

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent un problème de santé majeur et sont responsables de 17,9 millions de décès en 2019, ce qui représente 32 % de tous les décès dans le monde (*WHO / Cardiovascular diseases (CVDs)*, s. d.). L'athérosclérose est l'une des causes majeures des MCV. C'est un trouble chronique qui se développe progressivement tout au long de la vie jusqu'à l'apparition des symptômes à un stade avancé qui sont dus notamment à un infarctus du myocarde et aux accidents vasculaires cérébraux. Parmi les facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose existe l'hypercholestérolémie familiale à transmission autosomique dominante (ADH) qui est causée par des mutations dans 4 gènes principaux : *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*.

PCSK9 s'est révélée une actrice importante dans l'homéostasie du cholestérol, suite à son implication dans l'ADH dans des familles d'origine française. Récemment, des études ont montré que le rôle de *PCSK9* ne se limite pas uniquement à la régulation du récepteur des LDL mais qu'elle est également impliquée dans le processus de l'athérosclérose.

L'objectif de mes travaux est d'étudier le rôle de *PCSK9* sur les plans moléculaires et physiopathologiques.

Pour cela, dans l'**introduction** de ce manuscrit j'ai abordé dans un premier chapitre la définition de l'**hypercholestérolémie familiale** ainsi que son mécanisme physiopathologique, ses différents acteurs notamment génétiques ainsi que ses traitements. Dans le deuxième chapitre qui porte sur l'**athérosclérose**, je détaille la physiologie de la paroi aortique, les différents aspects de la pathologie athéromateuse et ses différents acteurs notamment les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) et les récepteurs scavengers. Ensuite, les **résultats expérimentaux** obtenus sont présentés sous forme de trois articles. Le premier article a permis de dater, chez des patients ADH français, la mutation gain de fonction p.(Ser127Arg) dans *PCSK9*, l'une des premières découvertes et qui est actuellement retrouvée chez 67% des patients ADH français. Les deux autres articles visaient à étudier *PCSK9* sur le plan physiopathologique. Tout d'abord en montrant dans une cohorte formée des sous-groupes d'enfants libanais dyslipidémiques que *PCSK9* pourrait être un marqueur prédictif des MCV. Puis en identifiant *PCSK9* comme actrice dans le développement de l'athérome via les CMLv indépendamment de son rôle sur le LDL-C. Et finalement, la dernière partie est consacrée à la **discussion** de l'ensemble des études pratiques et aux **perspectives** qui en découlent ainsi qu'à une **conclusion** générale. Les **annexes**, retrouvées à la fin du manuscrit, représentent mes travaux collaboratifs.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Hypercholestérolémie familiale

1. Introduction

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est une maladie héréditaire qui touche environ 30 millions de sujets dans le monde (Defesche et al., 2017). Elle se caractérise par des taux plasmatiques élevés des lipoprotéines de basse densité (LDL) aboutissant à une accélération de l'athérosclérose et à un risque accru des maladies cardiovasculaires (MCV) prématurées en absence de traitement (Beheshti et al., 2020).

L'HF est une maladie génétique principalement à transmission autosomique dominante connue sous le nom d'ADH (*Autosomal Dominant Hypercholesterolemia*). Elle est causée par des mutations dans trois gènes principaux : le gène *LDLR* codant le récepteur des LDL (LDLr) (Brown & Goldstein, 1986), le gène *APOB* codant l'apolipoprotéine B100 (apoB100), ligand du LDLr (Innerarity et al., 1990), et le gène *PCSK9* codant la proprotéine convertase subtilisine/kexin de type 9 (Abifadel et al., 2003) qui se lie au LDLr et induit sa dégradation indépendamment de son activité catalytique (Abifadel et al., 2014). Plus rarement, des mutations du gène *APOE* codant l'apolipoprotéine E (apoE) ont été décrites dans l'ADH (Abou Khalil et al., 2022; Marduel et al., 2013). Ces mutations entraînent une incapacité du foie à éliminer suffisamment les particules LDL de la circulation (Defesche et al., 2017).

Les mutations dans le gène *LDLR* constituent la principale cause d'ADH (80-85% des cas). Plus rarement, des mutations dans les gènes *APOB* (5-10% des cas), *PCSK9* (2% des cas) et *APOE* (1% des cas) peuvent en être la cause (Vrablik et al., 2020). La plupart des personnes atteintes d'ADH sont porteuses d'une mutation dans l'un des allèles de ces gènes et présentent donc une ADH à l'état hétérozygote. Dans de rares cas, les patients peuvent avoir les deux allèles portant la même mutation et, par conséquent, avoir une ADH à l'état homozygote. Les autres génotypes rares qui peuvent se produire sont l'hétérozygotie composée (deux mutations différentes du même gène) ou la double hétérozygotie (mutations dans deux gènes différents). Ces génotypes rares entraînent généralement un phénotype plus sévère (Defesche et al., 2017). Notons qu'il existe une forme récessive de l'HF connue sous le nom d'ARH (*Autosomal Recessive Hypercholesterolemia*). Elle est causée par des mutations dans le gène *LDLRAP1* (low density lipoprotein receptor adaptor protein 1) qui code la protéine adaptatrice 1 nécessaire à l'internalisation du récepteur des LDL médiée par la clathrine (Defesche et al., 2017; Garcia et al., 2001).

2. Epidémiologie

L'ADH est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes chez l'homme. Elle est nettement plus fréquente que les estimations faites par Brown et Goldstein au moment où ils ont identifié le LDLr et qui étaient de l'ordre 1 sur 500 chez les hétérozygotes et 1 sur 1000000 chez les homozygotes (Brown & Goldstein, 1986). En effet, en se basant sur des études spécifiques réalisées dans plusieurs pays, la fréquence de l'ADH est entre 1 sur 219 et 1 sur 300 (Defesche et al., 2017; Lansberg et al., 2000; Nordestgaard & Benn, 2017). Par conséquent, la prévalence de l'ADH à l'état homozygote est de l'ordre d'1 individu sur 300 000 (Cuchel et al., 2014). De plus, selon une méta-analyse réalisée sur 11 millions d'individus, la prévalence de l'ADH était 10, 20 et 23 fois plus élevée dans des sous-groupes d'individus atteints respectivement de maladies cardiaques ischémiques, maladies cardiaques ischémiques prématurées et d'une hypercholestérolémie sévère en les comparant à la population générale (Beheshti et al., 2020). De même, la prévalence de l'ADH est élevée dans certaines populations bien définies et ceci est dû à des mutations à effet fondateur (c'est-à-dire une diversité génétique réduite dans une population ayant un ancêtre commun). C'est le cas des afrikaners de l'Afrique du sud (1 sur 83) (Marais, 2004), des canadiens français (1 sur 270) (Moorjani et al., 1989), des libanais (1 sur 81) (Abifadel et al., 2009), et des juifs de Johannesburg (1 sur 67) (Seftel et al., 1989).

Malgré l'incidence élevée de l'ADH, moins de 1% des patients sont diagnostiqués dans la plupart des pays. Les Pays-Bas, la Norvège, le Royaume-Uni, l'Espagne, le Danemark, la Belgique, la République tchèque, la Slovaquie, l'Islande et la Suisse font une exception puisqu'ils diagnostiquent 2 à 10 % des personnes atteintes et utilisent souvent des tests génétiques (Nordestgaard & Benn, 2017).

3. Physiopathologie de l'ADH

Le cholestérol est le constituant lipidique des membranes cellulaires et le précurseur de nombreuses molécules bioactives, notamment les hormones stéroïdiennes et sexuelles, la vitamine D, les oxystérols (dérivés oxydés du cholestérol) et les acides biliaires (Hegele, 2009). Seulement une petite quantité du cholestérol circulant provient de l'alimentation. La majorité

provient de la synthèse hépatique dans laquelle la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase joue le rôle de l'enzyme limitante de cette synthèse (Goldstein & Brown, 2009).

L'insolubilité du cholestérol dans le plasma exige qu'il soit transporté dans des macromolécules sphéroïdales appelées lipoprotéines qui sont amphipathiques. Les lipoprotéines ont un noyau hydrophobe contenant des phospholipides, des antioxydants, des vitamines liposolubles et des esters de cholestérol et une enveloppe hydrophile contenant du cholestérol libre, des molécules de phospholipides et des apolipoprotéines. Les principales lipoprotéines transportant du cholestérol sont les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). D'autres comprennent les chylomicrons (CM) et les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), qui sont les principales lipoprotéines porteuses de triglycérides (TG) (**Tableau 1**) (Hegele, 2009). A part la lipoprotéine (a) qui partage une homologie structurale avec le plasminogène (H. Wang et al., 2016).

Tableau 1 : Propriétés et composition des particules lipoprotéiques du plasma humain (adapté (Defesche et al., 2017))

Les lipoprotéines se distinguent les unes des autres par leur densité, leur taille, leur composition, leur lieu de synthèse et leur fonction.

Particule lipoprotéique	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Composition (% par poids)	Principales apolipoprotéines	Synthèse	Fonction
Chylomicron	< 0,930	75 à 1200	Triglycérides (80 - 90)	apoB48*, apoC2, apoC3, apoE, apoA1, apoA2 et apoA4	Intestin	Transport des lipides alimentaires des intestins vers les tissus
Remnants des chylomicrons	0,930 – 1,006	30 à 80	Triglycérides (70 - 80)	apoB48* et apoE	Catabolisme des chylomicrons	Transport des lipides alimentaires
VLDL	0,930 – 1,006	30 à 80	Triglycérides (40 - 60)	apoB100*, apoE*, apoC2 et apoC3	Foie	Transport des lipides du foie vers les tissus
IDL	1,006 – 1,019	23 à 35	Triglycérides (20 - 50) Cholestérol (20 - 40)	apoB100*, apoE, apoC2 et apoC3	Catabolisme des VLDL	Transport des lipides du foie vers les tissus
LDL	1,019 – 1,063	18 à 25	Cholestérol (50 - 60)	apoB100*	Catabolisme des VLDL et IDL	Transport des esters de cholestérol d'origine hépatique et exogène

HDL	1,063 – 1,210	5 à 12	Cholestérol (15 - 25) Phospholipides (23 - 30)	apoA1*, apoA2, apoC1, apoC2, apoC3 et apoE	Foie et intestin	Transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie
Lp(a)	1,055 – 1,085	~ 30	Cholestérol (20 - 30)	apoB100* et apo(a)*	Foie	Inconnu (peut- être cicatrisation des plaies et coagulation)

* Apolipoprotéine(s) la plus abondante dans la particule

La majorité des cellules de l'organisme exprime le récepteur des LDL mais ce dernier est retrouvé essentiellement dans les hépatocytes qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des LDL plasmatique (Goldstein & Brown, 2009).

L'augmentation des taux plasmatiques de LDL est souvent dû à l'un des mécanismes suivants (Defesche et al., 2017):

- un nombre réduit ou une absence d'activité des récepteurs hépatiques des LDL
- une apoB ou une apoE défectueuse inhibant la liaison des LDL à leurs récepteurs
- une mutation gain de fonction de *PCSK9* qui entraîne une diminution des récepteurs des LDL à la surface cellulaire en favorisant l'internalisation des récepteurs et leur dégradation dans le lysosome et en empêchant donc leur recyclage à la surface cellulaire.

Tous ces mécanismes contribuent à un excès de cholestérol circulant qui est contenu dans les LDL et non pas dans les HDL et qui prédispose à des maladies cardiovasculaires comme c'est le cas chez les patients atteints d'ADH (Goldstein & Brown, 2009). Les LDL ont de nombreux effets délétères sur la fonction vasculaire par leur accumulation dans l'intima, notamment l'altération de la réponse artérielle normale aux stimuli vasodilatateurs, l'induction de l'inflammation vasculaire et l'internalisation des particules LDL modifiées et notamment oxydées par les macrophages et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) de la paroi artérielle. Ces cellules se chargent en cholestérol et se transforment ainsi en des cellules spumeuses. Ces dernières sont des composants essentiels de la plaque d'athérome pouvant aboutir à des maladies coronariennes (**Figure 1**) (Berberich & Hegele, 2019).

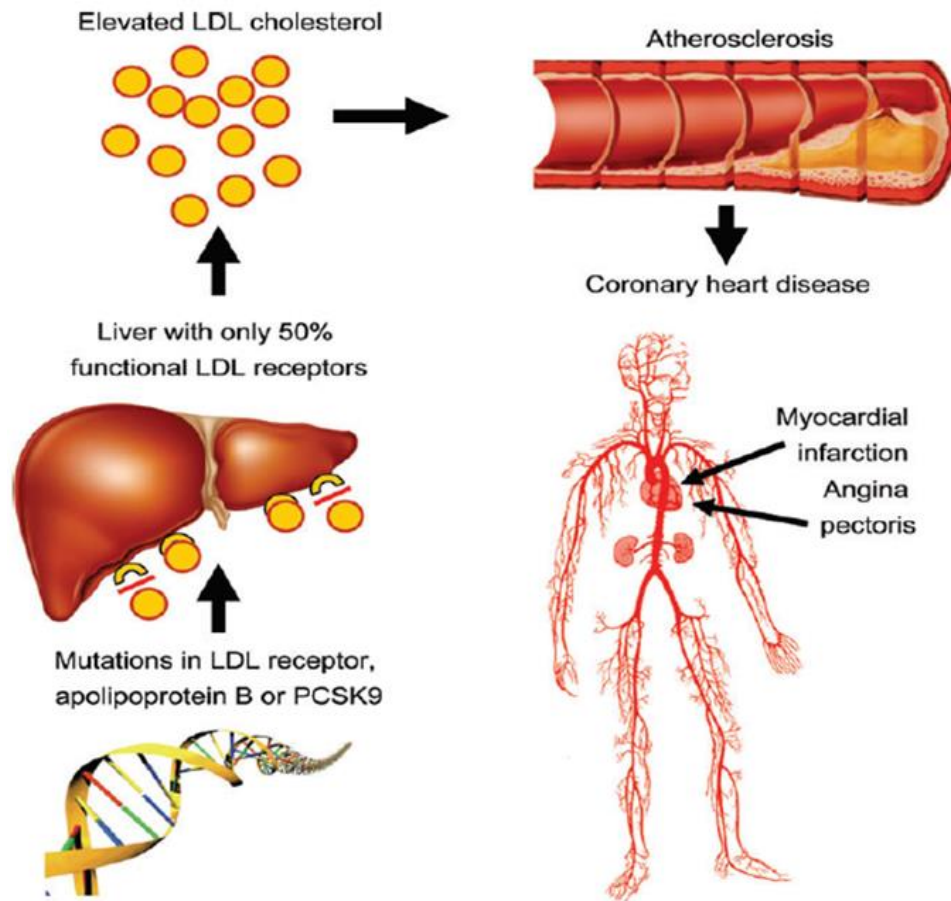


Figure 1 : Physiopathologie de l'HF (Nordestgaard et al., 2013)

L'HF est causée par des mutations dans les gènes (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) codant pour des protéines clés intervenant dans les voies d'endocytose et de recyclage du récepteur des LDL, ce qui conduit à une diminution de l'absorption cellulaire des LDL et à une augmentation du LDL-C plasmatique aboutissant au développement de l'athérosclérose et à l'apparition des complications cardiovasculaires.

4. Diagnostic de l'ADH

Bien que l'HF constitue l'une des maladies génétiques les plus fréquentes, elle est toujours sous-diagnostiquée. Selon les estimations actuelles, plus de 90 % des personnes atteintes d'HF dans le monde ne sont pas diagnostiquées (Sturm et al., 2018). Ceci représente un problème mondial de santé publique en raison de l'incidence élevée de MCV prématurées (avant 55 ans chez les hommes et avant 65 ans chez les femmes) et de la réduction de l'espérance de vie observée dans de nombreuses familles. D'où l'importance du diagnostic précoce des sujets

atteints et de leurs proches afin de prévenir les complications cardiovasculaires prématurées (Civeira & International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia, 2004).

Historiquement, l'ADH à l'état hétérozygote était diagnostiquée cliniquement et les cas qui présentaient des élévations des taux plasmatiques du LDL-C, des MCV prématurées et familiales et des xanthomes tendineux ont été détectés. Toutefois, avec la meilleure compréhension de la base moléculaire de cette maladie, la recherche des mutations dans les gènes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE* et *LDLRAP1* est maintenant disponible dans de nombreux pays facilitant ainsi le diagnostic (Nordestgaard et al., 2013). Dans tous les cas, le diagnostic de l'HF est basé sur cinq critères (Nordestgaard et al., 2013):

- histoire familiale d'hypercholestérolémie,
- antécédents d'accident vasculaire précoce familial,
- examen physique permettant de détecter des xanthomes et un arc cornéen,
- taux de LDL-C très élevés lors de mesures répétées,
- présence d'une mutation causale détectée par génétique moléculaire

4.1 Diagnostic clinique

Une HF est cliniquement suspectée lorsque les taux de LDL-C sont supérieurs à 4,9 mmol/l (190 mg/dl) chez les adultes ou 4,1 mmol/l (160 mg/dl) chez les enfants (y compris les adolescents jusqu'à 18 ans). Elle doit être également suspectée lorsque les taux de cholestérol total ou de LDL-C dépassent le 95^{ème} percentile du pays pour le sexe et l'âge (Defesche et al., 2017).

L'HF se caractérise sur le plan physique par des xanthomes tendineux (dépôts de cholestérol sur les tendons), par des xanthélasmas et des arcs cornéens qui apparaissent avant l'âge de 45 ans. Les xanthomes des tendons extenseurs des doigts peuvent apparaître sur les dos des mains ainsi que sur les tendons d'Achille (**Figure 2**). Cependant, ces signes sont généralement manqués ou recherchés rétrospectivement une fois qu'une élévation du taux plasmatique de LDL-C a été détectée (Defesche et al., 2017).

Il est intéressant de noter que le diagnostic est presque certain si des xanthomes tendineux sont présents, mais ceux-ci ne sont trouvés que dans près de 15% des populations avec des défauts moléculaires identifiés (Nordestgaard et al., 2013). Les xanthélasmas et les arcs cornéens ne sont pas pathognomoniques de l'HF car ils peuvent être présents chez des

personnes ayant des profils lipidiques normaux. Cependant, s'ils sont présents chez des individus âgés de moins de 45 ans, ces signes sont fortement évocateurs de la maladie (Defesche et al., 2017).

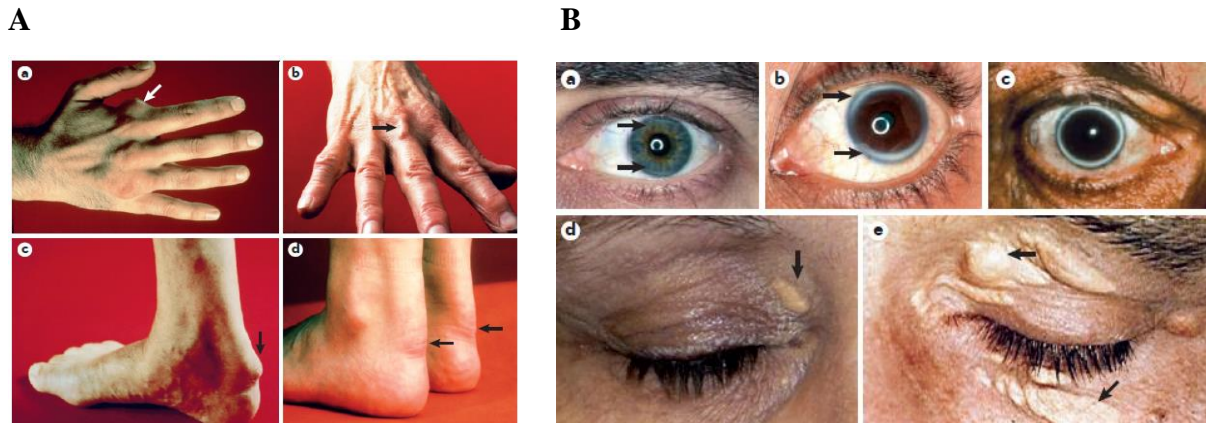


Figure 2 : Caractéristiques cliniques extravasculaires de l'HF (Defesche et al., 2017)

A. Xanthomes tendineux sur les mains et sur les tendons d'Achilles chez des patients atteints d'HF à l'état hétérozygote. L'étendue des xanthomes (indiqués par des flèches blanches) peut aller de sévère (partie a) à légère (partie b) et palpable mais non visible (non montré). Les xanthomes sur le tendon d'Achille peuvent être très évidents (partie c) ou se présenter comme un élargissement général du tendon dans son ensemble (partie d). **B. Arc cornéens et xanthélasmas des patients atteints d'HF à l'état hétérozygote.** L'arc cornéen est formé par un dépôt de lipides dans la cornée. Ce dépôt commence par une structure en forme de faucille en bas ou en haut de la cornée (partie a, flèches noires) et s'étend au fil des années (partie b, flèches noires), pour finalement couvrir l'ensemble de la cornée (partie c). Ces dépôts n'ont aucune conséquence sur la vision. Les xanthélasmas (dépôts de lipides sur les paupières supérieures et inférieures) s'aggravent également avec l'âge. Ils peuvent être modestes à un âge plus jeune, à partir de la troisième décennie de vie (partie d, flèche noire) et deviennent plus prononcés à mesure que le patient vieillit (partie e, flèches noires).

4.1.1 Protocoles de diagnostic de l'HF

Afin d'augmenter la spécificité du diagnostic de l'HF, différents protocoles qui intègrent des paramètres cliniques, biologiques et génétiques ont été développés.

Actuellement trois protocoles existent pour poser un diagnostic formel de l'HF chez les sujets atteints (**Tableau 2**) :

- Dutch Lipid Clinic Network (DLCN)
- UK Simon Broome Register (SBR)
- US Make Early Diagnosis to Prevent Early Death (MEDPED) Program

Le DLCN et le SBR sont largement utilisés dans le diagnostic des patients adultes HF et ont été recommandés dans plusieurs directives. Le programme MEDPED a été mis en place pour être utilisé dans le diagnostic des populations occidentales (Watts et al., 2020).

Le diagnostic clinique est basé sur la combinaison de divers critères : les taux de LDL-C, les dépôts anormaux de cholestérol dans les tissus extravasculaires et la présence d'une histoire de maladie coronarienne prématurée chez le patient ou chez des membres de sa famille. Certains protocoles de diagnostic incluent également des tests génétiques moléculaires pour la recherche des mutations dans les gènes impliqués dans l'HF (Cartier & Goldberg, 2016).

Dans la classification du SBR et dans le score calculé par le DLCN, les individus peuvent être classés comme ayant une HF « certaine », « probable » ou « possible » (Defesche et al., 2017; Umans-Eckenhuisen et al., 2001). Les critères de l'outil de diagnostic DLCN ont été adoptés par l'European Atherosclerosis Society (EAS) afin de diagnostiquer les sujets atteints. Parmi les personnes ayant un diagnostic « certain » ou « probable » d'HF (DLCN supérieur à 5), et en particulier celles ayant un diagnostic clinique évident de xanthome et/ou des taux élevés de cholestérol ainsi que des antécédents familiaux de coronaropathies prématurées, il est fortement recommandé d'effectuer un test génétique. Lorsqu'une mutation causale est retrouvée chez le cas index, un test génétique doit être proposé à tous les parents du premier degré (Defesche et al., 2017).

Tableau 2 : Comparaison entre les différentes stratégies de diagnostic de l'HF (modifié (Berberich & Hegele, 2019))

Critères	Simone Broome Register	Dutch Lipid Clinic Network	MEDPED ^a
<i>Lipides</i>			
Cholestérol total (mmol/l)	<ul style="list-style-type: none"> • > 7,5 (adulte) [a] • > 6,7 (enfant) [a] 	NA	NA
LDL cholestérol (mmol/l)	<ul style="list-style-type: none"> • > 4,9 (adulte) [a] • > 4,0 (enfant) [a] 	<ul style="list-style-type: none"> • > 8,5 [8] • 6,5 - 8,4 [5] • 5,0 - 6,4 [3] • 4,0 - 4,9 [1] 	> 5,7 - 9,3 ^b
<i>Examen physique</i>			
Personnel	Xanthomes tendineux [b]	<ul style="list-style-type: none"> • Xanthomes tendineux [6] • Arcs cornéens ^c [4] 	NA
Familial	Xanthomes tendineux chez un apparenté [b]	Xanthomes tendineux ou arcs cornéens [2]	NA
<i>Histoire familiale</i>			

Maladie coronarienne	Antécédents familiaux d'infarctus du myocarde avant l'âge de 50 ans chez deux apparentés ou chez un apparenté de plus que 60 ans [d]	<ul style="list-style-type: none"> • Patient atteint d'une maladie coronarienne prématurée^d [2] • Patient atteint de maladie cérébrale ou vasculaire prématurée^d [1] 	NA
LDL cholestérol (mmol/l)	> 7,5 chez un ou deux apparentés [e]	Enfant avec un taux de LDL-C \geq au 95 ^{ème} percentile [2]	NA
Génétique	NA	NA	HF connue chez un apparenté
Génétique			
Analyse de l'ADN	Mutation du <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ou <i>PCSK9</i> [c]	Mutation du <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ou <i>PCSK9</i> [8]	NA
Diagnostic			
Diagnostic de l'HF	<ul style="list-style-type: none"> • HF certaine (definite) : a + (b ou c) • HF possible (probable) : (a+d) ou (a+e) 	<ul style="list-style-type: none"> • Certaine : > 8 • Probable : 6 - 8 • Possible : 3 - 5 	Valeurs seuils du LDL-C ajustées

NA : non applicable

^a nécessité d'un diagnostic de l'HF d'un membre de la famille; ^b le seuil « cut off point » basé sur l'âge et le degré d'apparenté; ^c arc cornéen lorsque l'âge est inférieur à 45 ans ; ^d âge inférieur à 55 ans chez les hommes et inférieur à 60 ans chez les femmes.

Avant que le diagnostic de l'HF puisse être confirmé, il est important d'exclure les causes secondaires possibles de la dyslipidémie telles que l'hypothyroïdie, le syndrome néphrotique, les maladies obstructives du foie et les régimes riches en graisses saturées et aliments riches en cholestérol (Defesche et al., 2017).

4.2 Diagnostic génétique

Bien que le diagnostic de l'HF puisse être posé sur une base clinique, le DLCN et le SBR, comme mentionné dans le paragraphe 4.1.1, incluent dans leurs critères la composante génétique comme une approche pour établir le diagnostic définitif de l'HF. L'identification des variants dans les gènes connus associés à l'HF (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, et *APOE*) permet d'obtenir le plus grand nombre de points vers un diagnostic définitif de l'HF dans le score de DLCN (Defesche et al., 2017).

L'utilisation des outils de diagnostic reposant sur la présence de signes physiques, de maladies coronariennes prématurées et d'antécédents familiaux limite l'efficacité du diagnostic et l'objectif d'identifier tous les patients atteints d'HF car bien que ces outils aient une spécificité élevée, leur sensibilité est faible. Ceci montre l'importance du dépistage génétique qui permet de dépasser ces limites (Sturm et al., 2018).

Le dépistage génétique chez les patients suspectés d'être atteints d'HF devrait, au minimum, inclure une analyse des gènes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*. Cette analyse devrait inclure, pour les gènes *LDLR*, *PCSK9* et *APOE*, le séquençage de tous les exons et des jonctions exon/intron, ainsi que l'analyse de remaniements majeurs du *LDLR*. Pour le gène *APOB*, il suffit de séquencer dans la plupart des cas la région de liaison au LDLr située aux résidus 3386-3396 (Sturm et al., 2018), cependant il est important de garder à l'esprit que certaines mutations hypercholestérolémiantes ont été décrites en dehors de cette région (Elbitar et al., 2018).

Les coûts du dépistage génétique continuent de diminuer avec le temps, en partie grâce à l'utilisation des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). La plupart des laboratoires proposent des panels NGS comprenant le séquençage des gènes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*, ainsi que l'analyse de remaniements majeurs du *LDLR*. Il existe également des panels de gènes plus vastes et plus complets qui permettent d'évaluer non seulement les principaux gènes de l'HF, mais aussi les gènes responsables des phénotypes comparables. Ces panels élargis doivent être envisagés pour améliorer le diagnostic des patients atteints de ces phénocopies qui peuvent nécessiter des thérapies spécifiques, et ils devraient inclure les gènes suivants : *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *ABCG5*, et *ABCG8*. (**Figure 3**) (Sturm et al., 2018).

Les tests génétiques offrent une occasion unique d'identifier les personnes qui présentent un risque significativement plus élevé que la population générale de développer une maladie coronarienne pour un taux de LDL-C donné (Sturm et al., 2018).

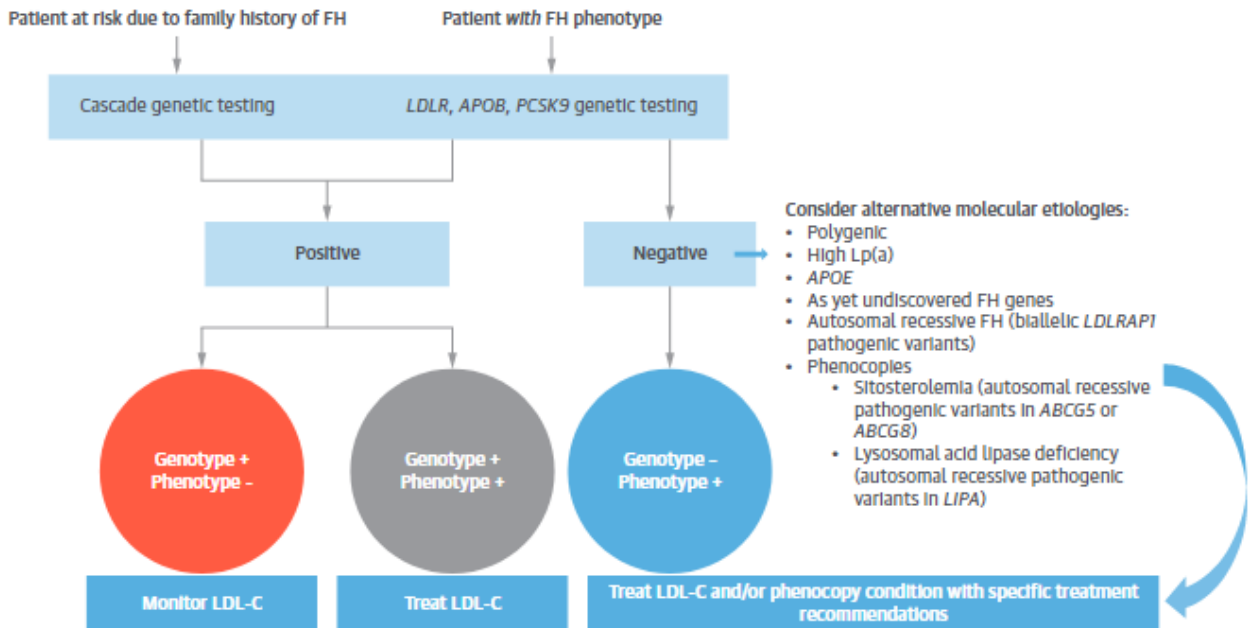


Figure 3 : Différentes catégories de patients peuvent se soumettre à un test génétique de l’HF (Sturm et al., 2018)

Les personnes à risque en raison d'antécédents familiaux ainsi que les personnes présentant un phénotype HF peuvent subir un test génétique. Les résultats du test génétique peuvent donner lieu à 3 catégories d'individus : 1) génotype positif, phénotype négatif (rond rouge), 2) génotype positif, phénotype positif (rond gris) et 3) génotype négatif, phénotype positif (rond bleu). Ceci permet de déterminer les actions à prendre : surveiller le LDL-C ou traiter l’HF. Dans certains cas, des étiologies moléculaires alternatives doivent être explorées.

5. La génétique de l’HF

Parmi les quatre gènes principaux responsables de l’ADH (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*), les mutations dans le gène *LDLR* sont les plus fréquentes. En effet, plus que 80 à 85% des mutations causant l’ADH sont localisées dans le gène *LDLR*, 5 à 10% dans le gène de l’*APOB*, 2% des cas dans *PCSK9* et 1% des cas dans *APOE* (Abou Khalil et al., 2022; Sturm et al., 2018).

Bien que plus de 2 000 variants aient été signalés chez des patients atteints d’ADH, moins de 10 % d'entre eux ont été validés comme pathogènes par des tests fonctionnels complets *in vitro* (Chora et al., 2018).

Les différents gènes impliqués dans l’HF sont représentés dans le **tableau 3** et seront détaillés dans les paragraphes qui suivent.

Tableau 3 : Gènes associés avec l'HF (adapté (Defesche et al., 2017))

Gène	Protéine	Position chromosomique (nombre d'exons)	Numéro(s) MIM	Commentaires
Mode autosomique dominant (ADH)				
LDLR	Récepteur des LDL	19p13.2 (18)	143890, 606945	Cause la plus fréquente de l'HF
APOB	Apolipoprotéine B100 (apoB100)	2p24.1 (29)	144010, 107730	<ul style="list-style-type: none"> • Mutations généralement associées à un phénotype moins grave que les mutations du <i>LDLR</i>. • Mutations fréquentes dans certaines populations. • La variation la plus courante est la p.(Arg3527Gln).
PCSK9	Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9	1p32.3 (12)	603776, 607786	Les mutations « gain de fonction » provoquent une HF, tandis que les mutations « perte de fonction » causent une hypocholestérolémie.
APOE	Apolipoprotéine E (apoE)	19q13.32 (6)	107741	<ul style="list-style-type: none"> • Une délétion de Leu167 a été détectée chez des patients présentant un phénotype d'HF. • 26 nouveaux variants de l'<i>APOE</i> ont été détectés chez 5743 proposants présentant un phénotype d'HF et recrutés par le réseau national français (Abou Khalil et al., 2022).
Mode autosomique récessif				
LDLRAP1	Protéine adaptatrice 1 du récepteur des LDL	1p36.11 (15)	603813, 605747	Les individus porteurs de deux mutations présentent une hypercholestérolémie autosomique récessive et ont souvent un phénotype moins sévère que les individus porteurs de deux mutations du <i>LDLR</i> . Les parents hétérozygotes du cas index ne présentent souvent aucun phénotype lipidique évident.
ABCG 5	Stéroline 1	2p21 (15)	210250, 605459	Les mutations provoquent une sitostérolémie. Des mutations hétérozygotes composites ont été observées chez un enfant présentant une hypercholestérolémie sévère.
ABCG 8	Stéroline 2	2p21 (14)		
LIPA	Lipase acide lysosomale	10q23.31 (10)	278000, 613497	Des mutations provoquent une maladie de stockage des esters de cholestérol (maladie de Wolman).

				<p>Des mutations hétérozygotes ont été retrouvées chez des patients diagnostiqués cliniquement avec un phénotype de type HF (Sjouke, Defesche, Randamie, et al., 2016).</p> <p>Une mutation homozygote qui affecte le site d'épissage peut produire un phénotype de type HF (Bychkov et al., 2019).</p>
--	--	--	--	---

5.1 Le gène *LDLR*

5.1.1 Définition et Identification

Le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLr) est une glycoprotéine de la surface cellulaire qui joue un rôle essentiel dans le contrôle homéostatique du cholestérol sanguin en intervenant sur l'élimination des particules lipoprotéiques contenant du cholestérol de la circulation (Jeon & Blacklow, 2005).

C'est en 1972 que le travail de Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein a été démarré chez des sujets ayant des taux élevés de cholestérol sanguin et prédisposés à des maladies cardiaques prématurées dans le but de comprendre les mécanismes responsables de l'ADH. A l'époque, Khachadurian avait déjà démontré en 1964 que l'ADH existait cliniquement sous une forme sévère, homozygote, et sous une forme moins sévère, hétérozygote (Khachadurian, 1964).

L'approche de Brown et Goldstein consistait à appliquer les techniques de la culture cellulaire pour identifier le défaut génétique de l'ADH. Dans un premier temps, ils ont étudié l'activité de l'enzyme limitant la synthèse du cholestérol, l'HMG CoA réductase, en comparant des fibroblastes dermiques prélevés des individus normaux à des fibroblastes des patients ADH. Quand les fibroblastes humains normaux ont été traités avec du sérum contenant des faibles concentrations de LDL, ils ont observé immédiatement une régulation par rétrocontrôle négatif sur l'HMG CoA réductase. En revanche, les fibroblastes des patients ADH ne supprimaient pas cette synthèse endogène du cholestérol en présence de LDL. Le fait que la suppression de l'HMG CoA réductase soit spécifique des LDL et l'observation que de très faibles concentrations de LDL pouvaient réprimer l'activité enzymatique leur a laissé déduire qu'un récepteur de forte affinité est responsable de la suppression de la synthèse du cholestérol (Brown & Goldstein, 1986).

L'existence du récepteur des LDL a été formellement démontrée en 1974 lorsqu'ils ont radio marqué les LDL avec de l'iode 125 et ont montré que les cellules normales ont des sites de liaison de haute affinité pour le 125I-LDL contrairement aux cellules homozygotes des patients ADH (Brown & Goldstein, 1986).

5.1.2 Structure génique et protéique

Le gène *LDLR* est situé sur le bras court du chromosome 19 (19p13.1-13.3) et s'étend sur environ 48 kb et est formé de 18 exons et 17 introns (Hobbs et al., 1992).

Le LDLr est une protéine de 839 acides aminés ayant un poids moléculaire de 160 KDa. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Le LDLr est par la suite glycosylé dans l'appareil de golgi où il devient mature (Hobbs et al., 1992).

Le LDLr est organisé en six domaines fonctionnellement distincts (**Figure 4**) (Brown & Goldstein, 1986; Galicia-Garcia et al., 2020):

- Le peptide signal formé de 21 acides aminés et codé par l'exon 1
- Le domaine de liaison au ligand (LDL) situé en N-terminal. Il est formé de 292 acides aminés et codé par les exons 2 à 6
- Le domaine homologue au précurseur de l'EGF « Epidermal Growth Factor » constitué de près de 400 acides aminés. Cette partie du récepteur se compose de deux séquences de répétitions EGF-like A et B, suivi d'un domaine YWTD (nommé d'après les résidus conservés tyrosine, tryptophane, thréonine et aspartate) appelés β -propeller et d'une troisième séquence de répétition EGF-like C. Ces domaines sont nécessaires à la dissociation des ligands du récepteur dans les endosomes à pH acide ainsi qu'au recyclage du récepteur
- La partie glycosylée formée de près de 58 acides aminés et codées par l'exon 15 où s'accrochent les chaînes d'oligosaccharides
- Le domaine transmembranaire formé de près de 22 acides aminés et codé par l'exon 16 et une partie de l'exon 17. C'est une région faiblement conservée entre les espèces
- Le domaine cytosolique C-terminal qui contient une séquence NPxY qui dirige le récepteur vers les puits à clathrine. Elle est formée de près de 50 acides aminés et codée par le reste de l'exon 17 et une partie de l'exon 18

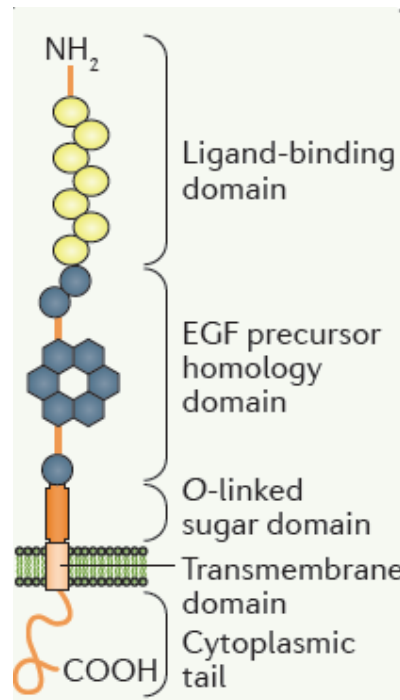


Figure 4 : Illustration schématique du récepteur des LDL et de ses différents domaines (adaptée (Defesche et al., 2017))

5.1.3 Mécanisme d'action

Le récepteur des LDL est exprimé de manière ubiquitaire (Go & Mani, 2012). Son ligand physiologique le plus important est la particule LDL qui contient une seule apolipoprotéine, l'apoB100. Il est également capable de se lier à l'apoE qui est retrouvée dans les IDL, VLDL et HDL (Jeon & Blacklow, 2005).

Le domaine de liaison des LDL du récepteur contient sept motifs répétés de 40 acides aminés contenant chacun six résidus de cystéine reliés par un pont disulfure (Hussain et al., 1999). Après la liaison, le complexe récepteur-ligand entre dans les cellules par un mécanisme d'endocytose via les puits à clathrine en présence de la protéine adaptatrice ARH. Les complexes sont ensuite acheminés vers les endosomes, où le pH acide déclenche la dissociation du ligand de son récepteur. Ce dernier est ensuite recyclé à la surface cellulaire où il lie une nouvelle lipoprotéine (Jeon & Blacklow, 2005). Le récepteur des LDL est recyclé près de 150 fois. Quant à la particule LDL, elle sera dégradée dans le lysosome par les hydrolases acides libérant des acides aminés et du cholestérol. Ce dernier 1) inhibe l'expression du gène *HMGCR* (codant la HMGCoA réductase) supprimant ainsi la biosynthèse de cholestérol, 2) augmente

l'activité de l'ACAT pour réduire le taux de cholestérol libre toxique, 3) inhibe l'expression du gène *LDLR* réduisant ainsi l'internalisation des LDL (Brown & Goldstein, 1986; Go & Mani, 2012; Marais, 2004) (**Figure 5**) (Go & Mani, 2012).

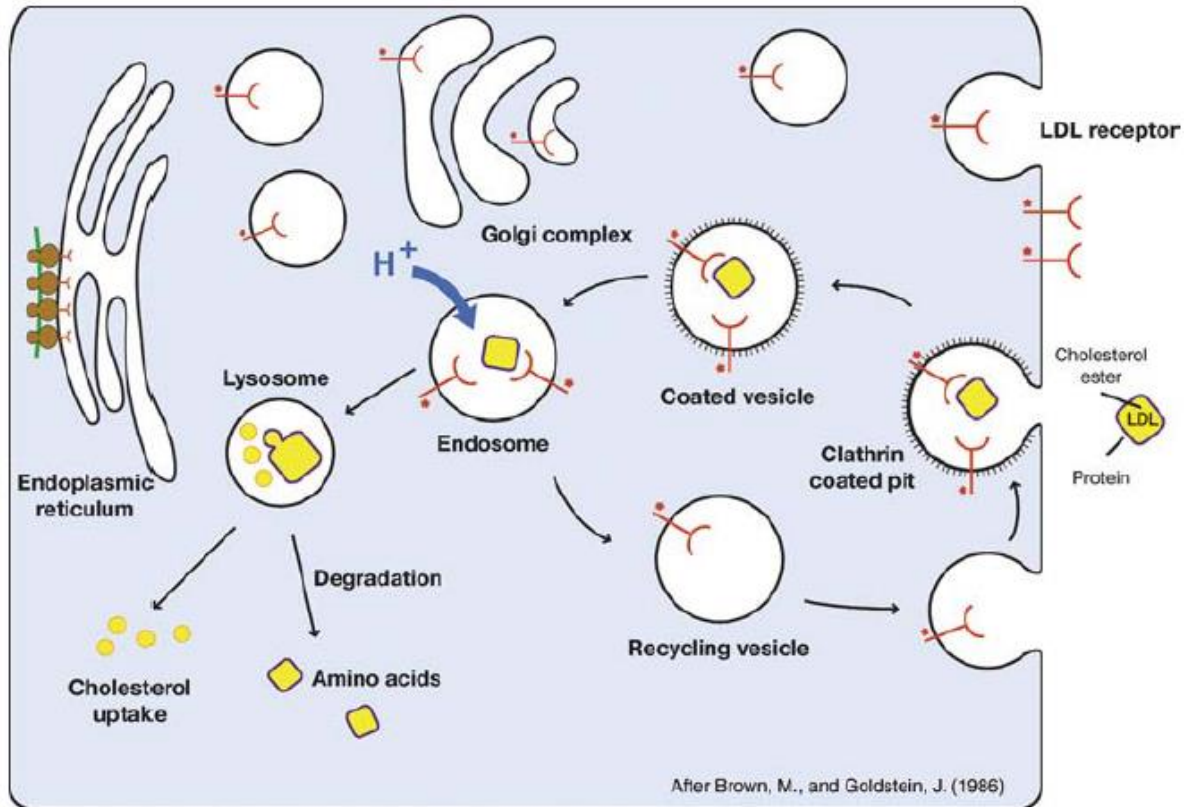


Figure 5 : Mécanisme d'action du récepteur des LDL (Jeon & Blacklow, 2005)

L'entrée du complexe récepteur-ligand dans les cellules se fait via les puits à clathrine. Le complexe est ensuite acheminé vers l'endosome où le pH acide entraîne la dissociation du complexe. Le récepteur est ensuite renvoyé à la surface de la cellule dans un processus appelé « recyclage des récepteurs ».

5.1.4 Les mutations du *LDLR*

Les mutations du gène *LDLR* sont responsables de 80 à 85% des cas d'ADH. Jusqu'à présent plus de 2000 mutations rares du *LDLR* ont été identifiées et environ 3500 variants sont décrits dans la base ClinVAR (Berberich & Hegele, 2019). Ces variations comprennent :

- Les variations de nombre de copies du gène (Copy Number Variations « CNVs ») qui constituent 8 à 10% des variants rapportés. Les CNVs sont une forme de réarrangement structural qui comprend des délétions, des duplications et des

réarrangements de l'ADN d'une taille supérieure ou égale à 50 paires de base (Bourbon et al., 2017; Iacocca & Hegele, 2018).

- Les mutations non-sens dans la région codante (12 à 15%) (Defesche et al., 2017).
- Les petites insertions ou délétions dans ou à proximité de la région codante et qui peuvent décaler le cadre de lecture (15 à 20%) (Defesche et al., 2017).
- Les mutations qui altèrent le site d'épissage du *LDLR*, se produisant dans des régions non codantes ou des jonctions intron-exon (8 à 10%) (Defesche et al., 2017).
- Les mutations faux sens (40 à 50%) qui modifient un seul résidu d'acide aminé (Bourbon et al., 2017).

5.1.4.1 Classification des mutations du *LDLR*

Les mutations du *LDLR* peuvent affecter toutes les étapes de l'endocytose des particules de LDL médiée par le récepteur et peuvent être classées en six classes fonctionnelles en se basant sur la présence de l'ARNm et sur les caractéristiques fonctionnelles du récepteur synthétisé (Berberich & Hegele, 2019):

- Classe 1 : absence de synthèse du récepteur (allèle nul)
- Classe 2 : libération défectueuse du récepteur du RE (allèle avec défaut de transport). Il y aura une perturbation dans le transport du récepteur vers la surface cellulaire
- Classe 3 : liaison anormale à l'apoB (allèle avec défaut de liaison au ligand)
- Classe 4 : regroupement défectueux des puits de clathrine et de l'internalisation du récepteur (allèle avec défaut d'internalisation)
- Classe 5 : recyclage défectueux (allèle avec défaut de recyclage). Le récepteur est incapable de se dissocier de son ligand au pH acide du lysosome.
- Classe 6 : défaut du ciblage initial du récepteur vers la membrane basolatérale de la cellule.

Ces différentes classes hétérogènes des mutations du *LDLR* peuvent être regroupées en deux catégories (Defesche et al., 2017):

- Les mutations qui entraînent soit l'absence de la synthèse du récepteur, soit la synthèse d'un LDLr totalement non fonctionnel (mutations nulles)
- Les mutations qui entraînent la synthèse d'une certaine quantité d'un LDLr partiellement fonctionnel (mutations défectueuses du récepteur).

Les mutations les plus graves sont celles qui altèrent l'expression et la synthèse des protéines (par exemple, la présence d'un codon stop prématuré ou la présence d'une mutation du promoteur) et également les grands réarrangements, car aucune protéine fonctionnelle n'est produite à partir de ces allèles (allèle nul) et se caractérise par des taux plasmatiques de LDL-C élevés. En outre, un certain nombre de mutations faux-sens ont une activité du récepteur inférieure à 2 % dans les essais *in vitro* et sont donc classées comme allèles nuls. En général, les sujets porteurs des mutations moins pathogènes (les mutations faux-sens et les insertions ou délétions sans décalage du cadre de lecture) ont des taux de LDL-C moins élevés (Bourbon et al., 2017; Defesche et al., 2017).

5.2 Le gène *APOB*

5.2.1 Définition et Identification

L'apolipoprotéine B (apoB) est une grande glycoprotéine amphipathique qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme (Hooper et al., 2005).

L'apoB-100 est synthétisée par le foie et constitue un composant structurel essentiel des VLDL et de leurs produits métaboliques, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les LDL ainsi que la lipoprotéine (a) (Lp(a)) (Whitfield et al., 2004). Une forme tronquée de l'apoB-100 existe également. C'est l'apoB-48 qui est produite en phase post-prandiale par l'intestin grêle et joue un rôle essentiel dans la synthèse des chylomicrons (Whitfield et al., 2004)

Au milieu des années 1980, Grundy et al. ont montré que le métabolisme des LDL est réduit chez certains patients hypercholestérolémiques qui ne présentent pas les caractéristiques d'une ADH hétérozygote (Vega & Grundy, 1986). En 1987, Innerarity et al. ont démontré, à l'aide d'un test de liaison *in vitro*, la capacité réduite des LDL des patients présentant une hypercholestérolémie modérée à se lier aux récepteurs de LDL présents à la surface des fibroblastes humains normaux. Ils suggèrent ainsi que la liaison déficiente au récepteur est probablement due à une variation structurelle de l'apoB-100, vue que la liaison des LDL au récepteur est médiée par l'apoB-100. Ce défaut de liaison entraîne une hypercholestérolémie modérée qui a été désignée comme déficit familial en apoB100 « familial defective apolipoprotein B100 » (Innerarity et al., 1990).

5.2.2 Structure génique et protéique

Le gène *APOB* est localisé sur le bras court du chromosome 2 en 2p24.1 et est formé de 28 introns et 29 exons s'étendant sur 43 kb (Innerarity et al., 1990). L'exon 26, de 7572 pb, est un des plus grands exons du génome humain et code plus de la moitié de l'apoB100 (Whitfield et al., 2004).

Le gène *APOB* code les deux formes de l'apoB : l'apoB-48 et l'apoB-100 et cela par un mécanisme d'édition post-transcriptionnelle de l'ARNm (Whitfield et al., 2004). L'apoB est synthétisée sous forme d'un précurseur avec un peptide signal de 27 acides aminés. Le clivage de ce dernier aboutit à la production, par le foie, d'une protéine mature, l'apoB-100, de 550 kDa, formée de 4563 acides aminés. L'apoB-100 est sécrétée avec les VLDL qui sont métabolisées dans la circulation en LDL. Cette forme complète de l'apoB contient le domaine de liaison au LDLr ce qui permet l'élimination des LDL du plasma via le LDLr hépatique (Welty et al., 1999). L'apoB-48 est produite dans l'intestin suite à la présence d'un codon stop prématuré sur le codon 2153 de l'apoB-100 qui est dû à un traitement de l'ARNm spécifique au tissu (Welty et al., 1999). Elle a un poids de 265 kDa et est formée de 2152 acides aminés. Cette forme tronquée de l'apoB est identique à la région N-terminale de l'apoB-100 (représentant 48% de l'apoB-100) mais ne possède pas la région C-terminale de l'apoB-100 qui se lie au récepteur des LDL (Whitfield et al., 2004). L'apoB-48 est sécrétée avec les chylomicrons (Welty et al., 1999). L'apoB-100 contient donc le domaine de liaison aux récepteurs des LDL qui est responsable de la clairance des LDL ainsi que des VLDL et des IDL du plasma par le foie (Whitfield et al., 2004). Le domaine de liaison aux récepteurs des LDL est localisé dans le domaine C-terminal de l'apoB-100, plus précisément aux résidus 3386 - 3396 (anciennement connus par 3359 - 3369) (site B). Ce domaine est formé de résidus chargés positivement qui peuvent interagir avec les régions chargées négativement du récepteur des LDL (Vrablík et al., 2001).

5.2.3 Fonction de l'apoB

L'apoB-100 contrôle les taux plasmatiques du LDL-C en assurant l'interaction entre les particules LDL et leur récepteur hépatique entraînant ainsi leur élimination plasmatique. De plus, l'apoB-100 est indispensable pour la synthèse, l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines hépatiques riches en triglycérides. De plus, elle est capable de se lier aux lipides et est un composé essentiel des VLDL et des LDL. Finalement, elle est capable de se lier à

l'héparine et à une variété de protéoglycanes retrouvées dans la paroi artérielle ce qui explique en partie l'athérogénicité des particules LDL (Innerarity et al., 1990). En effet, l'apoB se lie de façon non covalente aux glycosaminoglycanes, par interaction des charges positives (cationiques) qu'elle porte et les charges négatives (anioniques) portées par les glycosaminoglycanes tissulaires sécrétées par les CMLv de la paroi des artères. Ces interactions sont principalement responsables de la clairance des LDL par la paroi des artères, leur rétention dans la paroi et leur endocytose par les CML (Nakashima et al., 2007).

Notons que, contrairement aux autres apolipoprotéines, l'apoB-100 ne peut pas s'échanger entre les lipoprotéines et possède une structure hélicoïdale amphipathique limitée (Innerarity et al., 1990).

5.2.4 Mutations de l'*APOB*

Les mutations du gène *APOB* localisées dans la séquence codant le domaine de liaison au LDLr (résidus 3386-3396) sont à l'origine d'un type d'hypercholestérolémie appelé déficit familial en apoB-100 ou FDB (OMIM #144010) (Andersen et al., 2016). Parmi les patients atteints d'ADH, 5 à 10% sont porteurs de mutations du gène *APOB*. Ces sujets ont généralement un phénotype moins grave que ceux porteurs de mutations du *LDLR*. Les mutations du gène *APOB* sont fréquentes en Europe centrale par rapport à d'autres régions (Defesche et al., 2017).

La première mutation responsable de la FDB a été identifiée en 1987 par Innerarity et al. Il s'agit de la p.(Arg3527Gln) également connue sous APOB3527 ou APOB3500, que l'on retrouve principalement chez les Européens du Nord et qui est responsable de la grande majorité des cas de FDB (plus de 95% des cas) (Hopkins et al., 2015; Innerarity et al., 1990). Une autre mutation à la même position où une arginine est substituée par un tryptophane (p.(Arg3527Trp)), a également été décrite et est fréquente chez les patients hyperlipidémiques d'ascendance chinoise (Whitfield et al., 2004). Une troisième mutation en position 3527 a été retrouvée dans les Pays-Bas. Il s'agit de la p.(Arg3527Leu) qui consiste en la substitution de l'arginine par une leucine. Ainsi cette région de l'*APOB* est considérée comme un « hotspot » pour les mutations bien que l'apoB-100 soit une large protéine de 500 KDa (Andersen et al., 2016).

Malgré l'identification de plusieurs autres mutations associées à l'hypercholestérolémie dans le gène *APOB*, les mutations p.(Arg3527Gln) et p.(Arg3527Trp) restent les mutations les

plus fréquemment responsables de la FDB (Andersen et al., 2016). Boren et al ont montré que l'arginine en position 3527 (ou connue aussi en position 3500) interagit avec le tryptophane en position 4369 et que cette interaction est essentielle pour la bonne conformation de la queue C-terminale de l'apoB-100 (Borén et al., 2001). Ces mutations du résidu 3527 modifient un acide aminé crucial ce qui entraîne la perturbation de cette interaction et conduit à un changement de conformation, une perturbation de la liaison avec le récepteur et le trouble clinique FDB (**Figure 6**) (Borén et al., 2001). Presque tous les individus porteurs de la mutation p.(Arg3527Gln) sont d'origine Européenne et ont tous le même haplotype, ce qui suggère que tous les patients FDB ont un ancêtre commun (Myant et al., 1997). Cette mutation est prédominante dans les populations d'Europe centrale au nord des Alpes et des Pyrénées mais aussi dans les populations d'Amérique du Nord et en Australie colonisées par les Européens ce qui suggère son origine d'Europe centrale (Miserez & Muller, 2000). La fréquence la plus élevée de porteurs en Europe a été identifiée en Suisse alémanique et la fréquence la plus élevée au niveau mondial se trouve dans la population Amish où 12 % des personnes sont porteuses de la mutation (Shen et al., 2010). En outre, une étude a estimé l'âge de la mutation à l'aide d'une approche combinée de génétique moléculaire et des populations à environ 6000-7000 ans (Miserez & Muller, 2000).

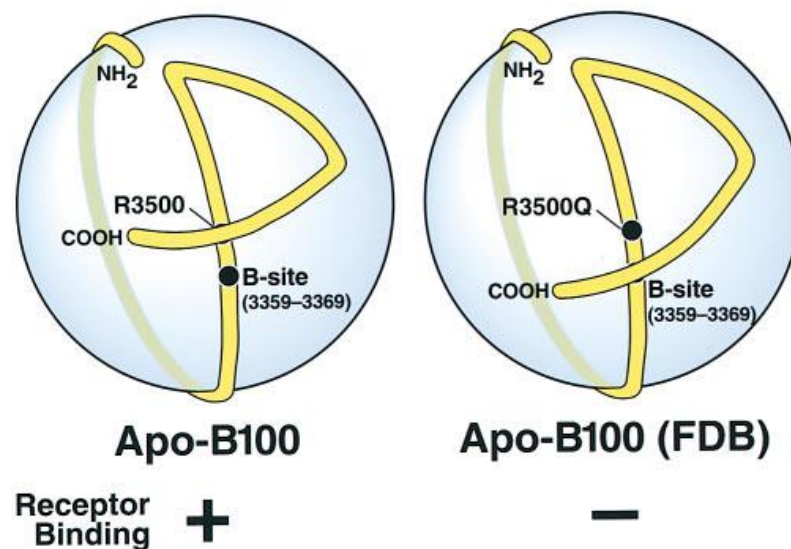


Figure 6 : Structure de l'apoB 100 (Boren et al., 1998)

Dans des situations normales, l'arginine en position 3500 interagit avec la région C terminale et laisse le site B (3359-3369) de l'apoB accessible pour la liaison au récepteur des LDL. Dans une situation pathologique tel que le cas de la FDB, l'apoB est mutée et l'arginine en position 3500 est modifiée, le site B sera masqué. Ceci empêche la liaison avec le récepteur des LDL et conduit à une augmentation des taux plasmatiques de LDL-C.

5.3 Le gène *APOE*

5.3.1 Définition

L'apoE est une apolipoprotéine majeure qui contrôle le métabolisme des lipoprotéines. L'apoE est exprimée dans de nombreuses cellules et organes, mais elle est surtout retrouvée dans le foie et dans le système nerveux central. Elle est également exprimée dans les macrophages, les adipocytes, la rate, les poumons, les reins, les ovaires, les nerfs périphériques et les muscles (Marais, 2019). Sa production généralisée révèle son importance dans diverses voies telles que le métabolisme des lipoprotéines, des vitamines liposolubles et du glucose, la transduction du signal, les métastases ou l'angiogenèse (Khalil et al., 2021).

L'apoE est un composant des chylomicrons, des VLDL, des IDL, des LDL, des HDL et de la lp(a). L'apoE est un ligand du récepteur scavenger B de type 1 (SR-B1) et de tous les membres de la famille des récepteurs des LDL et joue ainsi un rôle important dans la clairance des lipoprotéines et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en lipides (Marduel et al., 2013).

5.3.2 Structure génique et protéique

Le gène *APOE* est situé sur le chromosome 19 en position 19q13.32 et comprend 4 exons. Il code le précurseur de l'apoE formé de 317 acides aminés. Après le clivage du peptide signal de 18 acides aminés et la glycosylation, l'apoE mature est sécrétée sous la forme d'une protéine de 299 acides aminés ayant une masse moléculaire relative de 34 kDa (Khalil et al., 2021).

L'apoE est constituée de deux domaines : le domaine amino-terminal (résidus 18 à 209) et le domaine carboxy-terminal (résidus 243 à 247). Le site de liaison du LDLr est situé dans le domaine amino-terminal aux résidus 154 à 168. Cette région est riche en arginine et en lysine, ce qui lui permet d'acquérir des charges positives et d'interagir avec les charges négatives du site de liaison du LDLr. Le domaine carboxy-terminal constitue le site de liaison aux lipides (Koopal et al., 2017).

5.3.3 Les isoformes de l'*APOE*

Le locus du gène *APOE* comporte trois variants principaux, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, et $\epsilon 4$, qui se traduisent par trois génotypes homozygotes ($\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 3\epsilon 3$ (le plus fréquent) et $\epsilon 4\epsilon 4$) et trois hétérozygotes ($\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$ et $\epsilon 4\epsilon 2$) (Koopal et al., 2017). Les prévalences approximatives pour $E2/2$, $E2/3$, $E2/4$, $E3/3$, $E3/4$ et $E4/4$ sont de 0,4%, 6,5%, 0,9%, 75,9%, 14,3% et 2,0%, respectivement (Khalil et al., 2021).

L'apoE3 et l'apoE4 se lient avec la même affinité au récepteur des LDL, alors que la liaison de l'apoE2 est 50 à 100 fois plus faible (Marduel et al., 2013). L'apoE2 possède des cystéines aux résidus 130 et 176, apoE4 possède des arginines sur ces sites et apoE3 a une cystéine en position 130 et une arginine en position 176. Ces substitutions modifient les propriétés moléculaires des isoformes et notamment la liaison au LDLr où l'isoforme $\epsilon 2$ se lie avec une très faible affinité (Goldberg et al., 2020). En effet, la présence de la cystéine en position 158 de l'isoforme $\epsilon 2$ perturbe le pont disulfure en position 168 de la protéine mature qui est nécessaire pour la liaison de l'apoE au récepteur des LDL, ce qui explique la baisse d'affinité au LDLr (<2%) (Marduel et al., 2013). Cette baisse de l'affinité se traduit par une réduction du catabolisme des lipoprotéines contenant de l'apoE et entraîne l'accumulation des remnants des lipoprotéines dans le plasma (Cenarro et al., 2016).

Le phénotype apoE2/E2 a été associé à l'hyperlipoprotéïnémie de type III, une forme récessive d'hyperlipidémie mixte entraînant des taux élevés de cholestérol total et de TG (Goldberg et al., 2020). Plusieurs mutations rares ont été décrites comme étant associées à un mode de transmission dominant de l'hyperlipoprotéïnémie de type III, le degré de pénétrance dépendant du type de la mutation (Cenarro et al., 2016).

L'isoforme E4 est associé à des taux élevés d'apoB, de CT, de LDL-C et de remnants de cholestérol et cela est dû à l'augmentation de la production de VLDL et à l'activité lipolytique plus élevée de cet isoforme par rapport à l'E3. Ces taux élevés pourraient être expliqués aussi par le fait que les porteurs de l'isoforme E4 accélèrent l'absorption des VLDL conduisant à une régulation négative du récepteur des LDL et par conséquent à une augmentation des taux de LDL plasmatique (Khalil et al., 2021).

Outre les trois isoformes majeurs apoE2, E3 et E4, trois isoformes mineures apoE ont été observées par focalisation isoélectrique. Ce sont les isoformes E1, E5 et E7, chacun présentant plusieurs variations de leur séquence nucléotidique avec différentes substitutions d'acides aminés (Khalil et al., 2021).

5.3.4 Mutations du gène *APOE*

De rares mutations dans le gène *APOE* (**Figure 8**) ont été associées à différentes dyslipidémies telles que la dysbétalipoprotéïnémie familiale (type III) (OMIM# 617347), l'hyperlipidémie combinée familiale (type IIb) (OMIM # 144250), l'ADH (type IIa), l'hypertriglycéridémie (HTG, type IV et V), la glomérulopathie lipoprotéique (OMIM #611771), le syndrome des histiocytes bleu de mer (OMIM #269600) ou la maladie d'Alzheimer à début tardif (OMIM # 104310) (Khalil et al., 2021).

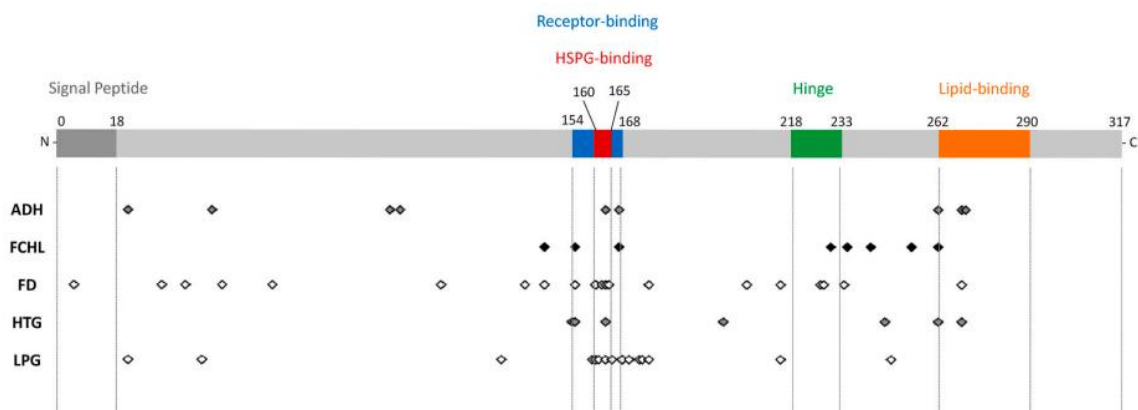


Figure 8 : Distribution des variants du gène *APOE* dans la protéine apoE (Khalil et al., 2021)

DH : Hypercholestérolémie autosomique dominante ; FCHL : Hyperlipidémie familiale combinée ; FD : Dysbétalipoprotéïnémie familiale ; HTG : Hypertriglycéridémie ; LPG : Glomérulopathie lipoprotéique

En ce qui concerne la relation entre les variants de l'*APOE* et l'ADH, deux variants qui co-ségrégent dans des familles hyperlipidémiques ont été décrits : p.(Arg163Cys) (Wintjens et al., 2016) et p.(Leu167del) (Marduel et al., 2013).

En 2013, Marduel et al. ont étudié une grande famille atteinte d'HF mais sans aucune mutation dans les gènes *LDLR/APOB/PCSK9*. Grâce à la cartographie du génome entier et à l'analyse des gènes candidats, ainsi qu'au séquençage de l'exome entier (exome sequencing), ils ont identifié la mutation p.(Leu167del) dans le gène *APOE* chez les membres affectés. Cette mutation n'a pas été retrouvée chez 220 témoins, en accord avec Faivre et al. qui avaient étudié 50 témoins français, indiquant qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme fréquent (Marduel et al., 2013).

De plus, le séquençage du gène *APOE* dans un échantillon de 153 proposants hyperlipidémiques n'ayant pas de mutations dans les gènes *LDLR/APOB/PCSK9* a révélé la

présence de deux mutations, la p.(Leu167del) et la p.(Arg269Gly) dans deux familles françaises (Marduel et al., 2013).

La mutation p.(Leu167del), anciennement appelée $\Delta L149$, est une délétion de 3 pb (sans décalage dans le cadre de lecture) qui entraîne la perte d'une leucine en position 167 dans la région de liaison au récepteur de l'apoE. Elle a été déjà associée au syndrome des histiocytes bleu de mer (splénomégalie, thrombocytopenie) chez deux proposants non apparentés présentant une légère hypertriglycémie qui s'est aggravée après une splénectomie (Nguyen et al., 2000). Elle a également été retrouvée chez 3 familles atteintes d'une hyperlipidémie familiale combinée (Solanas-Barca et al., 2012).

Quant à la p.(Arg269Gly), elle a été signalée précédemment chez un proposant présentant une hyperlipoprotéïnémie de type IIb qui se distingue de l'ADH par des taux élevés de triglycérides plasmatiques (Wardell et al., 1991). Elle n'a pas été retrouvée chez 500 témoins français et est prouvée délétère d'après les bases de données (Marduel et al., 2013).

Awan et al. ont également identifié la mutation p.(Leu167del) chez un sujet atteint d'ADH (Awan et al., 2013). Le phénotype de l'ADH relié à cette mutation est plus léger que celui associé à des mutations du *LDLR*. De plus, il n'est pas accompagné des xanthomes tendineux et a une prévalence plus faible de maladies cardiovasculaires. La fréquence de la p.(Leu167del) est de 1% dans la population espagnole alors qu'elle est absente chez 125 patients ADH d'origine européenne, ne portant pas des mutations des gènes connus (Cenarro et al., 2016; Futema et al., 2014).

Ainsi, l'identification de la mutation p.(Leu167del) comme élément causal de l'ADH dans deux familles différentes a montré que le gène *APOE* doit être pris en considération lors du diagnostic moléculaire de l'ADH. Cela est possible avec l'utilisation progressive du séquençage de nouvelle génération (NGS). D'autres études sont nécessaires pour déterminer le spectre d'implication de l'*APOE* dans divers troubles lipidiques, notamment l'ADH, afin d'améliorer le diagnostic clinique et génétique, le pronostic et la prise en charge des patients (Khalil et al., 2021).

5.4 Le gène *PCSK9*

5.4.1 Définition et Identification

Le gène *PCSK9* codant le 9^{ème} membre de la sous-famille des proprotéines convertases (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9) est le 3^{ème} gène impliqué dans l'ADH (Abifadel et al., 2003). Il était anciennement désigné NARC1 pour Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 (Seidah et al., 2003). Il a été identifié grâce à une approche de clonage positionnel dans de grandes familles françaises hypercholestérolémiques (Abifadel et al., 2003). Les proprotéines convertases sont des enzymes responsables de la maturation protéolytique de précurseurs protéiques lors de leur processus sécrétoire tels que les neuropeptides, les prohormones, les cytokines, les facteurs de croissance, les récepteurs et les protéines de surface cellulaire (Abifadel et al., 2014).

L'existence d'un grand niveau d'hétérogénéité génétique dans l'ADH et l'implication d'un troisième locus nommé HCHOLA3 (anciennement FH3 ; OMIM 603776) ont été rapportés par notre équipe. En effet, grâce au Réseau National de Recherche sur les Hypercholestérolémies familiales, des familles atteintes d'hypercholestérolémie ont été recrutées dans plusieurs régions de France. Après l'exclusion des gènes *LDLR* et *APOB*, une stratégie de clonage positionnel a été utilisée pour identifier la région génétique liée à la maladie. En utilisant cette approche génétique classique, HCHOLA3 a été cartographié à 1p34.1-p32 dans une famille française multiplex (HC2) (Varret et al., 1999). Un an plus tard, Hunt et al. ont confirmé cette localisation dans une famille ADH originaire de l'Utah (Hunt et al., 2000). L'analyse de la ségrégation, la cartographie génétique et les études de séquençage réalisées ont permis d'exclure plusieurs gènes et d'affiner les limites de la région grâce à l'identification d'une nouvelle famille française présentant une liaison génétique au même locus HCHOLA3 (Abifadel et al., 2003). Des études approfondies de séquençage de plusieurs gènes candidats exprimés dans le foie a permis d'identifier, dans deux familles ADH françaises, une mutation commune, p.(Ser127Arg), dans le gène *PCSK9* et une autre mutation, p.(Phe216Leu), dans une troisième famille française atteinte d'ADH (Abifadel et al., 2003). Ainsi il y a eu rupture du paradigme (existence de 3 gènes et non 2 impliqués dans l'ADH) et identification d'un acteur totalement inconnu du métabolisme du cholestérol. *PCSK9* a été caractérisée par Seidah et al. en 2003 et il a été désigné NARC1 (« Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 ») puisque son ADNc fut cloné suite à sa surexpression dans des neurones en apoptose induite par une privation en sérum (Seidah et al., 2003).

5.4.2 Structure génique et protéique

Le gène *PCSK9* est localisé sur le chromosome 1 en position 1p32.3 et est formé de 12 exons transcrits en un ADNc de 3617 pb. Il code une glycoprotéine de 692 acides aminés (Abifadel et al., 2003). *PCSK9* est surtout exprimée dans le foie, l'intestin, les reins et le système nerveux (Abifadel et al., 2014).

La structure du *PCSK9* est caractérisée par la présence d'un peptide signal (résidus : 1-30), d'un prodomaine (résidus 31-152), d'un domaine catalytique, et d'une région C-terminale de 243 acides aminés riche en cystéine et en histidine (Abifadel et al., 2014).

La *PCSK9* est synthétisée sous forme d'une pro-enzyme inactive et contient une triade de résidus (Asp-186, His-226 et Ser-386) qui sont nécessaires à son activité catalytique. La forme précurseur d'environ 74 kDa subit un clivage auto-catalytique dans le RE, ce qui produit un fragment catalytique d'environ 60 kDa. Le clivage auto-catalytique du zymogène dans le RE est essentiel pour sa sécrétion. La structure cristalline de *PCSK9* montre que le prodomaine clivé d'environ 14 kDa reste associé au domaine catalytique, bloquant le site catalytique de *PCSK9*, ce qui pourrait expliquer pourquoi aucune autre activité protéolytique n'a été rapportée pour cette protéine. La forme mature et sécrétée de 60 kDa est clivée par les proprotéines convertases, notamment la furine et/ou la proprotéine convertase (PC) C5/6A (PC5/6A), au motif RFHR↓218 en un fragment inactivé ou moins efficace d'environ 53 kDa (**Figure 9**) (Abifadel et al., 2014).

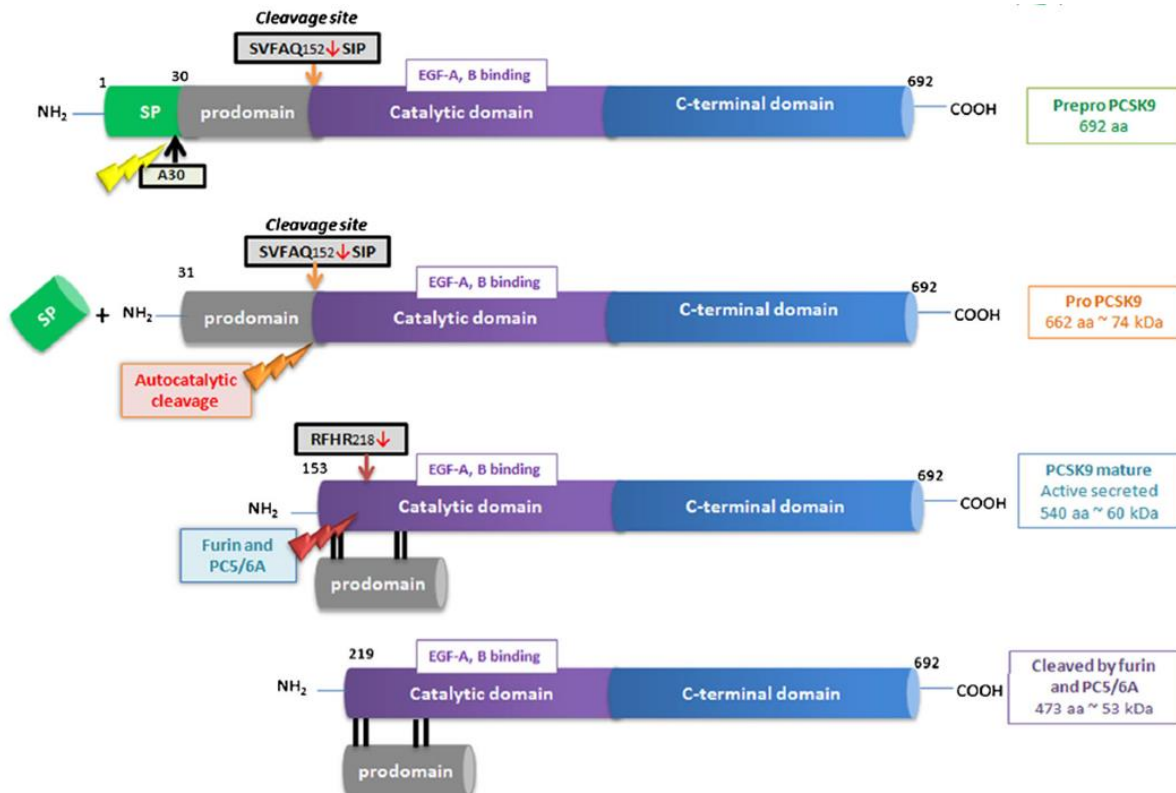


Figure 9 : Structure et modifications post-traductionnelles de PCSK9 (Abifadel et al., 2014)

5.4.3 Fonctions de PCSK9

5.4.3.1 Fonction hépatique

PCSK9 n'a aucune activité protéolytique sauf envers elle-même et l'association du prodomaine avec PCSK9 résulte d'un complexe bioactif stable puisque le prodomaine est généralement un inhibiteur puissant de l'activité protéase des PCs (**Figure 10**) (Saavedra et al., 2013).

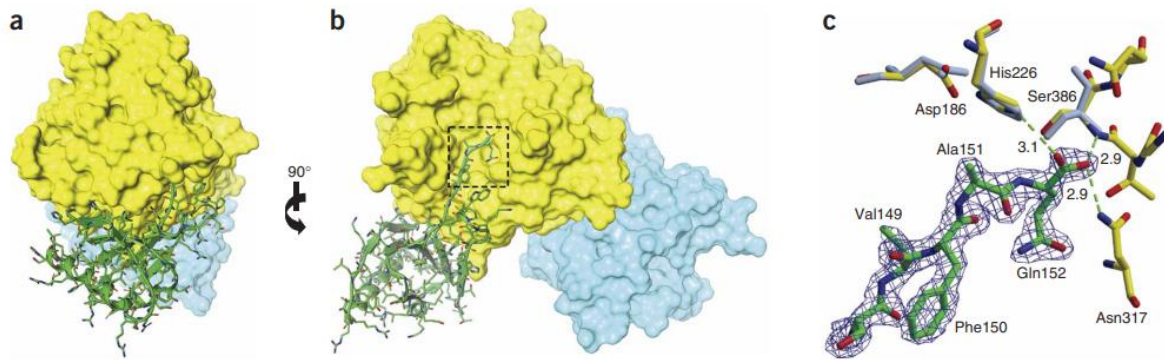


Figure 10 : Structure cristalline de la PCSK9 humaine (Cunningham et al., 2007)

(a) Interface entre le prodomaine (ruban vert) et le domaine catalytique (jaune). Le domaine C-terminal est représenté en cyan. (b) Vue tournée de 90° montrant le site catalytique bloqué par le prodomaine (encadré noir). (c) Vue rapprochée du site catalytique. La triade Ser386-His226-Asp186 de PCSK9 (jaune). Les résidus P5-P1 du propeptide sont représentés en vert. Les liaisons hydrogène sont dessinées sous forme de lignes pointillées avec les distances (Å°).

Seidah et al. ont réalisé plusieurs tests dans lesquels ils ont pré-incubé l'enzyme PCSK9 dans toutes sortes de tampons pour déclencher la séparation du prodomaine inhibiteur du site catalytique. Dans tous les cas, l'élimination du prodomaine conduisait à l'agrégation de la PCSK9 (Cunningham et al., 2007; Seidah, 2021). Ainsi, le complexe prodomaine-PCSK9 est mort du point de vue enzymatique, et il exerce ses fonctions envers le LDLr par un mécanisme non enzymatique (Cunningham et al., 2007).

PCSK9 dégrade le LDLr indépendamment de son activité catalytique en faisant intervenir des voies principalement extracellulaires et éventuellement intracellulaires. La PCSK9 pourrait agir dans le compartiment post-RE, où elle pourrait cibler le LDLr pour le dégrader dans les lysosomes. PCSK9 se lie au domaine EGF-A du LDLr présent à la surface cellulaire. Le site de liaison au récepteur se trouve à la surface de PCSK9 qui est formé principalement par les résidus 367-381. Les interactions clés avec l'EGF-A sont réalisées par l'arginine en position 194 et par l'acide aspartique en position 238 de PCSK9. Le complexe PCSK9-LDLr est par la suite internalisé et dirigé vers les endosomes/lysosomes où il devient plus stable à cause du pH acide de l'endosome. Ceci empêche la libération du récepteur et favorise sa dégradation au niveau du lysosome. Ainsi, PCSK9 fonctionne comme une protéine chaperonne qui empêche le recyclage des récepteurs LDL et/ou cible les récepteurs LDL pour qu'ils soient dégradés par les lysosomes (**Figure 11**) (Abifadel et al., 2014; El Khoury et al., 2017). Le site majeur de liaison entre PCSK9 et le récepteur du LDLr se situe entre le domaine catalytique de PCSK9 et le domaine EGF(A) de LDLr, cependant une interaction faible se fait également entre le

prodomaine de PCSK9 au niveau de la leucine en position 108 et le domaine β -propeller de LDLr au niveau de la leucine en position 626 (Lo Surdo et al., 2011).

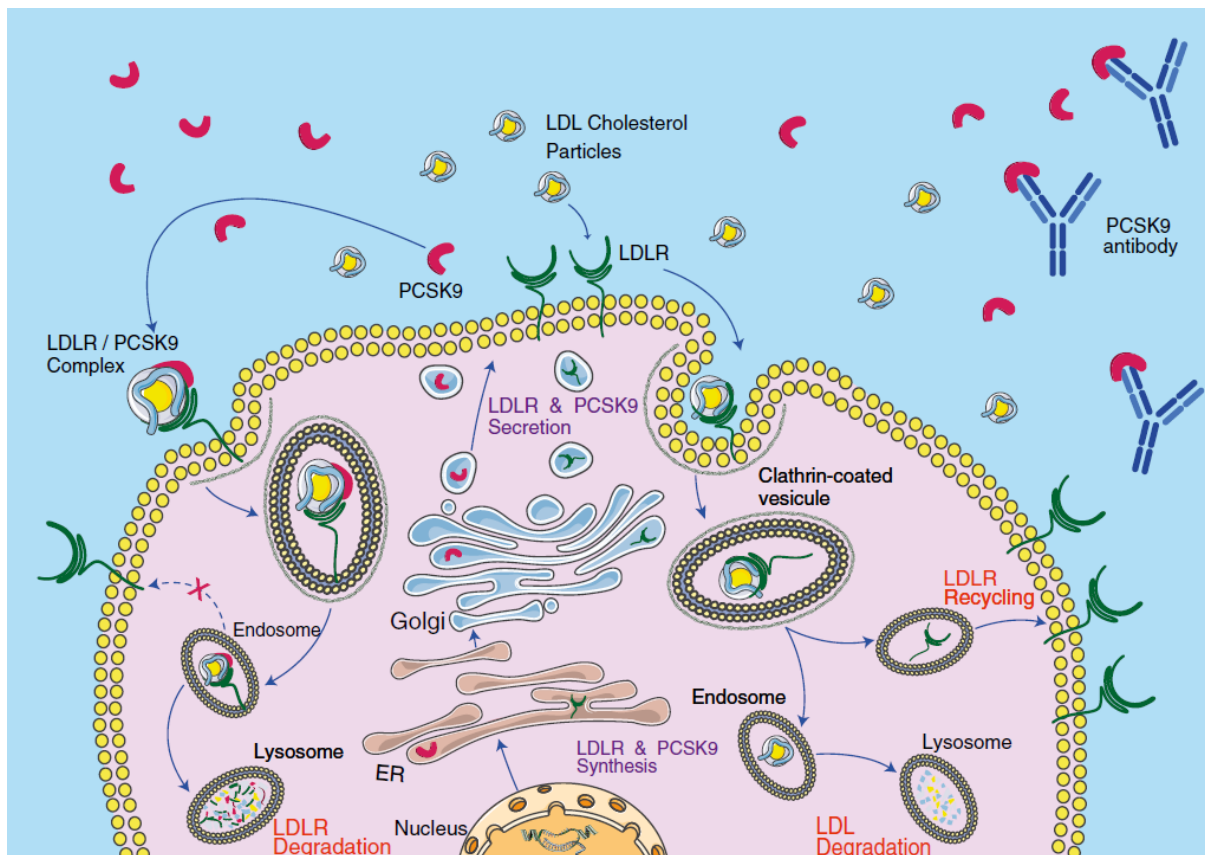


Figure 11 : Impact du PCSK9 sur le récepteur des LDL et le mécanisme d'action des inhibiteurs de PCSK9 (El Khoury et al., 2017)

Le LDLr et PCSK9 sont synthétisés et sécrétés. PCSK9 sécrétée se lie au domaine EGF-A du LDLr à la surface cellulaire, et le complexe PCSK9/LDLr sera internalisé dans les compartiments endosomal/lysosomal. L'affinité du complexe PCSK9/LDLr est accrue dans l'endosome en raison d'une acidité plus élevée. Ceci empêche le recyclage des récepteurs LDLr, réduit leur nombre à la surface des cellules et entraîne leur dégradation. Immédiatement, après une injection d'un anticorps anti-PCSK9, l'anticorps se lie à la PCSK9 libre circulante et réduit sa concentration plasmatique. Il en résulte une réduction de la dégradation du LDLr dans les lysosomes. Ainsi, le nombre de LDLr à la surface des cellules augmente réduisant ainsi la concentration plasmatique du LDL-C.

5.4.3.2 Fonctions extra hépatiques

Au-delà de son rôle dans la régulation du métabolisme du cholestérol via le LDLr hépatique, des études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que la PCSK9 est impliquée dans divers processus physiologiques (Stoekenbroek et al., 2018). En effet, la PCSK9 est exprimée par différents organes et exerce un rôle différent selon l'organe.

5.4.3.2.1 Action de la PCSK9 dans le tractus gastro-intestinal

PCSK9 est exprimée dans l'intestin chez l'homme selon des études des biopsies intestinales humaines et des lignées cellulaires intestinales. Cependant, PCSK9 n'est pas détectée dans le sang périphérique ou dans la veine porte ce qui indique que PCSK9 pourrait agir uniquement de manière autocrine ou paracrine après sa production par les entérocytes et n'atteint pas la circulation (Stoekenbroek et al., 2018). PCSK9 pourrait être impliquée dans l'excrétion trans-intestinale du cholestérol, connue sous le nom de TICE, une voie complémentaire de l'excrétion biliaire qui permet l'élimination du cholestérol dans la lumière intestinale et qui implique plusieurs protéines (ABCG5/8, ABCB1, Niemann-Pick C1 like proteine 1 et le LDLr) (Le May et al., 2013). Chez la souris, la TICE contribue à environ un tiers de la perte totale de stérol fécal (van der Veen et al., 2009). En effet, Le May et al. ont montré que les souris *Pcsk9* ^{-/-} ont une augmentation de cette voie métabolique sans modification de la prise alimentaire quotidienne ou de l'absorption intestinale du cholestérol, tandis que l'injection intraveineuse de la PCSK9 recombinante réduit rapidement la TICE (Le May et al., 2013). Dans les cellules CaCo-2, une lignée cellulaire d'entérocytes humains, PCSK9 augmente le niveau cellulaire ainsi que la sécrétion des apoB riches en triglycérides. (Le May et al., 2009). PCSK9 diminue l'expression des LDLr dans les entérocytes mais augmente l'expression et la stabilité de l'ARNm de l'apoB ainsi que les niveaux d'enzymes génératrices de lipides (l'acide gras synthase, la stéaroyl-CoA désaturase et la diglycéride acyltransférase 2) (Rashid et al., 2014). De plus, PCSK9 favorise l'interaction entre l'apoB48 et la protéine de transfert des triglycérides (MTP) pendant l'absorption des lipides (Rashid et al., 2014). Cependant, la déficience en PCSK9 entraîne une diminution de la sécrétion d'apoB, des chylomicrons de grande taille et une accélération de la clairance au niveau du foie (Le May et al., 2009). Cela permet de conclure que PCSK9 contrôle le niveau d'expression des LDLr dans les entérocytes, ce qui affecte l'excrétion et l'absorption du cholestérol.

5.4.3.2.2 Action de la PCSK9 sur la lipémie postprandiale

Il a été démontré que les souris déficientes en PCSK9 (*Pcsk9* ^{-/-}) présentent une lipémie réduite. D'une part, certaines données soutiennent une action directe de PCSK9 à l'intérieur de l'entérocyte pour contrôler la sécrétion d'apoB48 et des chylomicrons. D'autre part, la clairance hépatique des lipoprotéines riches en TG est augmentée chez les souris *Pcsk9* ^{-/-} (Le May et al., 2009). Il a été par la suite démontré que la lipémie postprandiale chez la souris dépend de

l'expression de Pcsk9 circulante et non régionale dans l'intestin (Garçon et al., 2020). En effet, les souris Pcsk9 -/- au niveau de l'intestin n'ont pas une lipémie postprandiale diminuée, alors que la surexpression de la PCSK9 hépatique entraîne une augmentation des taux plasmatiques de PCSK9 et une exacerbation de la lipémie postprandiale et son inhibition par un anticorps monoclonal réduit cette lipémie postprandiale. Ainsi, c'est la PCSK9 plasmatique dérivée du foie qui est le régulateur clé de la lipémie postprandiale via son effet sur les LDLr, car cette action est inhibée chez les souris déficientes en Ldlr (Garçon et al., 2020).

De plus, les concentrations de PCSK9 sont stables lors d'une charge aiguë en graisses et n'augmentent que sous un régime riche en graisses de longue durée (Cariou et al., 2013). Des études sur des sujets porteurs de mutations perte de fonction dans le gène *PCSK9* ont montré que ces derniers présentent des taux réduits de TG, d'apoB48 et d'apoB total à jeun et en période postprandiale (Ooi et al., 2017).

5.4.3.2.3 Action de la PCSK9 sur le pancréas et risque de diabète

Il a été démontré que la fréquence du diabète de type 2 chez les patients atteints d'ADH est plus faible que chez leurs apparentés normocholestérolémiques (Besseling et al., 2015). De plus, le LDLr est abondamment exprimé par les cellules β pancréatiques chez l'homme, la souris et le rat, où il joue un rôle clé dans l'absorption du LDL plasmatique. L'homéostasie du cholestérol est cruciale pour la fonction et la survie des cellules β . L'accumulation excessive de cholestérol entraîne une réduction significative de la capacité des îlots de Langerhans à sécréter de l'insuline en réponse au glucose, et l'exposition prolongée à des niveaux élevés de LDL ou VLDL pourrait également être mortelle pour les cellules β (Da Dalt et al., 2019). Une augmentation de l'expression du LDLr et de la teneur en cholestérol a été observée dans le pancréas de souris déficientes en *Pcsk9* ce qui suggère également un rôle potentiel de la protéine dans ce tissu (Mbikay et al., 2010). En effet, l'expression accrue des récepteurs des LDL médiée par l'inhibition de PCSK9 pourrait inhiber la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose et augmenter légèrement le risque du diabète de type 2 (Stoekenbroek et al., 2018). Cependant, l'inhibition thérapeutique n'a pas augmenté le risque du diabète de type 2 dans un essai clinique à grande échelle (Sabatine et al., 2017).

D'autre part, les études de cohortes ont montré que le taux plasmatique de PCSK9 serait positivement associé à l'index de résistance à l'insuline (HOMA) (Lakoski et al. 2009 ; Baass et al. 2009). El Khoury et al. ont montré, dans une cohorte de patients diabétiques de type 2 ((DIABHYCAR, N=3137), que le taux plasmatique de PCSK9 était positivement associé au

risque de survenue d'événements CV et pas à la mortalité CV (El Khoury et al., 2018). En revanche, cette association n'a pas été trouvée dans une autre cohorte de 1468 patients atteints de diabète de type 2 (SURDIAGENE) mais qui, contrairement aux sujets de la première cohorte, étaient caractérisés par un risque CV élevé et recevaient de l'insuline et des statines. Cette inconsistance dans les résultats entre les deux cohortes serait due au niveau du risque CV de base chez les sujets des deux cohortes ainsi qu'à leur traitement (El Khoury et al., 2018).

5.4.3.2.4 Action de la PCSK9 sur les reins

Le rein a été l'un des premiers tissus connus pour exprimer la protéine PCSK9 (Seidah et al., 2003). Des études *in vitro* réalisées sur des cellules HEK293 ont indiqué que la PCSK9 cible les trois sous-unités du canal sodique épithélial. Cependant, une activité réduite de la PCSK9 n'est pas associée à des modifications de la pression artérielle (Berger et al., 2015; Sharotri et al., 2012). De plus, des données indiquent qu'il existe une interaction mutuelle entre le foie et le rein et qui régule spécifiquement l'expression rénale des LDLr. En effet, la baisse de l'expression rénale des LDLr protège le rein du stockage des lipides et ainsi de l'induction ultérieure de la fibrose rénale (Wu et al., 2020, p. 9). Il semble que dans certaines conditions, le rein transmet des signaux au foie qui augmente la sécrétion de PCSK9, ce qui affecte et réduit l'expression des LDLr dans les reins. C'est le cas des podocytes endommagés par le sérum néphrotoxique ou par l'hypercholestérolémie ce qui stimule l'expression de la PCSK9 hépatique induisant ainsi la dégradation des LDLr au niveau des reins et empêchant l'accumulation des lipides (Haas et al., 2016).

5.4.3.2.5 Action de la PCSK9 dans le cerveau

PCSK9 également appelée NARC-1 « neural apoptosis regulated convertase-1 » attire l'attention sur la corrélation entre l'induction de l'expression de l'ARNm de *NARC-1* et l'apoptose neuronale, un processus naturel impliqué dans le développement normal (Schlüter et al., 2020). PCSK9 est transitoirement exprimée dans les neurones du télencéphale du cerveau embryonnaire (Seidah et al., 2003). La surexpression de NARC-1 dans les cellules primaires du télencéphale embryonnaire obtenues à partir d'embryons de souris de 13,5 jours entraîne un pourcentage plus élevé de neurones différenciés (Seidah et al., 2003). De plus, dans un modèle d'embryon de poisson zèbre, le knockdown de l'ARNm de *Pcsk9* en utilisant des oligonucléotides antisens a entraîné la perte de structures du système nerveux central et a abouti à la létalité (Poirier et al., 2006). Toutes ces constatations suggèrent que PCSK9 joue un rôle

critique au moins dans les premières phases de la différenciation neuronale. Cependant, chez des souris déficientes en *Pcsk9*, il n'y avait pas une déstructuration neuronale et une femme porteuse d'une mutation perte de fonction sur les deux allèles de *PCSK9* avait fait des études supérieures, ce qui suggère que *PCSK9* n'est pas crucial pour le développement du cerveau chez l'homme (O'Connell & Lohoff, 2020). Il a été démontré par l'étude REGARDS que les résultats des tests neurocognitifs ne différaient pas entre 241 porteurs d'une variation perte de fonction de *PCSK9* et 10 454 témoins (Mefford et al., 2018). Le rôle de *PCSK9* dans le système nerveux central est controversé. Une étude réalisée par Zimetti et al. a montré que les niveaux de *PCSK9* étaient plus élevés dans le liquide céphalo-rachidien provenant de 30 patients atteints de la maladie d'Alzheimer que dans le liquide provenant de 30 témoins appariés pour l'âge et le sexe (Zimetti et al., 2017, p. 9). Une autre étude a suggéré que les niveaux de *PCSK9* dans le liquide céphalorachidien sont augmentés dans les troubles neurodégénératifs et qu'ils sont positivement corrélés avec les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (la protéine tau totale et la protéine tau phosphorylée) (Courtemanche et al., 2018). Il a été suggéré que *PCSK9* a un effet pro-apoptotique conduisant ainsi à une maladie neurodégénérative et qu'elle participe au clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde en dégradant le site β de l'enzyme 1 de clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (*BACE1*) (Stoekenbroek et al., 2018). Cependant, certaines études ont rapporté des résultats opposés (Liu et al., 2010). Des études ont été réalisées afin de détecter l'effet des inhibiteurs de *PCSK9* sur la fonction cognitive. Les résultats ont montré que les anticorps monoclonaux n'avaient pas d'effets négatifs sur la fonction neurocognitive (Giugliano et al., 2017; Harvey et al., 2018). Des études de suivi à long terme sont nécessaires pour tirer des conclusions définitives sur la fonction de *PCSK9* dans le système nerveux central.

5.4.3.2.6 Action de la *PCSK9* sur le cœur

Des observations sur des modèles animaux ont confirmé l'expression de *PCSK9* dans les cardiomyocytes différenciés en phase terminale (Schlüter et al., 2017). En outre, des études récentes ont révélé les associations possibles entre les maladies cardiaques et *PCSK9*, indépendamment de la régulation du cholestérol. L'expression accrue de *PCSK9* après un infarctus aigu du myocarde, déclenchée par l'hypoxie et les processus inflammatoires en cours, entraîne l'activation d'une apoptose excessive au niveau des cellules cardiaques ce qui entraîne des lésions du muscle cardiaque (Ding, Wang, et al., 2018). L'action négative de *PCSK9*, notamment sur le remodelage du cœur ou l'augmentation de la taille de l'infarctus implique la

protéine 1 liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LRP-1 ou low density lipoprotein receptor-related protein 1), le récepteur cible de PCSK9 dans le cœur ischémique (Potere et al., 2019). Les inhibiteurs de PCSK9 dans des modèles de rats se sont avérés avoir un rôle cardioprotecteur dans la réduction de la taille de l'infarctus, de l'apoptose et des arythmies et dans l'amélioration de la contractilité des cardiomyocytes (Palee et al., 2019).

5.4.3.2.7 PCSK9 et risque de cancer

En ce qui concerne le cancer, le cholestérol joue un rôle clé dans différents processus métaboliques cellulaires, en particulier au niveau des étapes anaboliques telles que la croissance et la division cellulaire qui sont essentielles pour la croissance et la métastase des tumeurs (Seidah, 2021). A part son rôle dans l'homéostasie du cholestérol, PCSK9/NARC1 pourrait être impliqué dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Seidah et al., 2003). En effet, le traitement des cellules HepG2 par la PCSK9 recombinante affecte l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire et/ou la croissance cellulaire indépendamment de son effet sur l'internalisation du cholestérol. Le rôle physiologique de PCSK9 dans la prolifération cellulaire a été démontré chez la souris où l'expression de PCSK9 dans le foie a été induite après une hépatectomie partielle (Seidah et al., 2003). Par contre, les souris déficientes en PCSK9 présentent une prolifération hépatocytaire altérée et une apoptose accrue après une hépatectomie partielle (Zaid et al., 2008).

De plus, dans des conditions pathologiques comme le cancer, il a été rapporté que la déficience en PCSK9 réduit les métastases hépatiques du mélanome (X. Sun et al., 2012) et que la PCSK9 augmente la métastase des cellules dérivées du mélanome dans les cellules épithéliales du poumon (Suh et al., 2021). De plus, les variants perte et gain de fonction de *PCSK9* sont associés à une incidence plus faible et plus élevée du cancer du sein, respectivement (Nowak & Ärnlov, 2018). En conséquence, il a été suggéré que l'expression de la PCSK9 pourrait être un biomarqueur précieux pour le pronostic clinique de certains types de tumeurs malignes, notamment le carcinome hépatocellulaire, le cancer de l'estomac, du rein, du pancréas et du sein. Différentes études ont ainsi montré l'implication de la PCSK9 dans le développement du cancer et ces processus peuvent être reliés à la réduction des niveaux de LDLr et/ou d'autres récepteurs à la surface des cellules et à la modulation de la disponibilité des lipides dans les tumeurs ainsi qu'à la capacité de la PCSK9 à augmenter les taux circulants de LDL-C (Seidah, 2021). Cela pourrait éventuellement conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant PCSK9, ce qui pourrait améliorer considérablement

la thérapie anticancéreuse, seule ou en association avec les traitements actuellement disponibles (Bhattacharya et al., 2021).

5.4.3.2.8 PCSK9 et risque d'infection

Des liens potentiels ont été trouvés entre la fonction de la PCSK9 et l'invasion ou la prolifération d'agents infectieux. Récemment, une étude a montré que dans les cultures cellulaires, l'infection par le virus de la dengue augmente l'expression de l'ARNm de *PCSK9* dans les hépatocytes, réduisant ainsi les niveaux du LDLr au niveau de la surface cellulaire et l'absorption du LDL-C, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol par la voie SREBP-2. Le virus de la dengue exploite ce mécanisme pour l'emballage viral (Gan et al., 2020).

Plusieurs études suggèrent un lien entre PCSK9 et l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV). Par exemple, en modulant l'expression du LDLr, la PCSK9 pourrait affecter l'entrée du HCV dans les cellules du foie via l'interaction des particules lipovirales avec l'apoE et l'apoB (Mazumdar et al., 2011). En plus de ses effets sur le LDLr, la PCSK9 diminue l'expression de CD81, une protéine de la surface cellulaire qui favorise l'entrée du HCV dans l'hépatocyte (Labonté et al., 2009). Ceci a été démontré par le pré traitement des lignées hépatiques HuH7 avec de la PCSK9 recombinante qui inhibe l'infection par le HCV de manière dose dépendante, tandis que l'expression de CD81 était augmentée chez des souris déficientes en *Pcsk9* (Labonté et al., 2009). En revanche, l'utilisation de l'alirocumab n'affecte pas le niveau d'expression de CD81 ni l'entrée des particules virales dans les cellules HuH7, ce qui suggère que l'inhibition de la PCSK9 circulante n'est pas reliée au risque d'infection par le HCV (Ramanathan et al., 2016).

Les parasites sont des organismes qui ont besoin de cholestérol pour se développer correctement. Comme ils n'ont pas la capacité de le synthétiser *de novo*, ils utilisent le cholestérol de l'hôte (Mbikay et al., 2007). Arama C et al. ont révélé dans un groupe de 752 enfants maliens que ceux qui étaient porteurs du polymorphisme gain de fonction p.(Glu670Gly) dans *PCSK9* étaient sujets à une évolution plus sévère du paludisme (Arama et al., 2018). Alors que Fedoryak O et al. ont montré que les mutations perte de fonction de *PCSK9* étaient associées à une réduction de la mortalité au cours du paludisme (Hindawi, s. d.)

5.4.3.2.9 PCSK9 et inflammation

Les processus inflammatoires jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'athérosclérose. La PCSK9 est capable d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF-), l'interleukine-1 (IL-1) ou l'interleukine-6 (IL-6). De plus, elle augmente les translocations des facteurs de transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans le noyau cellulaire et réduit la formation de cytokines anti-inflammatoires dans les macrophages (Ricci et al., 2018). De même, les concentrations plasmatiques de PCSK9 augmentent également 12 à 24 heures après un syndrome coronarien aigu et sont positivement corrélées au degré d'inflammation mesuré par la protéine C-réactive à haute sensibilité (hs-CRP), ainsi qu'au nombre de globules blancs et au taux de fibrinogène (Gencer et al., 2016; S. Li et al., 2014). Il a été également montré que le lipopolysaccharide (LPS) augmente l'expression de la PCSK9 hépatique et rénale chez la souris, ce qui favorise la dégradation du récepteur des LDL et conduit à une augmentation du taux plasmatique de LDL (Feingold et al., 2008). L'une des premières méta-analyses réalisées sur l'effet des inhibiteurs de PCSK9 sur le processus inflammatoire n'a pas montré de corrélation entre ces médicaments et la concentration de la CRP (Cao et al., 2018). Cependant, une étude a révélé les effets bénéfiques de l'inhibition de la PCSK9 à l'aide de siARN sur la diminution des concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et la TNF- (Tang et al., 2012). Ainsi, les effets bénéfiques de l'inhibition de PCSK9 restent à élucider.

5.4.3.2.10 PCSK9 et activation plaquettaire

La thrombose dans la circulation artérielle est la principale cause pathologique des maladies artérielles thrombotiques comme le syndrome coronarien aigu et l'accident vasculaire cérébral ischémique. L'une des principales étapes qui accompagnent les maladies artérielles thrombotiques est l'activation plaquettaire. Cette dernière est associée à certaines pathologies telles que l'athérosclérose et l'hyperlipidémie (Qi et al., 2021). Une étude a démontré que PCSK9 augmente directement l'activation plaquettaire, la formation de la thrombose *in vivo*, l'obstruction microvasculaire et les expansions post-infarctus du myocarde. Ceci a lieu suite à la liaison de la PCSK9 au récepteur CD36 des plaquettes, induisant ainsi l'activation de ses voies de signalisation en aval (Qi et al., 2021). Ils ont également démontré que l'inhibition de PCSK9 par l'evolocumab protège les souris contre l'hyperactivité plaquettaire et la thrombose *in vivo* et que l'aspirine inhibe l'effet activateur de PCSK9, ce qui justifie l'utilisation de l'aspirine avec les inhibiteurs de PCSK9 chez les patients présentant des taux plasmatiques

élevés afin de prévenir les complications thrombotiques (Qi et al., 2021). De même, il a été démontré qu'une corrélation positive existe entre les taux plasmatiques de PCSK9 et la numération plaquettaire dans une étude réalisée chez 330 patients présentant des maladies coronariennes stables, ce qui suggère un lien potentiel entre PCSK9 et les plaquettes qui pourrait être impliqué dans l'athérosclérose et les troubles métaboliques (S. Li et al., 2015).

5.4.3.3 PCSK9 et Athérosclérose

5.4.3.3.1 PCSK9 et CMLv

Dans les plaques d'athérome, PCSK9 est surtout présente au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) mais pas au niveau des cellules endothéliales, des macrophages et des monocytes (Ding et al., 2015; Ferri et al., 2012). Ferri et al ont montré que la PCSK9 exprimée par les CMLv est active et capable de réduire l'expression du LDLr dans les macrophages. De plus, le milieu conditionné des CMLv réduit significativement l'internalisation des LDL et des VLDL par les lignées des macrophages confirmant ainsi que la PCSK9 réduit l'expression du LDLr. Ainsi, ils ont conclu que la PCSK9 pourrait jouer un rôle dans la progression de l'athérosclérose (Ferri et al., 2012). Une autre étude a révélé que la PCSK9 sécrétée par les CMLv stimulées par des lipopolysaccharides (LPS) est biologiquement active et entraîne la diminution de l'expression des LDLr des monocytes (Grune et al., 2017).

L'apoptose des CML, une caractéristique de l'athérosclérose, est particulièrement évidente pour les plaques instables, sujettes à la rupture (Ramel et al., 2019). Il a été signalé que l'administration de LPS induit l'expression de PCSK9 par les CMLv et provoque des dommages à l'ADN mitochondrial ce qui aboutit à l'apoptose des CMLv. L'administration de la PCSK9 recombinante humaine augmente les dommages de l'ADN mitochondrial qui, à son tour, induit l'expression de PCSK9. Cette interaction positive est régulée par les ROS mitochondriaux (Ding et al., 2016).

Une autre étude a également montré l'implication de PCSK9 dans les lésions vasculaires. Les souris déficientes en *Pcsk9* ne présentaient pas une prolifération intimale à la suite d'une lésion vasculaire. La comparaison directe des CMLv isolées de deux souches de souris différentes (*Pcsk9*^{-/-} ; *Pcsk9*^{+/+}) a révélé que les CMLv des souris *Pcsk9*^{-/-} exprimaient des niveaux plus élevés des marqueurs contractiles et des niveaux faibles des marqueurs synthétiques. En outre, les CMLv des souris *Pcsk9*^{-/-} ont un indice de prolifération et une capacité migratoire inférieure à celle des souris *Pcsk9*^{+/+}. Ces données suggèrent que PCSK9

est susceptible de moduler à la fois la prolifération et la migration cellulaire ainsi que le passage du phénotype contractile au phénotype synthétique (**Figure 12**) (Ferri et al., 2016).

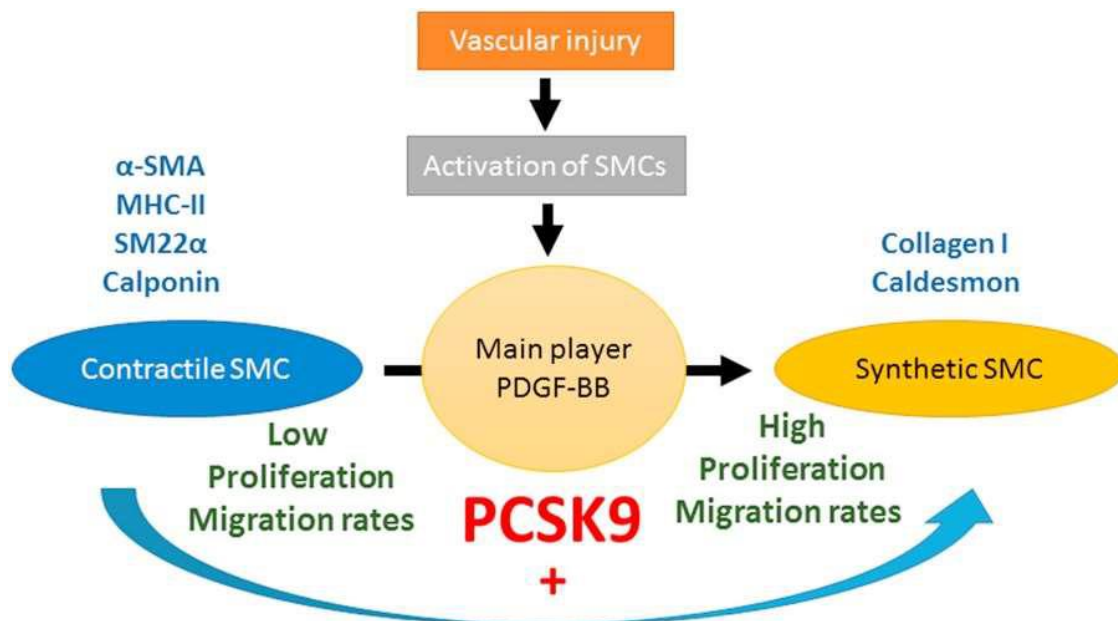


Figure 12 : PCSK9 et l'activation des cellules musculaires lisses après une lésion vasculaire (Ferri et al., 2016)

PCSK9 régule la différenciation, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. PCSK9 pourrait jouer un rôle pro-athérogène et cela en présence du facteur de croissance PDGF-BB.

Une étude clinique réalisée par Chan et al. a montré que les taux circulants de PCSK9 sont significativement associés à l'épaisseur intima-média de la carotide, indépendamment des facteurs de risque conventionnels. Ainsi, les taux de PCSK9 peuvent prédire l'athérosclérose carotidienne chez des adultes asymptomatiques (Chan et al., 2016). Une deuxième étude a révélé que les taux circulants de PCSK9 sont associés à la progression de l'athérosclérose à 10 ans, indépendamment des taux du LDL-C (Xie et al., 2016).

5.4.3.3.2 PCSK9 et Récepteurs des lipoprotéines

L'un des événements majeurs de l'athérosclérose est l'internalisation des LDL modifiées par les CMLv et les macrophages via les récepteurs scavengers tels que LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) et CD36 (Cluster of Differentiation 36) qui est impliqué dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides et les récepteurs de la famille

des LRP (LDL receptor Related Protein) dont LRP-1, conduisant à la formation des cellules spumeuses (Mineo, 2020).

De nombreuses études ont montré une interaction entre PCSK9 et ces récepteurs. En effet, une étude réalisée par Ding et al. a montré que, suite à un traitement par PCSK9 des macrophages traitées au préalable par $Tnf\alpha$, une augmentation de l'expression des récepteurs CD36, LOX-1 et récepteurs scavengers classe A (SRA) a été signalée et par la suite une augmentation de l'internalisation des LDL oxydées (Ding, Liu, et al., 2018).

Une étude a également montré qu'il existe un lien bidirectionnel entre PCSK9 et LOX-1, en particulier après le traitement des cellules avec du LPS. Le traitement par PCSK9 et la surexpression de LOX-1 induisent la production des ROS mitochondriaux (mtROS), tandis que l'inhibition de PCSK9 et de LOX-1 réduit la synthèse de ces mtROS, ce qui suggère que les mtROS jouent un rôle clé dans l'interaction PCSK9/LOX-1. De plus, l'activation de LOX-1 et l'administration de PCSK9 augmentent l'internalisation des LDL oxydées et l'expression de VCAM-1 par les CML, ce qui constitue un événement clé dans le développement de l'inflammation (Ding et al., 2015).

De plus, une étude a montré que PCSK9 provoque la dégradation de CD36, un récepteur scavenger qui sera traité dans le chapitre 2 de ce manuscrit, dans des lignées cellulaires humaines et murines. En effet, PCSK9 induit la dégradation du CD36 par des mécanismes impliquant les protéasomes et les lysosomes, ce qui affecte l'internalisation des ligands de CD36 par les adipocytes et les cellules hépatiques (Demers et al., 2015).

Chez les souris knock-out *Pcsk9*, l'augmentation de l'expression hépatique de CD36 induit une augmentation de l'absorption des acide gras et l'accumulation de triglycérides et de gouttelettes lipidiques. Également, les cellules mononucléées du sang périphérique provenant de sujets porteurs d'une variation perte de fonction de PCSK9 révèlent une augmentation significative des niveaux d'ARNm de *CD36* par rapport aux témoins (Gagnon et al., 2016). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec les résultats obtenus par Ding et al sur CD36 dans les macrophages (Ding et al., 2018) suggérant ainsi que l'effet de PCSK9 sur CD36 pourrait être tissu-dépendant et que des études supplémentaires sont indispensables pour confirmer les résultats obtenus.

PCSK9 est aussi capable de dégrader LRP-1. Une étude chez des souris transgéniques capables de produire la PCSK9 humaine et murine a montré que la PCSK9 produite est active et capable de diminuer l'expression du LDLr et de LRP-1 à la surface des macrophages. Cependant, la réduction du LRP-1 n'a pas été observée que chez des souris *ApoE*^{-/-}, apoE étant un ligand de LRP-1 (Giunzioni et al., 2016). De même, une autre étude a montré que PCSK9

est capable d'induire la dégradation de LRP-1 dans plusieurs lignées cellulaires et que le LDLr entre en compétition avec LRP-1 sur l'activité de PCSK9 (Canuel et al., 2013).

5.4.4 Régulation de PCSK9

5.4.4.1 Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle du gène *PCSK9* a été évaluée au cours de la dernière décennie. Des études ont montré que *PCSK9* est régulée par SREBP-1a et SREBP-2 qui sont une famille de facteurs de transcription qui régulent l'homéostasie lipidique. Lorsque le taux de cholestérol hépatique est réduit, la transcription de *PCSK9* est stimulée (El Khoury et al., 2017; Persson et al., 2009).

Le promoteur de *PCSK9* contient un site de liaison du facteur de transcription nucléaire hépatocytaire-1 alpha (HNF-1 α). L'inhibition de l'HNF-1 α , mais pas de l'HNF1- β , réduit significativement l'expression de *PCSK9*. Li et al. ont rapporté que HNF-1 α coopérait avec SREBP2 pour activer la transcription de *PCSK9* puisque les mutations du site de liaison de l'HNF-1 α réduisaient de manière significative la transcription de *PCSK9* médiée par SREBP2. Cependant, le site de liaison de l'HNF-1 α se trouve 28 pb en amont du site de liaison de SREBP2. Ainsi, il se peut que les mutations au niveau du site de liaison de l'HNF-1 α affectent l'intégrité de SRE et altèrent ainsi indirectement la liaison de SREBP2 (H. Li et al., 2009).

L'expression de *PCSK9* est faiblement stimulée par l'agoniste des récepteurs des oxystérols ou liver X receptors (LXR) (Maxwell et al., 2003). L'insuline aussi modifie l'expression de *PCSK9* mais son rôle est controversé. En effet, il a été démontré que l'insuline agit via la voie SREBP-1c en augmentant l'expression de l'ARNm de *PCSK9* dans les hépatocytes de souris en culture alors qu'elle le diminue dans les hépatocytes humains. Des études supplémentaires sont ainsi nécessaires pour comprendre la régulation de *PCSK9* par l'insuline (Krysa et al., 2017).

L'expression de *PCSK9* est diminuée par le cholestérol alimentaire, le glucagon, l'éthinylestradiol, l'acide chénodésoxycholique et le récepteur farnésoïde X (FXR) activé par les acides biliaires (El Khoury et al., 2017).

Plusieurs médicaments hypocholestérolémiants induisent des modifications de l'expression de *PCSK9*. Les statines augmentent l'expression de *PCSK9* par le foie en stimulant le facteur de transcription SREBP-2 dans des cellules HepG2 et dans des hépatocytes primaires humains (Dubuc et al., 2004). De plus, lorsque l'ézitimibe est associé aux statines, une augmentation du taux de *PCSK9* a été également constatée et qui peut être due à une sécrétion

réduite plutôt qu'à une production augmentée (Davignon & Dubuc, 2009). Dans la plupart des études, les fibrates, un autre agent hypolipémiant, étaient associées à une augmentation des taux plasmatiques de PCSK9 (Troutt et al., 2010).

5.4.4.2 Régulation post-transcriptionnelle

L'expression de *PCSK9* est régulée par des microARN (miRNA). Le miR-483-5p cible la région 3'-UTR de l'ARNm de *PCSK9*, réduisant ainsi l'expression de *PCSK9* et diminuant les niveaux de cholestérol plasmatique dans les cellules HepG2 et chez les souris. De même, les miR-224, miR-191, miR-222, miR-1228-3p, miR-564, miR-4721, miR-337-3p, et miR-143-5p peuvent réduire l'expression de *PCSK9* par le biais du ciblage de son 3'-UTR dans les cellules HuH7 et HepG2 (Los et al., 2021).

5.4.4.3 Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles incluent la phosphorylation, la N-glycosylation et la sulfatation.

La phosphorylation de PCSK9 qui se fait au niveau des résidus de la sérine, la thréonine, l'asparagine et la lysine protège PCSK9 contre la protéolyse et augmente sa stabilité dans les cellules HuH7 (Dewpura et al., 2008). Cependant, elle n'est pas essentielle pour la fonction de PCSK9 sur le LDLr car la PCSK9 purifiée obtenue à partir des cellules CHO-K1 n'est pas phosphorylée et peut effectivement induire la dégradation du LDLr (Gustafsen et al., 2017). De même, l'inhibition de la N-glycosylation de PCSK9 qui se fait au niveau du résidu asparagine ainsi que sa sulfatation au niveau des résidus tyrosine n'a aucun effet sur l'expression et la sécrétion de PCSK9 dans la lignée cellulaire d'hépatocytes humains ainsi que dans les cellules HuH7 (Xia et al., 2021). Ainsi, ces modifications ne sont pas essentielles à la maturation, la sécrétion, et la fonction de la PCSK9 (Xia et al., 2021).

5.4.5 PCSK9 circulante

Plusieurs équipes ont développé un test immuno-enzymatique (ELISA) pour mesurer le taux plasmatique de la PCSK9. Ces derniers varient au moins d'un facteur 100 entre les différents sujets (Lakoski et al., 2009). En effet, les taux de PCSK9 sont corrélés significativement avec les taux plasmatiques de LDL-C et de CT (Alborn et al., 2007). De plus, les taux plasmatiques de PCSK9 sont positivement corrélés aux taux de LDL-C chez les

patients atteints d'HF et pourraient contribuer à la sévérité phénotypique de cette maladie (Huijgen et al., 2012).

Également, les taux plasmatiques de PCSK9 ont été mesurés dans 2 cohortes de patients atteints de diabète de type 2 par un kit ELISA et en utilisant la technologie de dosage Bio-Plex Pro (Luminex Corporation). Les résultats ont montré que les concentrations plasmatiques de la PCSK9 ont été significativement corrélées au risque de survenue des événements CV dans la cohorte DIABHYCAR alors que cette association n'a pas été observée dans la cohorte SURDIAGENE qui était caractérisée par un risque CV plus élevé et qui était lourdement traitée par de l'insuline et des statines. En effet, le risque CV élevé, les statines et l'insuline sont connus pour être impliqués dans la variation des taux plasmatiques de PCSK9 et ainsi ils pourraient être responsables de l'absence d'association entre PCSK9 et le risque de survenue des événements CV dans la cohorte SURDIAGENE (El Khoury et al., 2018).

5.4.6 Mutations de *PCSK9*

5.4.6.1 Mutations gain de fonction

Les premières mutations gain de fonction de *PCSK9* provoquant une hypercholestérolémie ont été identifiées par notre équipe dans des familles d'origine française atteintes d'HF recrutées grâce au Réseau national de recherche sur les hypercholestérolémies familiales. Le séquençage du gène *PCSK9* a conduit à l'identification de la première mutation, p.(Ser127Arg), dans l'exon 2 dans une famille nantaise et une de Dijon présentant plusieurs cas d'HF, de xanthomes tendineux, d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux. De plus, la présence d'un haplotype commun a été démontrée à la suite de l'étude des marqueurs polymorphes et intragéniques autour de la mutation. Ceci montre que les deux familles partagent un ancêtre commun malgré leurs origines géographiques différentes (Abifadel et al., 2003). L'haplotype sera détaillé dans le premier chapitre des résultats de ce manuscrit dans lequel je date la mutation qui est à la base d'un effet fondateur au sein de la population française. En effet, la mutation p.(Ser127Arg) a été retrouvée chez 67% des patients ADH français porteurs de mutations au niveau de *PCSK9* (Rabès et al., 2018). Cependant, elle est moins fréquente chez des patients ADH norvégiens porteurs d'une mutation *PCSK9* où elle a été retrouvée chez 3 patients parmi 10 atteints et chez 3 patients sud africains parmi 27 porteurs d'une mutation *PCSK9* (Huijgen et al., 2021; Leren & Bogsrud, 2021). De plus, elle n'a pas

été détectée dans une cohorte de patients turques (Kaya et al., 2017). En se basant sur ces études, la p.(Ser127Arg) est probablement à la base d'un effet fondateur en France.

La deuxième mutation, p.(Phe216Leu), localisée dans l'exon 4 de *PCSK9*, a aussi été identifiée par notre équipe dans une 3^{ème} famille française originaire de Lille dont le proposant est décédé à l'âge de 49 ans suite à un infarctus du myocarde avec un taux de CT de 441 mg/dl et un taux de LDL-C de 356 mg/dl (Abifadel et al., 2003).

La troisième mutation gain de fonction, p.(Asp374Tyr), a été identifiée en 2004 dans une famille ADH originaire de l'Utah, précédemment liée à la région 1p32 (Timms et al., 2004). La même mutation a été retrouvée dans trois familles norvégiennes (Leren, 2004) et dans trois familles anglaises dont les 12 patients affectés présentaient une hypercholestérolémie sévère et des antécédents familiaux de coronaropathie prématurée (Sun et al., 2005).

Plus récemment, notre équipe a identifié deux nouvelles mutations gain de fonction dans *PCSK9* dans des familles françaises : la p.(Leu108Arg) dans une famille noire originaire de l'île Maurice où le proposant âgé de 41 ans avait des taux de LDL-C de 302 mg/dl et des xanthomes tendineux, et la p.(Asp35Tyr) dans une deuxième famille où le proposant avait des taux de LDL-C de 234 mg/dl à l'âge de 55 ans (Abifadel et al., 2012). Les mutations de *PCSK9* responsables de l'ADH sont très rares mais bien documentées (Abifadel et al., 2014).

Du point de vue fonctionnel, les études *in vitro* ont montré que la p.(Ser127Arg) et la p.(Asp374Tyr) entraînent une diminution de 23% du nombre des récepteurs à la surface cellulaire et une réduction de 38% de l'internalisation des particules LDL par rapport à la *PCSK9* sauvage et cela dans des cellules HepG2 (Cameron et al., 2006). De plus, la *PCSK9* avec la mutation p.(Asp374Tyr) se lie avec une affinité 25 fois plus importante aux récepteurs des LDL pH neutre que la *PCSK9* sauvage (El Houry et al., 2017).

Des études cinétiques *in vivo* des lipoprotéines contenant l'apoB chez deux sujets porteurs de la mutation p.(Ser127Arg) ont montré une augmentation du taux de production de l'apoB de trois fois par rapport aux sujets témoins et aux sujets porteurs des mutations du *LDLR*. Cette mutation conduit ainsi à une augmentation de la production de VLDL (2 fois), d'IDL (3 fois) et de LDL (5 fois). Ces patients ont également été caractérisés par un taux de catabolisme plus faible de LDL et un faible taux de conversion d'IDL en LDL par rapport aux témoins (Ouguerram et al., 2004).

De nombreuses études ont été menées afin de découvrir de nouvelles mutations dans *PCSK9* (**Figure 14**) (Q. Guo et al., 2020). Une étude multinationale a été réalisée et regroupait 164 patients ADH de 12 centres répartis dans 8 pays. Seize mutations gain de fonction ont été décrites dans tous les domaines fonctionnels de *PCSK9* et ont été associées à des taux variables

de LDL-C. Les porteurs des mutations p.(Asp374Tyr) et p.(Ser127Arg) présentaient une dyslipidémie sévère (**Figure 13**). De plus, 44 % des patients avaient des antécédents de MCV, la maladie coronarienne étant la manifestation la plus répandue (33%). Il est intéressant de noter que ces mutations ont une distribution géographique restreinte et se trouvent chez un petit nombre de patients (Hopkins et al., 2015).

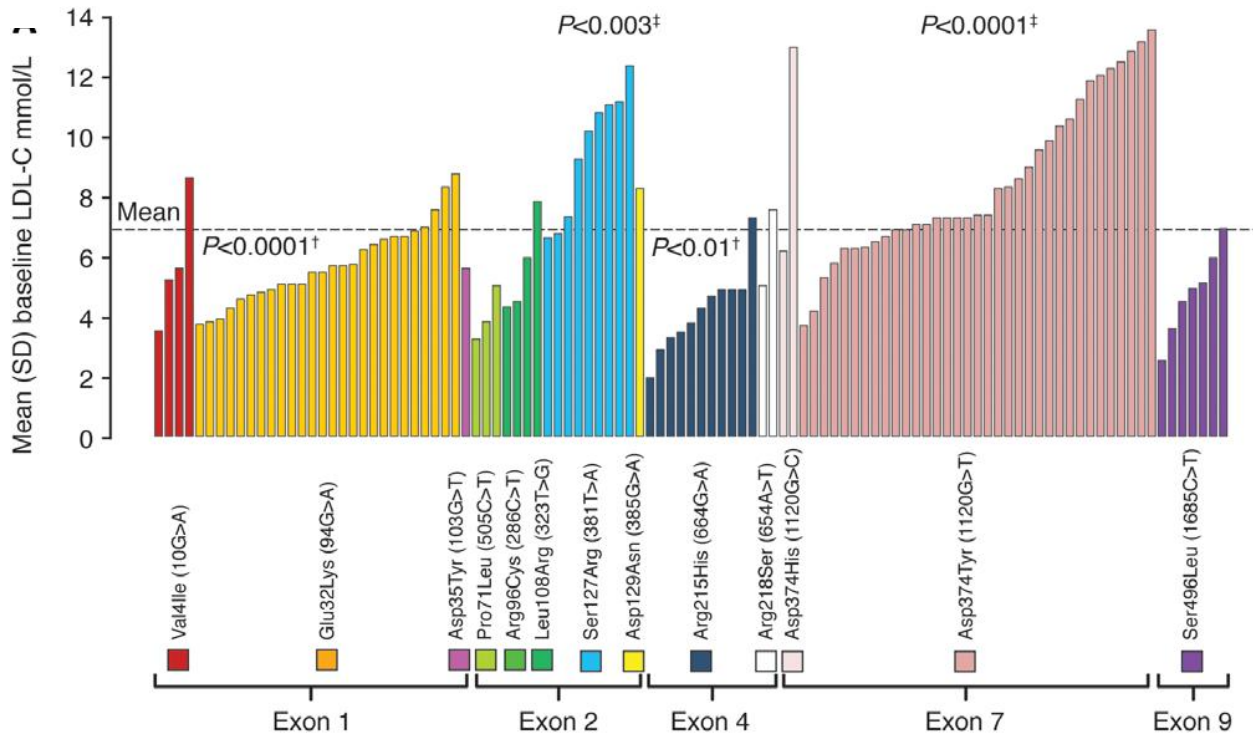


Figure 13 : Distribution des taux du LDL-C chez des patients non traités présentant uniquement des mutations gain de fonction de *PCSK9* (Hopkins et al., 2015)

5.4.6.2 Mutations perte de fonction

Des études ont été conduites pour identifier des mutations perte de fonction dans le gène *PCSK9* chez des sujets présentant des taux faibles de LDL-C (< 58 mg/dl) provenant de l'étude Dallas Heart study. Ces études ont conduit à l'identification de deux mutations non-sens, p.(Tyr142Ter) et p.(Cys679Ter), ayant une fréquence combinée de 2% chez les sujets afro-américains alors qu'elles étaient rares chez les sujets afro-européens (< 0,1%). Ces mutations non-sens ont été associées à une réduction de 28% du taux moyen de LDL-C et à une réduction de 88% du risque cardiovasculaire. De plus, la construction des haplotypes en utilisant 52 SNPs qui couvrent le gène *PCSK9* afin de déterminer si les allèles mutés sont issus d'un ancêtre

commun, ont montré que chaque mutation non-sens provient d'un seul fondateur (J. Cohen et al., 2005).

De plus, une autre mutation, p.(Arg46Leu), a été trouvée chez des sujets caucasiens et a été associée à une réduction de 15% des taux de LDL-C et de 47% du risque de coronaropathie (J. C. Cohen et al., 2006; Humphries et al., 2009).

Également, des patients présentant des taux très faibles de LDL-C et des taux indétectables de PCSK9 circulante ont été signalés. Ces sujets étaient porteurs de mutations perte de fonction à l'état homozygote p.(Arg46Leu) ou hétérozygote composite p.(Tyr142Ter) et une délétion de 3 pb dans le cadre (c.290_292delGCC) qui supprime une arginine au codon 97 (Δ R97). Ces individus étaient en bonne santé et fertiles (Tsai et al., 2015; Zhao et al., 2006).

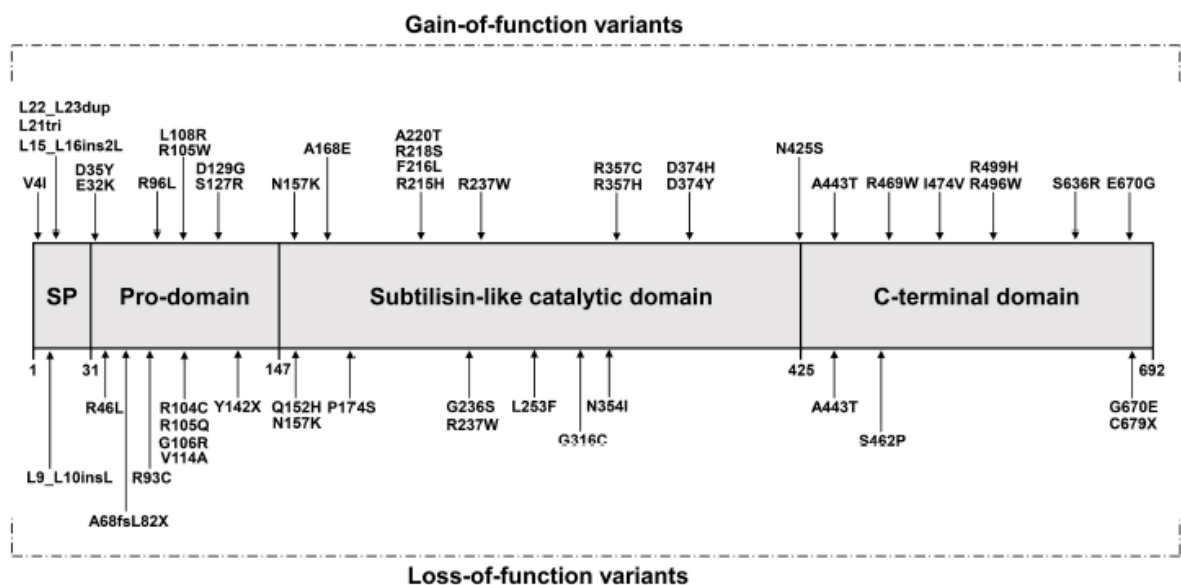


Figure 14 : Structure de la protéine PCSK9 et localisation des variants gain et perte de fonction (Q. Guo et al., 2020)

6. Traitement de l'HF

L'objectif du traitement de l'HF est la prévention primaire des MCV athéromateuses par un traitement hypolipémiant. Si l'athérosclérose est déjà présente, un traitement hypolipémiant encore plus intensif devient crucial pour la prévention secondaire. Un traitement hypolipémiant doit être mis en place dès que possible après le diagnostic chez tous les adultes et les enfants

atteints d'HF dès l'âge de 8-10 ans et comprend des interventions sur le régime alimentaire et le mode de vie ainsi qu'un traitement pharmacologique (Defesche et al., 2017).

Des mesures de style de vie doivent être mises en place dès l'identification d'un taux élevé de LDL-C. Le respect d'un régime alimentaire pauvre en graisses saturées et en cholestérol est très important. Des conseils concernant l'arrêt du tabac, l'exercice régulier et un apport calorique approprié doivent être fournis. D'autres facteurs de risque de MCV, notamment l'hypertension et des taux élevés de Lp(a) doivent également être évalués (Defesche et al., 2017). Les objectifs thérapeutiques recommandés par l'ECS/EAS sont les suivants : pour les adultes atteints d'ADH, les taux de LDL-C doivent être inférieurs à 2,5 mmol/L (<100 mg/dl) et chez ceux ayant un risque d'accident CV majeur, les objectifs de LDL-C sont une réduction d'au moins 50% du LDL-C par rapport à la valeur initiale et une concentration de LDL-C inférieure à 1,8 mmol/L (< 70 mg/dL). En ce qui concerne les enfants âgés de plus de 10 ans, les taux de LDL-C doivent être inférieurs à 3,5 mmol/L (< 135 mg/dL) et chez les plus jeunes une réduction d'au moins 50% du LDL-C est recommandée (Authors/Task Force Members et al., 2019).

Un traitement par des hypolipémiants associé au changement du mode de vie doit être initié au moment du diagnostic chez les adultes et les enfants à partir de 8 – 10 ans. La pharmacothérapie pour réduire le LDL-C comprend les molécules suivantes :

- Les statines,
- L'ézétimibe souvent en association avec les statines. C'est le seul inhibiteur de l'absorption du cholestérol qui bloque la protéine Niemann-Pick C1 Like 1 et intervient dans l'absorption du cholestérol par les entérocytes entraînant une diminution du retour du cholestérol vers le foie et une régulation positive du LDLr (Authors/Task Force Members et al., 2019).
- Les séquestrant des acides biliaires : Ce sont des résines qui lient les acides biliaires et interrompent leur recirculation entéro-hépatique, épuisant ainsi les réserves intrahépatiques de cholestérol et réduisant les taux de cholestérol tout en activant le LDLr (Authors/Task Force Members et al., 2019). Ils sont considérés parmi les hypolipémiants les plus anciens et les plus sûrs vu qu'ils ne sont pas absorbés par l'intestin (Mahley & Bersot, 2006). Cependant, il faut signaler que les séquestrant des acides biliaires augmentent les taux de triglycérides et leur utilisation en monothérapie est possible lorsque les taux de triglycérides sont inférieurs à 200 mg/dL (Scaldeferri et al., 2013).

➤ Les inhibiteurs de PCSK9.

Le gène causal ne semble pas avoir de rôle dans le choix du traitement optimal. Bien que cela n'ait pas été formellement testé, les réponses aux statines, à l'ézétimibe et aux inhibiteurs de la PCSK9 ne semblent pas varier entre les individus atteints d'ADH. Cependant, tant que cette hypothèse soit formellement testée, la plupart des décisions thérapeutiques sont d'abord fondées sur le degré d'élévation du LDL-C et sur le risque global de MCV, avec des ajustements empiriques ultérieurs en fonction de la réponse au traitement, indépendamment de la base génétique à quelques exceptions près comme chez les patients homozygotes à titre d'exemple (Defesche et al., 2017).

6.1 Les statines

Les statines restent le traitement de référence pour réduire les taux de cholestérol total et du LDL-C circulant chez les patients présentant un risque de MCV. En effet, les statines réduisent la synthèse du cholestérol dans le foie en inhibant la HMG-CoA réductase. La réduction du cholestérol intracellulaire favorise l'expression accrue des LDLr à la surface des hépatocytes, ce qui entraîne une augmentation de l'absorption des LDL dans le sang et une diminution des concentrations plasmatiques de LDL et d'autres lipoprotéines contenant de l'apoB, y compris les particules riches en TG (Authors/Task Force Members et al., 2019). Il a été démontré que les statines réduisent la mortalité liée aux événements CV de 30 % et l'incidence des accidents vasculaires cérébraux (AVC) de 20 % dans de multiples études à long terme (Chaudhary et al., 2017).

Cependant, le traitement par des statines en monothérapie ne permet pas d'atteindre un taux de LDL-C de moins de 70 mg/dL chez plus de 70% des patients atteints de MCV. De plus, la nécessité d'une administration quotidienne de statines et l'apparition d'effets indésirables comme les myopathies, les myalgies et l'hépatotoxicité, incitent les patients à interrompre la prise du médicament dans l'année qui suit. A noter, une mauvaise adhésion au traitement est un facteur majeur impliqué dans l'augmentation du risque de MCV (Barale et al., 2021).

En conséquence et afin de diminuer les effets indésirables et de réduire d'avantage le taux de LDL-C, les firmes pharmaceutiques ont développé des nouveaux traitements hypolipémiants.

6.2 Les Anti-PCSK9

Depuis la découverte de son implication dans le métabolisme du cholestérol en 2003, PCSK9 constitue une des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement de l'HF. Ainsi, l'intérêt pour le développement des thérapies ciblant PCSK9 dans le traitement de l'hypercholestérolémie s'est accru. Plusieurs méthodes sont élaborées pour inhiber la fonction de la PCSK9 et réduire son taux plasmatique. Ces approches ciblent soit la PCSK9 extracellulaire comme les anticorps monoclonaux ou les vaccins, soit la PCSK9 intracellulaire tel que les oligonucléotides antisens et les petits ARN interférents (siRNA) ou la thérapie génique.

6.2.1 Les anticorps monoclonaux

La stratégie la plus efficace à ce jour est celle des anticorps humains monoclonaux type IgG qui ciblent PCSK9. Ces molécules ont été développées suite à des études réalisées sur des modèles cellulaires ou animaux. En effet, les souris PCSK9 Knock-out (KO) uniquement dans le foie avaient un phénotype d'hypocholestérolémie équivalent à peu près de deux tiers de celui observé chez les souris PCSK9 KO complètement et l'absence de PCSK9 chez les souris réduit considérablement le développement de l'athérosclérose, les taux de l'apoB et le dysfonctionnement endothélial (Seidah, 2021). D'autres études cellulaires et génétiques ont montré que l'absence de l'activité ou de l'ARNm de PCSK9 réduit considérablement les taux de LDL-C chez les humains et les rongeurs (Seidah, 2021). Ces premières preuves du rôle de PCSK9 dans la régulation du cholestérol ont conduit au développement rapide de anticorps monoclonaux inhibiteurs qui se lient à PCSK9 et empêchent son interaction avec le LDLr. Ainsi, une augmentation du nombre des LDLr à la surface cellulaire et, par conséquent, une augmentation de l'absorption des LDL par les hépatocytes sont observées (El Khoury et al., 2017).

En 2015, 12 ans après l'identification du rôle de PCSK9 dans l'hypercholestérolémie, deux anticorps humains monoclonaux, l'alirocumab (Praluent® de Regeneron/Sanofi) et l'evolocumab (Repatha® d'Amgen), ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) et l'agence européenne des médicaments (EMA) (El Khoury et al., 2017).

Les anticorps monoclonaux anti-PCSK9 sont indiqués chez des patients adultes présentant une ADH à très haut risque cardiovasculaire, insuffisamment contrôlée par un régime alimentaire et par des statines prises à des doses maximales tolérées. L'evolocumab est en plus

indiqué dans le traitement des patients pédiatriques ADH à l'état hétérozygote dès l'âge de 10 ans et des adultes et enfants pédiatriques ADH à l'état homozygote (Amgen, 2022; sanofi-aventis groupe, s. d.).

Les doses recommandées sont (Amgen, 2022; sanofi-aventis groupe, s. d.) :

- Pour l'alirocumab : une injection sous-cutanée de 75 mg administrée toutes les 2 semaines avec la possibilité d'augmenter la dose à 150 mg toutes les 2 semaines chez les patients nécessitant une diminution plus importante du taux de LDL-C (plus de 60 %).
- Pour l'évolocumab : 140 mg injectés toutes les deux semaines ou 420 mg une fois par mois.

Ces anticorps monoclonaux sont délivrés sous une forme injectable auto-administrée par voie sous-cutanée, fournissant un vaste excès d'anticorps à chaque injection (rapport mAb/PCSK9 près de 100:1). Le traitement avec les anticorps en excès assure une inactivation complète des PCSK9 circulants en quelques heures, avec une réduction marquée du LDL-C dès le lendemain de l'injection. Les modifications des lipoprotéines dans le plasma associées à l'inhibition de PCSK9 se manifestent principalement par des réductions marquées du LDL-C (près de 50 – 60%), mais il existe également des réductions notables de la Lp(a) (près de 25 – 30%) et des TG (près de 10 – 20%) (Warden et al., 2020).

Les patients ADH à l'état homozygote porteurs des mutations LDL-nulles ne répondent pas aux inhibiteurs de la PCSK9, ceci est le cas des patients porteurs de la mutation libanaise du *LDLR* à l'état homozygote (F. J. Raal et al., 2015). Les groupes les plus courants des patients homozygotes présentant au moins une mutation faux-sens et une activité résiduelle du *LDLR* présentent des réductions du LDL-C de l'ordre de 18 à 44 %. Cependant, leur réponse aux inhibiteurs de la PCSK9 est généralement moins bonne que celle des patients ADH hétérozygotes (Defesche et al., 2017; F. J. Raal et al., 2015).

Récemment, une méta-analyse regroupant 39 essais contrôlés randomisés incluant 66 478 patients dont 35 896 traités par des inhibiteurs de la PCSK9 (14 639 par alirocumab et 21 257 par evolocumab) a été réalisée afin de comparer l'effet du traitement avec les inhibiteurs PCSK9 à un placebo ou à un autre traitement hypolipémiant. Les résultats ont montré que les inhibiteurs de la PCSK9 ont été associés à un risque plus faible d'infarctus du myocarde ($p < 0,0001$), d'AVC ischémique ($p = 0,0005$) et de revascularisation coronaire ($p < 0,0001$), par rapport au groupe témoin. En revanche, les effets de l'inhibition de la PCSK9 sur les décès dus à toutes causes confondues et les décès reliés aux accidents CV n'étaient pas statistiquement significatifs ($p = 0,15$ et $p = 0,34$ respectivement). De plus, dans cette méta-analyse, les

inhibiteurs de la PCSK9 présentait un excellent profil de sécurité (**Figure 15**). L'effet secondaire qui est apparu le plus fréquemment était les réactions au site d'injection (Guedeny et al., 2019).

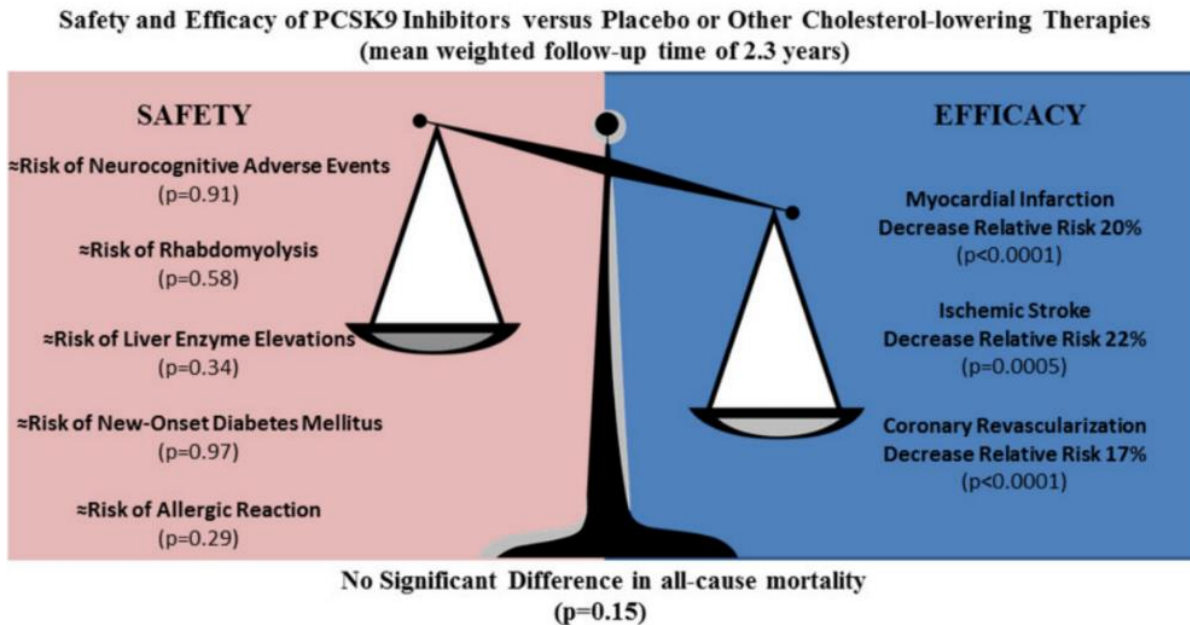


Figure 15 : Sécurité et efficacité des inhibiteurs de la PCSK9 (Guedeny et al., 2019)

Les inhibiteurs de la PCSK9 sont des médicaments très efficaces dans la réduction du LDL-C et des événements CV associés à un traitement par des statines et/ou l'ézétimibe. Cependant, vu le coût des traitements et les données limitées sur la sécurité à long terme, il est probable que ces médicaments ne soient considérés comme rentables que chez les patients présentant un risque très élevé d'ASCVD, et que leur utilisation ne soit pas possible dans certains pays aux ressources limitées (Authors/Task Force Members et al., 2019).

Finalement il faut noter que les études cliniques pour évaluer le Bococizumab, un anti-PCSK9 développé par Pfizer, ont été arrêtées. En effet, le Bococizumab réduit les taux de LDL-C de 55 à 60 %. Cependant cet effet n'est pas maintenu avec le temps à cause du développement d'anticorps anti-Bococizumab (Cupido et al., 2017).

6.2.2 ARN interférant

Inclisiran, formulé dans une nanoparticule lipidique, est le premier siARN inhibant la synthèse de la PCSK9. Vingt-quatre heures après son injection, il est indétectable dans le

plasma en raison de son absorption rapide et hautement spécifique par les hépatocytes. Cela suggère que, même si la PCSK9 est présente dans d'autres tissus, aucun effet hors cible de l'inclisiran n'a été détecté à ce jour. L'inclisiran réduit de manière significative la synthèse hépatique de PCSK9 diminuant ainsi de 50 à 60% les taux de LDL-C et préservant ses effets pharmacodynamiques lorsqu'il est administré par voie sous-cutanée tous les 6 mois (Nishikido & Ray, 2018).

Le brin guide du siARN se lie d'une manière intracellulaire à un complexe de silençage RISC (RNA-Induced Silencing Complex), qui s'hybride aux molécules d'ARNm codant spécifiquement PCSK9 entraînant ainsi leur clivage. L'ARNm clivé est dégradé de manière catalytique pour empêcher la synthèse de la protéine PCSK9 dans le foie (Fitzgerald et al., 2017).

Les trois études cliniques ORION de phase III (ORION-9, ORION-10 et ORION-11) ont confirmé l'efficacité de l'inclisiran (284 mg) dans la réduction à long terme du LDL-C avec une réduction des taux plasmatiques de PCSK9 d'environ 80% chez les patients présentant un risque CV très élevé. L'inclisiran est bien toléré et les effets secondaires les plus fréquents notés sont une réaction légère à modérée au site d'injection (y compris douleur, rougeur et éruption cutanée), une douleur articulaire, une infection des voies urinaires, une diarrhée, une bronchite aiguë, une douleur dans les jambes ou les bras et un essoufflement (F. J. Raal et al., 2020).

L'inclisiran, commercialisé sous le nom de Leqvio®, a obtenu l'autorisation de mise sur le marché par l'EMA en décembre 2020 et par la FDA en décembre 2021 (Research, 2021).

Plusieurs autres stratégies ont été proposées pour réduire l'activité ou les niveaux de PCSK9 (**Figure 16**).

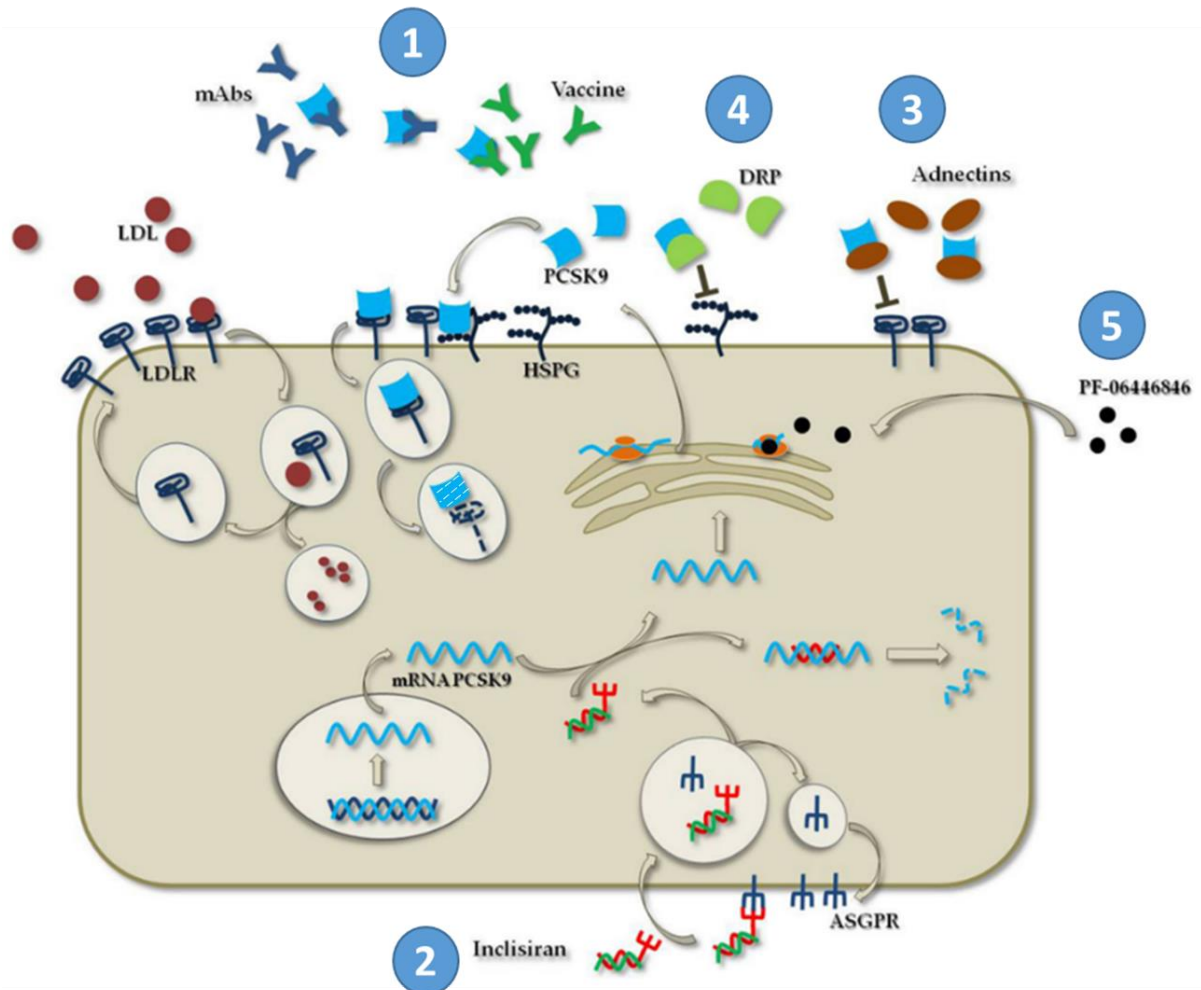


Figure 16 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de la PCSK9 (Catapano et al., 2020)

La PCSK9 peut être inhibée à différents niveaux : (1) les anticorps monoclonaux ou les anticorps produits suite à une vaccination (en cours des études pré-cliniques et cliniques phase I) neutralisant la PCSK9 extracellulaire et inhibant ainsi sa liaison au LDLr ; (2) l'inclisiran, un siRNA internalisé par des récepteurs hépatiques spécifiques (ASGPR), se lie à l'ARNm de *PCSK9* et induit sa dégradation ; (3) les adnectines (BMS-962476) sont des protéines synthétiques contenant le 10^{ème} domaine de la fibronectine type III qui se lie à la PCSK9 et inhibent son interaction avec le domaine EGF-A du LDLr; (4) le DRP, un petit inhibiteur conçu à être administré par voie orale, se lie à la PCSK9 et inhibe son interaction avec les protéoglycanes de la surface cellulaire (HSPG), entravant ainsi sa présentation au LDLr (en cours des études pré-cliniques) ; et (5) le PF-06446846, un inhibiteur sélectif de la PCSK9 actif par voie orale, qui empêche la traduction de l'ARNm du *PCSK9* en induisant le blocage des ribosomes (en cours des études pré-cliniques).

6.2.3 Thérapie génique

L'édition génétique de *PCSK9* permet de réduire durablement le taux de LDL-C chez les primates (Katzmann et al., 2022). Cette approche consiste à utiliser des éditeurs de bases CRISPR qui sont une modalité d'édition de gènes et qui fonctionnent en introduisant une

altération ciblée sans la nécessité d'induire des cassures double-brin, contrairement à CRISPR-Cas9 (Musunuru et al., 2021). Musunuru et al. ont conduit une étude chez des singes cynomolgus et ont montré l'efficacité de l'administration *in vivo* d'un éditeur de base adénine CRISPR à l'aide de nanoparticules lipidiques qui introduit une mutation de perte de fonction de *PCSK9* à un seul nucléotide précis. Cette thérapie génique a montré un effet durable de l'édition de *PCSK9* avec des réductions des niveaux plasmatiques de *PCSK9* et de LDL-C de 90% et 60% respectivement (qui restent réduites pendant au moins huit mois) (Musunuru et al., 2021). Les données de Musunuru et al. semblent être prometteuses à différents égards. En effet, l'édition du génome s'est produite :

1. de manière pratiquement spécifique à l'organe
2. de manière spécifique au site génomique
3. sans mutagenèse hors cible pertinente
4. avec seulement une modification mineure du génome de l'hôte
5. sans intégration du génome viral.

Il a été révélé que tous les composants injectés se dégradent rapidement. Cependant, des données sur la sécurité à long terme chez les primates non humains sont nécessaires avant une application potentielle chez l'homme (Musunuru et al., 2021).

6.3 Les autres traitements

6.3.1 Lomitapide et Mipomersen

Le lomitapide est un inhibiteur oral de la grande sous-unité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTTP) qui est nécessaire à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines qui contiennent de l'apoB-100 et le mipomersen est un oligonucléotide antisens qui se lie à l'ARNm de l'*APOB* et inhibe sa traduction, réduisant ainsi la synthèse et la sécrétion de l'apoB-100. Ces deux médicaments sont des alternatives pour les patients qui restent réfractaires aux traitements pharmacologiques standards, notamment les patients atteints d'ADH à l'état homozygote. Ces deux traitements diminuent de 50% et de 22% respectivement les taux de LDL-C chez les patients ADH homozygotes et ne sont pas approuvés par la FDA que chez ces patients, en raison de leur coût élevé et des taux élevés d'effets indésirables, notamment la stéatose hépatique (Defesche et al., 2017).

6.3.2 Acide bempédoïque

L'acide bempédoïque (NEXLETOL® ; NILEMDO) est une prodrogue administrée par voie orale. Elle est activée en intracellulaire et sera convertie en sa forme active, le bempédoyl-coenzyme A, par l'enzyme ACSVL1 (very long-chain acyl-CoA synthetase-1). Cette enzyme est exprimée par les cellules hépatiques et, dans une moindre mesure, les cellules rénales, et est absente du tissu adipeux et des cellules musculaires. Par conséquent, contrairement aux statines, l'effet myotoxique potentiel de l'acide bempédoïque est très limité (Ballantyne et al., 2021).

Le bempédoyl-coenzyme A réduit la synthèse du cholestérol en inhibant l'action de l'ATP citrate lyase, une enzyme cytosolique en amont de la HMG-CoA réductase. L'ATP citrate lyase convertit le citrate en acétyl-CoA dans la voie de synthèse du cholestérol. L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la synthèse endogène de cholestérol et une surexpression des LDLr ce qui diminue les taux plasmatiques du LDL-C (Ballantyne et al., 2021).

L'acide bempédoïque, administré en une seule prise quotidienne de 180 mg, est approuvé aux États-Unis et dans l'Union européenne (UE) en tant qu'adjuvant à un traitement par une dose maximale tolérée de statine pour baisser le taux de LDL-C chez les patients atteints de MCV ou d'ADH. En outre, l'acide bempédoïque est approuvé dans l'UE pour traiter les patients intolérants aux statines ou chez lesquels une statine est contre-indiquée. L'acide bempédoïque est également disponible sous forme d'association médicamenteuse à dose fixe composée de 180 mg d'acide bempédoïque et de 10 mg d'ézétimibe (Nexlizet® ; NUSTENDI®) (Ballantyne et al., 2021).

7. Autres formes d'hypercholestérolémie familiale

7.1 Hypercholestérolémie à transmission autosomique récessive (ARH)

Des cas d'hypercholestérolémie autosomique récessive (ARH) ont été décrits depuis les années 1970 notamment au Liban et en Sardaigne (Italie) chez des patients nés de parents consanguins non atteints. Les porteurs des mutations hétérozygotes de cette forme

d'hypercholestérolémie ont des taux normaux de cholestérol total et de LDL-C (Garcia et al., 2001).

L'ARH est une forme rare d'hypercholestérolémie familiale due à des mutations perte de fonction du gène *LDLRAP1*. C'est un gène de 25 kb, composé de 9 exons et codant une protéine formée de 308 acides aminés. Cette dernière est une protéine adaptatrice qui contient un domaine formé de 170 acides aminés se fixant à la tyrosine (PTB) et qui se lie avec la séquence NPXY présente dans les queues cytoplasmiques de plusieurs récepteurs de surface cellulaire dont le LDLr. Cette protéine adaptatrice joue donc un rôle dans l'internalisation des LDLr dans les puits à clathrine (Garcia et al., 2001). Ce clustering est indispensable pour une bonne clairance des LDL (Garuti et al., 2005) (**Figure 17**). A noter que l'ARH n'est pas toujours associée au récepteur des LDL. Cette protéine est recrutée à la membrane après liaison du LDL à son récepteur facilitant ainsi l'endocytose du complexe (Fellin et al., 2015).

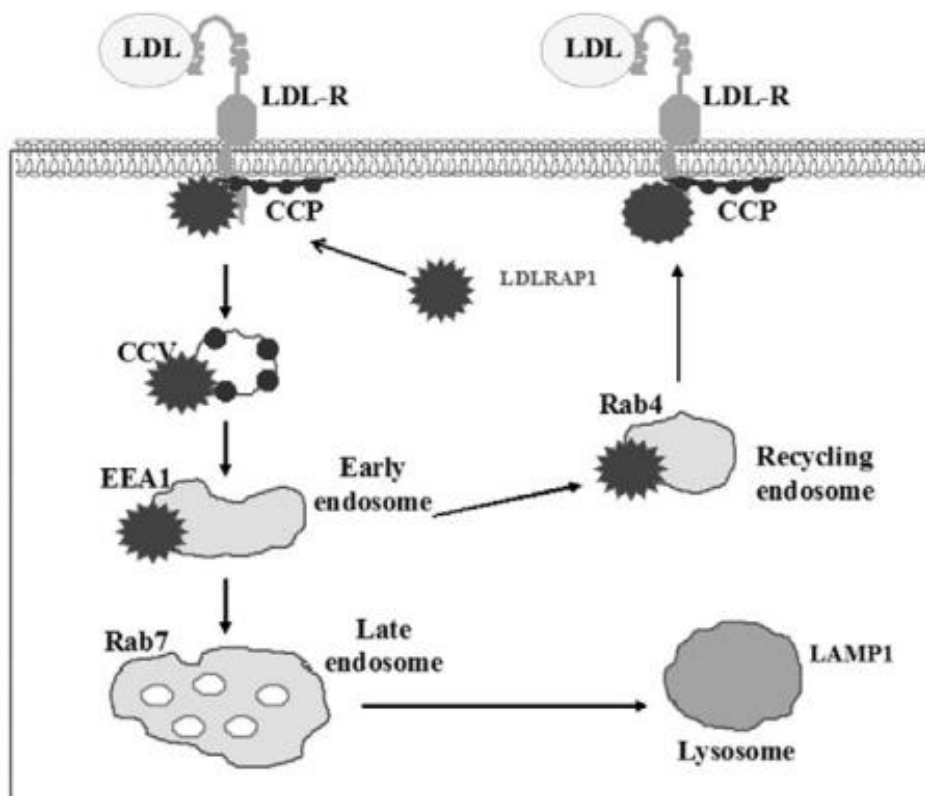


Figure 17 : Mécanisme d'action de LDLRAP1 (Fellin et al., 2015)

Lors de la liaison entre le LDL et le LDLr, LDLRAP1 est recrutée dans les puits à clathrine (CCP) et favorise l'internalisation du complexe LDL/LDLr en l'acheminant vers l'endosome. LDLRAP1 recycle les protéines associées au complexe LDL/LDLr dans l'endosome précoce (EEA1 et Rab4).

Le phénotype des patients atteints d'ARH est semblable à celui des patients ADH homozygotes porteurs des mutations provoquant un récepteur défectueux mais ont une augmentation moins importante des taux de LDL-C (Fellin et al., 2015).

7.2 La forme polygénique

Comme déjà détaillé, l'HF est due à des mutations de gènes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ou *APOE*. C'est la forme monogénique de la maladie. Cependant, dans 20 à 40 % des cas, aucune mutation n'est retrouvée dans ces gènes impliqués de l'hypercholestérolémie. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces cas de mutation négative dont la forme polygénique de l'hypercholestérolémie (Ghaleb et al., 2017). En effet, le phénotype HF peut être dû à l'effet cumulatif de nombreuses variations génétiques communes (polymorphismes ou SNPs). Chaque SNP exerce un faible effet sur les taux de LDL-C mais l'effet cumulatif de toutes ces variations explique l'élévation des taux de LDL-C qui dépassent le taux normal et se rapprochent du taux observé dans les HF monogéniques (Cupido et al., 2021).

Ces variations indépendantes associées à une élévation des taux du LDL-C et identifiées par des études GWAS, ont permis de construire un score polygénique (PRS). Ce dernier était construit en 2013 par Talmud et al. à partir de 12 SNPs (Talmud et al., 2013). Il était significativement plus élevé chez des patients diagnostiqués cliniquement avec une HF mais non porteurs de mutations (HF/M-) dans les gènes connus par rapport à la population générale et aux patients atteints de HF porteurs d'une mutation monogénique confirmée (Talmud et al., 2013). Plus tard, en 2015, Futema et al. ont utilisé des méthodes statistiques et ont montré qu'un score de 6 SNPs était équivalent au score formé de 12 SNPs pour distinguer les patients HF/M- et les individus témoins (Futema et al., 2015). En se basant sur ce nouvel score, une étude récente réalisée par Ghaleb et al. ont montré que le PRS peut être utilisé comme un marqueur de la sévérité de l'hypercholestérolémie mais ne semble pas être un outil de diagnostic fiable pour expliquer l'HF à l'échelle individuelle et distinguer les phénotypes au sein des familles HF (Ghaleb et al., 2017).

7.3 La forme oligogénique

Outre les formes monogéniques et polygéniques de l'HF, il existe aussi les formes digéniques qui ont été rapportées chez des sujets double-hétérozygotes porteurs de mutations dans deux gènes majeurs de l'ADH (*LDLR/APOB*, *LDLR/PCSK9*) (Sjouke, Defesche, Hartgers, et al., 2016) ou *APOB/PCSK9*) (Elbitar et al., 2018) ou dans un gène majeur (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*) et un gène mineur (*ABCG5*, *ABCG8*, *LDLRAP1*) (Tada et al., 2018). Il existe également une forme oligogénique avec trois variants dans des gènes non conventionnels de l'ADH que nous avons récemment décrite. L'étude d'une famille ADH française par séquençage simultané du génome et de l'exome, a révélé trois variants dans trois gènes différents : p.(Pro398Ala) dans *CYP7A1*, p.(Val1382Phe) dans *LRP6* et p.(Ser202His) dans *LDLRAP1*. Nous avons exclu un effet majeur de chaque variant seul ainsi que l'implication du score polygénique, et ainsi, déduit qu'une forme oligogénique d'hypercholestérolémie est probablement présente dans cette famille. Les niveaux élevés de LDL-C pourraient être causés par l'effet cumulatif des variants *LRP6* et *CYP7A1*, et aggravés par la présence du variant *LDLRAP1* (article 5 en annexe) (Ghaleb et al., 2022).

8. HF au Liban

La population libanaise est caractérisée par une fréquence élevée de dyslipidémies. C'est à travers des études sur la population libanaise que Khachaturian a décrit en 1973, et de façon claire, l'existence de formes homozygotes de l'HF et a montré que la transmission de la maladie se fait selon un mode autosomique dominant (Khachaturian & Uthman, 1973).

Au Liban, la fréquence des formes homozygote est 10 fois plus élevée que dans d'autres populations. Ceci est attribuable à une forte prévalence d'HF hétérozygote chez les Libanais, associée à une incidence élevée de consanguinité, ce qui augmente la proportion d'homozygotes (Khachaturian & Uthman, 1973; Lehrman et al., 1987).

Lehrman et al. ont identifié en 1987 une mutation non-sens au niveau du codon 660 du gène *LDLR* responsable de l'HF chez 3 proposants homozygotes libanais et 1 syrien. Cette mutation a été désignée p.(C660X) selon la nomenclature originale en considérant la numérotation des acides aminés de la protéine mature (sans le peptide signal de 21 acides aminés). Elle correspond donc à p.(C681X) ou p.(Cys681Ter) selon la nomenclature

internationale actuelle (le premier acide aminé du LDLr étant la méthionine initiatrice). Cet allèle dit « allèle libanais » produit un codon de terminaison prématuré et un récepteur tronqué (Lehrman et al., 1987).

Un effet fondateur pourrait être à l'origine de cette incidence élevée de l'HF au Liban. Plusieurs études ont été par la suite réalisées et ont identifié d'autres proposants isolés, dans des pays voisins ou plus éloignés, porteurs de cette mutation dans l'exon 14 du *LDLR* (Abifadel et al., 2009). Abifadel et al. ont caractérisé le spectre des mutations causant l'HF au sein de la population libanaise. Ils ont rapporté une fréquence très élevée de la mutation p.(Cys681Ter) dans le *LDLr* chez les proposants hypercholestérolémiques libanais (jusqu'à 80%) (Abifadel et al., 2009).

La prévalence élevée de la même mutation du *LDLR* dans la population libanaise atteinte d'HF et le contexte génétique homogène facilitent l'étude des gènes susceptibles d'influencer le phénotype de l'HF. Ainsi, Abifadel et al ont montré que la p.(Leu21dup), une insertion d'une leucine à l'extension de 9 leucines dans l'exon 1 de *PCSK9* connue être associée à une réduction du taux de LDL-C dans la population générale, est également associée à une réduction des taux de LDL-C chez les patients atteints d'HF porteurs de la « mutation libanaise » (Abifadel et al., 2009). Ils ont également identifié d'autres mutations moins fréquentes dans le gène *LDLR* causant l'HF chez la population Libanaise : p.(Gln254Pro), p.(Asp356Tyr), p.(Cys358Tyr), p.(Trp443*), p.(Ile451Thr), p.(Pro826Ser), p.(His327fsX5), p.(Thr726Ile), et p.(Ala391Thr) (Abifadel et al., 2009; Fahed et al., 2016).

Bien que très rare à travers le monde, des familles libanaises atteintes d'ARH, La forme récessive de l'HF, ont été rapportées dans la population libanaise comme l'a décrit Khachadurian. Garcia et al. ont identifié les premières mutations du gène *LDLRAP1* responsables de ce phénotype p.(Gln136Ter) et p.(Pro202His) en 2001 en étudiant 4 familles dont deux sont de Sardaigne et deux du Liban (Garcia et al., 2001). Cependant, une deuxième étude menée par Wilund et al. en 2002 a révélé que la mutation faux-sens p.(Pro202His) n'est pas responsable de l'inactivation de la protéine LDLRAP1 chez les deux proposants libanais (Wilund et al., 2002). Dans une nouvelle étude menée au Liban en 2016 sur 25 familles libanaises souffrant d'une hypercholestérolémie, la mutation p.(Gln136Ter) dans *LDLRAP1* a été identifiée dans quatre familles à l'état homozygote où aucune autre mutation n'a été retrouvée, et dans une cinquième famille à l'état hétérozygote en association avec une mutation du *LDLR* (Fahed et al., 2016).

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai dosé les taux plasmatiques de la PCSK9 dans une cohorte pédiatrique Libanaise comportant des enfants normolipidémiques et dyslipidémiques. Les résultats seront détaillés dans le deuxième chapitre des résultats.

Nous avons également étudié d'autres dyslipidémies au sein de la population libanaise telle que l'hypobétalipoprotéïnémie familiale (HBLF) caractérisée par la présence d'un taux anormalement diminué de CT, de LDL-C (généralement entre 20 et 50 mg/dl) et d'apoB chez les patients atteints. Le séquençage de l'exon 11 du gène *APOB* nous a permis d'identifier la variation p. (Arg490Trp) (c.1468C>T) à l'état hétérozygote chez cinq des sept proposants ce qui représente environ 70 % des cas d'HBLF dans notre cohorte. Ces résultats devraient nous amener à rechercher cette variation décrite pathogène par les différentes bases de données comme première cause d'HBLF chez les patients libanais (article 6 en annexe). De plus, nous avons étudié les causes génétiques de l'hypoalphalipoprotéïnémie dans une famille libanaise présentant des taux de HDL-C extrêmement bas. Le séquençage du gène *ABCA1* dont les mutations sont responsables de la maladie de Tangier, a permis d'identifier la première variation pathogénique au Liban dans une famille consanguine. Le proposant est porteur de la variation p. (Gly592Asp) à l'état homozygote au niveau de l'exon 14 d'*ABCA1*. Cette variation ségrège avec la maladie dans la famille (article 7 en annexe).

Chapitre 2 : Cellules musculaires lisses vasculaires et athérosclérose

L'athérosclérose et ses complications cardiovasculaires constituent l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation de lipides, d'éléments fibreux et de calcifications dans l'intima des artères (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Le terme « athérosclérose » vient du mot grec « gruel » ou « porridge », reflétant l'aspect de la matière lipidique présente au cœur de la plaque d'athérosclérose (ou athérome) (Libby et al., 2019).

L'athérosclérose est présente tôt dans la vie chez l'homme et progresse au cours des années en fonction des facteurs de risque vers de nombreuses complications : des syndromes coronariens aigus dont l'infarctus du myocarde, ou des affections chroniques telles que l'angine de poitrine stable et des accidents vasculaires cérébraux (Libby et al., 2019).

Bien que l'ensemble de l'arbre artériel soit exposé à des facteurs de risque systémiques tels que l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète, l'athérosclérose se développe préférentiellement dans des zones géométriquement prédisposées telles que les bifurcations et les branchements artériels où la force de cisaillement est faible ou le flux sanguin est perturbé. La fréquence élevée de l'athérosclérose au niveau des artères coronaires est due à l'hémodynamique spécifique de la circulation coronaire interrompue en systole par la contraction musculaire, alors que les artères épocardiques non comprimées par la contraction musculaire restent remplies de sang stationnaire (Arjmandi-Tash et al., 2011; Morbiducci et al., 2016).

Dans ce chapitre, je détaillerai la physiologie de la paroi artérielle et ses composants ainsi que la physiopathologie de l'athérome humain. Une meilleure compréhension de tous les acteurs impliqués dans cette pathologie va aboutir au développement de nouveaux traitements ciblant les éléments en cause.

1. Physiologie de la paroi artérielle

La paroi artérielle est formée des cellules endothéliales (CE), des cellules musculaires lisses (CML), des fibroblastes (FB) et des protéines de la matrice extracellulaire organisées en trois tuniques concentriques qui sont de l'intérieur en allant de la lumière vers l'extérieur : l'intima (CE), la média (CML) et l'adventice (FB) (**Figure 18**) (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

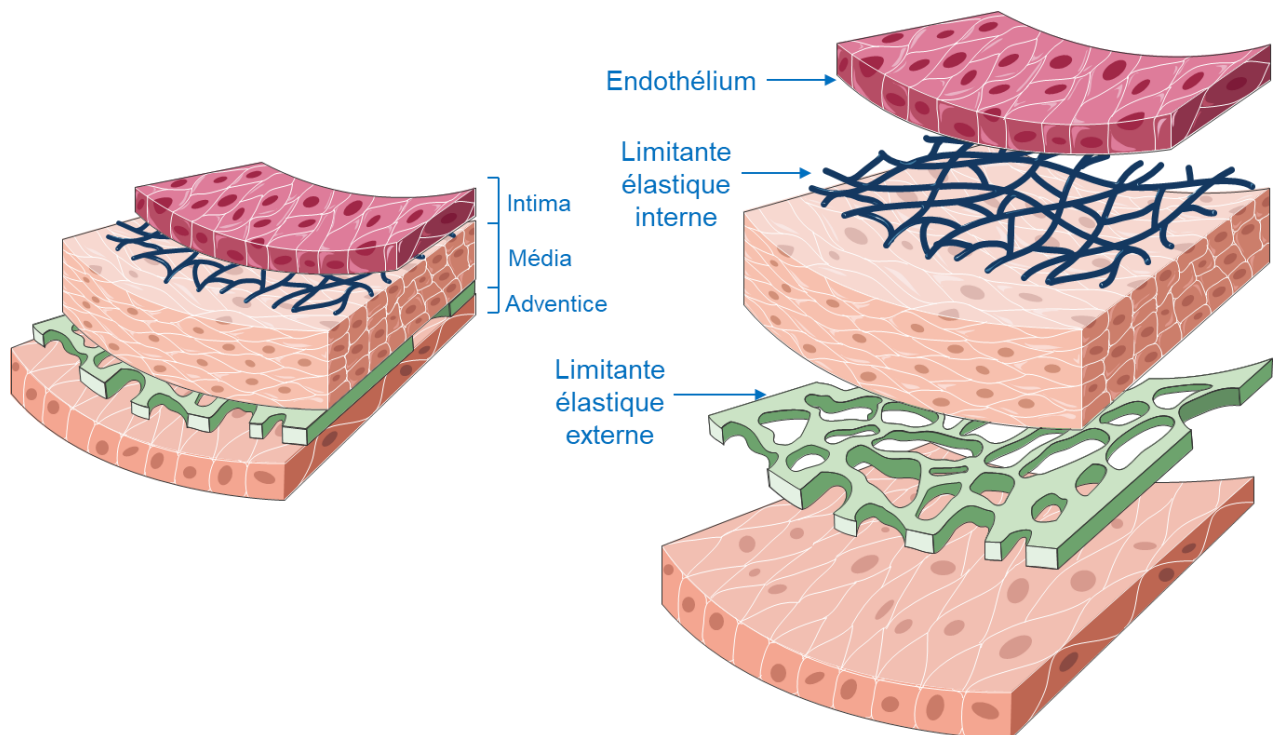


Figure 18 : Représentation schématique des trois tuniques de la paroi artérielle (adaptée d'après Servier medical art gallery)

1.1 Intima

L'intima est constituée d'une monocouche de CE adhérentes et interconnectées qui forment l'endothélium et qui tapissent la lumière du vaisseau sanguin. L'intima est ancrée à la membrane basale sous-jacente qui est une matrice extracellulaire hautement spécialisée composée principalement de laminine, de collagène de type IV, de fibronectine et de protéoglycanes. Cette membrane basale joue également un rôle central dans les événements de

signalisation qui régulent la migration, l'invasion, la prolifération et la survie des CE (Jana et al., 2019).

La membrane basale ainsi que la limitante élastique interne servent d'interface entre l'intima et la média. Cette limitante élastique interne est une fine couche de fibres élastiques avec un nombre variable de fenestrations qui facilitent la diffusion des molécules à travers l'intima vers la média (Jana et al., 2019).

Physiologiquement, le rôle le plus important de l'endothélium dans les artères est de séparer physiquement et fonctionnellement le compartiment sanguin circulant du compartiment tissulaire (J.-B. Michel et al., 2007). L'endothélium est une barrière hautement sélective et métaboliquement active. Il joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en maintenant un équilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction (K.-H. Park & Park, 2015). De plus, il produit des molécules antithrombotiques telles que le monoxyde d'azote, la prostacycline, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), la thrombomoduline, les molécules de type héparine et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire. Il joue notamment le rôle d'une barrière semi-perméable qui régule le passage des liquides et des solutés, y compris les lipoprotéines, entre le sang et la paroi des vaisseaux (Otsuka et al., 2012).

Le dysfonctionnement endothélial se caractérise par une altération de la vasodilatation et par une activation des états pro-inflammatoires et pro-coagulants, ce qui entraîne des maladies cardiovasculaires. A un stade plus avancé l'endothélium peut se décrocher de sa matrice sous-jacente sous l'effet des forces de friction (érosion) (Otsuka et al., 2012).

1.2 Média

La média est la principale composante structurelle de la paroi artérielle, lui conférant la capacité de résister au stress mécanique et aux agressions biologiques provenant du sang (K.-H. Park & Park, 2015). Elle est organisée en unités lamellaires contenant les cellules musculaires lisses (CML) qui sont les cellules majeures de la média et qui sont entourées de fibres élastiques, de fibres de collagènes et de glycosaminoglycanes (K.-H. Park & Park, 2015).

La média est séparée de l'intima par la limitante élastique interne et de l'adventice par la limitante élastique externe. La média est dépourvue de *vasa-vasorum* (un réseau complet de petits vaisseaux sanguins) à l'exception de la partie externe de l'aorte thoracique (K.-H. Park & Park, 2015).

1.2.1 Les cellules musculaires lisses vasculaires

1.2.1.1 Origine des cellules musculaires lisses vasculaires

L'origine des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) est complexe, avec la contribution de plusieurs lignées cellulaires indépendantes (**Figure 19**). Par exemple, les CMLv dans la région céphalique, les CMLv de l'aorte ascendante et de la crosse aortique ont pour origine la crête neurale (Wasteson et al., 2008).

En effet, lors de la vasculogénèse, les angioblastes se différencient du mésoderme pour former des cellules endothéliales (CE) qui fusionnent et donnent naissance au réseau vasculaire primitif (Owens, 1995). Le développement de plus gros vaisseaux sanguins se poursuit (artères, veines, artérioles, capillaires, veinules) en impliquant le recrutement des cellules précurseurs des CML d'origine mésenchymateuse et de formes irrégulières qui vont entourer les tubes endothéliaux déjà formés et se transformer progressivement en des CMLv (Carmeliet, 2005). La différenciation des CMLv se caractérise par l'adhésion puis par l'expression des marqueurs protéiques et par l'acquisition des propriétés contractiles caractéristiques des CMLv (G. Wang et al., 2015).

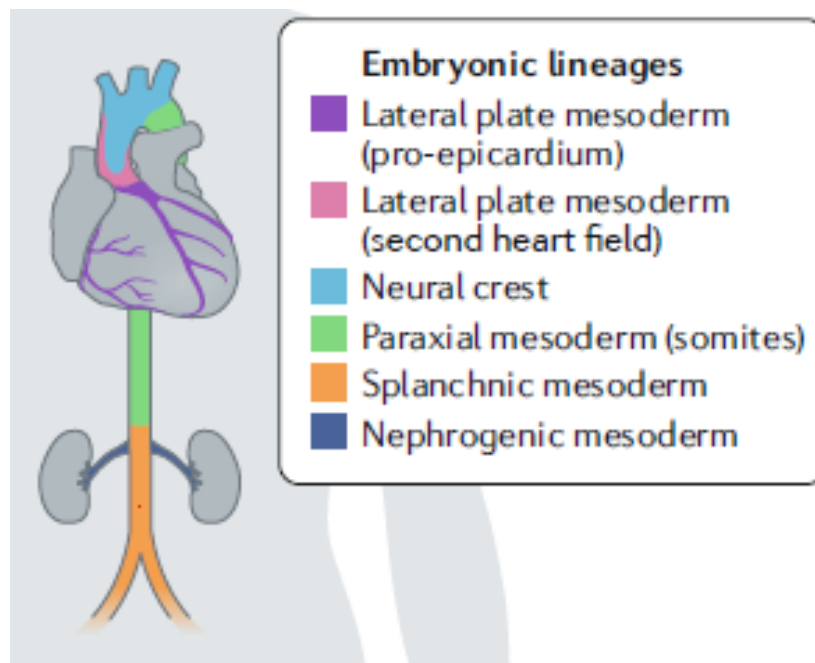


Figure 19 : Les cellules progénitrices des CMLv durant l'embryogenèse (Basatemur et al., 2019)

Au cours de l'embryogenèse, les CMLv naissent des cellules progénitrices originaires de différentes lignées cellulaires.

1.2.1.2 Structure et Fonctions des CMLv

Le système artériel est divisé en trois compartiments correspondants à trois structures/fonctions des cellules musculaires lisses :

- les artères de conductance, artères élastiques, véhiculant le sang du coeur vers les organes cibles dans les tissus conjonctifs propres
- les artères musculaires lisses des pédicules vasculo-nerveux propres à chaque organe (artères rénales, mésentériques, carotides, etc.) dont le diamètre s'adapte au flux sanguin par le fait de l'augmentation du cisaillement (forces de friction) endothéliale
- les artères de résistance, intra-organe, dont les diamètres sont modulés localement par des signaux initiés par les besoins métaboliques de chaque organe en activité. L'ensemble du système résistif définit les résistances périphériques à l'écoulement, principal déterminant de la pression artérielle. Elles protègent également la microcirculation capillaire en dissipant les énergie cinétiques (vitesse) et potentielles (pression) précapillaire (J.-B. Michel, 2020).

Dans les artères saines, les CMLv ont une forme fusiforme, elles sont adhérentes et différenciées. Ce sont des cellules localisées dans la média des artères où leur principale fonction est la contraction/relaxation et la production de la matrice extracellulaire (MEC) dans les artères de conductance. Elles jouent un rôle important dans la compliance artérielle et la distanciation élastique en réponse à des conditions hémodynamiques cycliques, systolo/diastoliques, permettant de réguler ainsi le tonus et le diamètre des vaisseaux et donc de contrôler la pression artérielle sanguine et la distribution du flux sanguin en fonction des besoins métaboliques spécifiques (Basatemur et al., 2019; Gomez & Owens, 2012).

Le tonus contractile des CMLv est dû à l'innervation par le système nerveux sympathique et au taux de calcium intracellulaire. En revanche, la relaxation de ces cellules se produit soit à la suite de la suppression du stimulus tonique de contraction, soit par l'action directe des médiateurs locaux inhibant localement le tonus contractile (Webb, 2003).

Les CMLv peuvent acquérir différents phénotypes en réponse à différentes conditions physiologiques et pathologiques, et ceci grâce à leur plasticité phénotypique. Ainsi, les CMLv possèdent deux phénotypes majeurs, contractile et sécrétoire. Leurs deux principales fonctions sont donc respectivement : contrôler le tonus musculaire et synthétiser la MEC (Owens, 1995).

1.2.1.2.1 Phénotype contractile

Dans les vaisseaux sanguins, les CMLv prolifèrent à un taux extrêmement bas et présentent une très faible activité synthétique. Elles expriment un répertoire unique de protéines du cytosquelette, de canaux ioniques et de molécules de signalisation nécessaires à leur fonction contractile (Owens et al., 2004).

A l'état différencié, les CMLv expriment des protéines contractiles notamment l' α -actine (α SMA) et la chaîne lourde de la myosine également connue sous le nom de myosine 11 (MYH11). Ces protéines contractiles sont organisées en myofilaments (Basatemur et al., 2019).

1.2.1.2.2 Phénotype sécrétoire

Les CMLv ont également d'importantes fonctions synthétiques pendant le développement. Après une lésion vasculaire, elles sont migratoires et prolifératives (Owens, 1995). Elles synthétisent et sécrètent des molécules insolubles de la MEC tels que les fibres des élastines et des collagènes ainsi que les protéoglycanes (Basatemur et al., 2019). Les CMLv se caractérisent par des altérations de leur ultrastructure cellulaire, notamment une perte générale des myofilaments qui sont remplacés en grande partie par des organelles synthétiques comme le Golgi et le réticulum endoplasmique rugueux. Ceci provoque un changement de morphologie des cellules qui passent d'une forme allongée typique à une forme arrondie. Ces changements provoquent également des modifications de la membrane basale (Owens et al., 2004).

1.2.1.2.3 Phénotype endocytaire et phagocytaire

Il a été récemment montré que les CMLv avaient des fonctions d'endocytose de solutés et phagocytose particulaire (macrophage-like) incluant l'efferocytose des cellules mortes ou prémortelles exposant la phosphatidylsérine comme signal de reconnaissance. Ce changement de phénotype est provoqué par le changement de l'environnement des CMLv. Cette fonction de clearance des CMLv joue un rôle primordial dans le développement de l'athérosclérose (Bäck & Michel, 2021).

1.2.1.2.4 Phénotype procalcifiant

Dans un environnement riche en phosphates exposés, les CMLv acquièrent un phénotype pro-calcifiant caractérisé par une expression génique différenciée. Le marqueur le plus classique est l'induction de du gène *Run X*, marqueur de la fonction ostéoblastiques (Bäck & Michel, 2021).

1.2.1.3 Différenciation et Plasticité des CMLv

1.2.1.3.1 Différenciation des CMLv

La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules multipotentes de l'organisme en développement acquièrent des caractéristiques spécifiques qui les distinguent des autres types cellulaires. Bien que le processus de différenciation cellulaire soit assez complexe, il peut être subdivisé en trois composants régulateurs majeurs : 1) l'activation des gènes requis pour la ou les fonctions de la cellule différenciée ; 2) le contrôle coordonné de l'expression de gènes sélectifs et/ou spécifiques de la cellule à des moments précis et en quantité adaptée; 3) la régulation continue de l'expression des gènes par le biais des effets environnementaux locaux sur le programme génétique ce qui permet de déterminer la lignée cellulaire, y compris le contrôle de la structure de la chromatine ou la programmation épigénétique qui peut influencer la capacité des facteurs de transcription à accéder aux régions régulatrices des gènes (Owens et al., 2004).

La compréhension de la différenciation des CMLv constitue un défi majeur puisque ces cellules peuvent présenter un large éventail de phénotypes différents à différents stades de leur développement. Même chez les adultes, la cellule n'est pas totalement différenciée et est capable de changements majeurs de son phénotype en réponse à des modifications de son environnement (Owens et al., 2004).

1.2.1.3.2 Plasticité des CMLv

Les CMLv matures ont un phénotype différencié et entièrement fonctionnel dans les vaisseaux sains, tout en conservant une plasticité remarquable contrairement aux cellules musculaires squelettiques ou cardiaques qui sont différenciées de façon définitive. En effet, comme déjà mentionné, les CMLv peuvent subir des modifications réversibles du phénotype en réponse aux signaux environnementaux, y compris les facteurs de croissance, l'épigénétique, les forces mécaniques, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, les lipides extracellulaires, ainsi que divers médiateurs de l'inflammation de la paroi artérielle lésée comme le cas de l'athérosclérose. C'est le changement phénotypique (**Figure 20**) (Allahverdian et al., 2018).

A ce stade, les CMLv se caractérisent par une réduction de la densité des myofilaments et une baisse de l'expression des protéines contractiles. Elles ont également une expression plus élevée des composants de la MEC. Par conséquent, les CMLv ayant un phénotype modifié sont souvent qualifiées de « synthétiques », alors que celles qui expriment des niveaux élevés des

protéines contractiles sont généralement décrites comme « contractiles » (Basatemur et al., 2019; Owens et al., 2004).

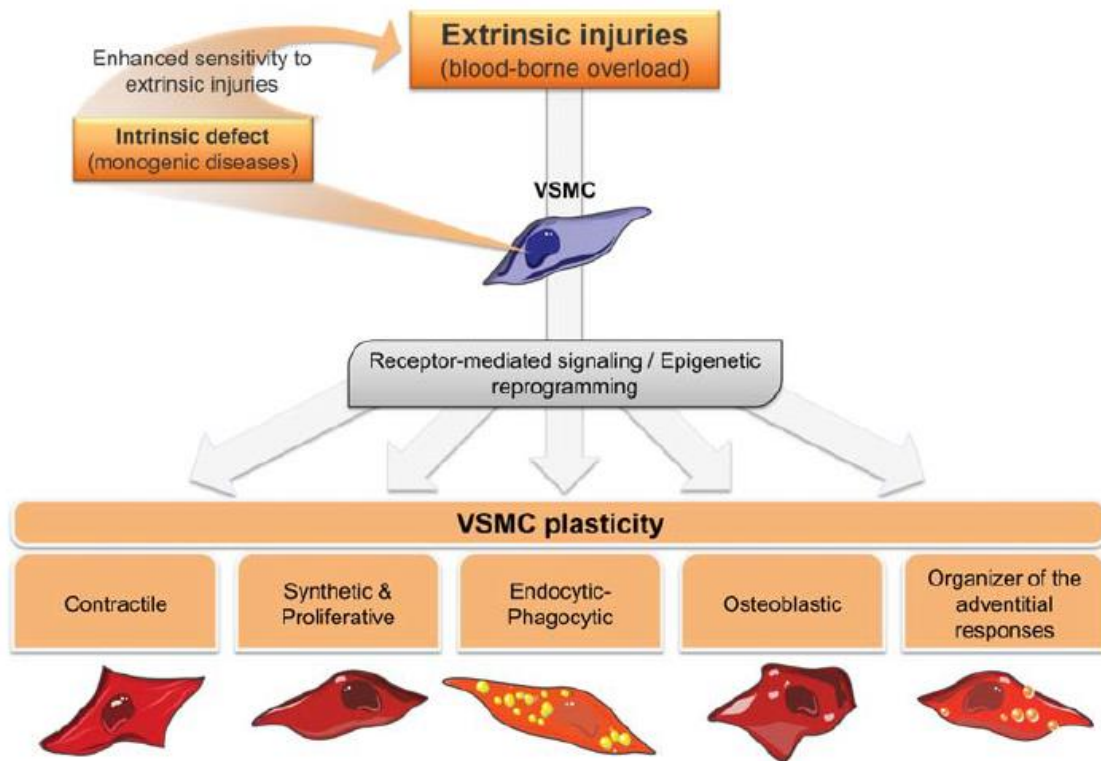


Figure 20 : Plasticité des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv). Les CMLv reprogramment leur modèle d'expression en réponse à des stimuli aigus et chroniques (J.-B. Michel et al., 2012)

En réponse aux changements de leur microenvironnement dépendant de la convection des molécules plasmatiques circulantes, les CMLv peuvent soit mourir, soit s'adapter en modifiant leur phénotype d'une façon aigue par des interactions ligands/récepteurs, ou d'une façon chronique par une signalisation nucléaire impliquant des régulations épigénétiques de la structure de la chromatine. Ces concepts physiopathologiques illustrent le rôle important de la plasticité des CMLv en réponse à de nombreux stimuli, et leur capacité à passer d'un phénotype contractile à un phénotype migratoire, prolifératif, synthétique, endocyttaire, phagocytaire ou ostéoblastique.

1.2.1.3.3 Les marqueurs du phénotype contractile versus sécrétoire des CMLv

L'étape initiale de l'étude de la différenciation cellulaire consiste à identifier un ensemble de gènes cibles spécifiques et sélectifs qui contribuent aux diverses fonctions des cellules. Ceci est difficile dans le cas des CMLv du fait des diverses fonctions de ces cellules. De plus, la plupart des marqueurs des CMLv, bien que sélectifs pour ce type de cellules chez les adultes, peuvent être exprimés (au moins de façon transitoire) dans d'autres types cellulaires pendant

le développement, la réparation tissulaire ou dans les états pathologiques. Cependant, une variété de gènes et de protéines spécifiques aux CMLv ont été identifiés et servent de marqueurs de l'état de différenciation-maturation des CMLv (Owens et al., 2004).

La transition vers un phénotype synthétique se traduit par un passage progressif d'un état différencié à un état dédifférencié, défini par la diminution ou la perte de plusieurs protéines du cytosquelette spécifiques aux CMLv (Owens, 1995).

L'expression de l'alpha actine ou **α -SMA** (alpha smooth muscle actin, codée par le gène *ACTA2*) est réduite ou perdue pendant le processus de dédifférenciation. Notons que l' α -SMA est l'isoforme de l'actine le plus abondant des CMLv matures et différenciées (40% des protéines totales) (Owens, 1995) et est également exprimée dans les CMLv depuis les premiers stades du développement (Allahverdian et al., 2018). Cependant, ce marqueur est présent dans d'autres types de cellules à l'état physiologique comme les cellules des muscles squelettiques et cardiaque au cours du développement ainsi que dans des cellules à l'état pathologique telles que les cellules tumorales. Il est essentiellement exprimé par les CMLv et les fibroblastes. Ainsi pour discriminer entre les CMLv différenciées et les autres types cellulaires, l'alpha actine n'est pas un marqueur suffisant (Owens et al., 2004).

Les autres marqueurs des CMLv perdus au cours de la dédifférenciation sont les deux isoformes distinctes de la chaîne lourde de la myosine (**MHC** : myosin heavy chain) codés par le gène *MYH11*. Ces deux isoformes, SM-1 et SM-2 (SM : smooth muscle), sont exprimés dans les CMLv adultes (Allahverdian et al., 2018).

Il existe également la transgeline (**SM22 α**) codée par le gène *TAGLN*. C'est une protéine cytosquelettique de 22 kDa, exprimée dans les CMLv. Elle se lie à l'actine et joue un rôle dans la contractilité et la différenciation des CMLv. Elle peut être utilisée comme un marqueur du remodelage vasculaire, notamment dans l'hypertension artérielle (Delbosc et al., 2008).

La **smootheline** est une protéine du cytosquelette co-localisée avec l'alpha actine et exprimée par les CMLv contractiles. Il existe deux isoformes chez l'adulte : 59 et 110 KD, exprimés respectivement dans les CML viscérales et vasculaires. Ce marqueur différencie les CMLv des autres cellules telles que les myofibroblastes) (Lepreux et al., 2013).

Les protéines régulées dans les CMLv contractiles et synthétiques sont résumées dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Expression des protéines des CMLv contractiles et synthétiques (adapté (Allahverdian et al., 2018))

Protéines	Abréviations	Phénotype contractile	Phénotype sécrétoire
<i>Protéines cytosquelettiques</i>			
Alpha actine (<i>ACTA-2</i>)	α -SMA	+++	+
Chaîne lourde de la myosine (<i>MYH11</i>)	SMMHCs	+	-
Transgéline (<i>TAGLN</i>)	SM22 α	+	-
Desmine	-	+	-
Smootheline	-	+	-
Calponine (<i>CNN1</i>)	-	+	-
Tropomyosine	-	+	-
Heavy-caldesmon	H-caldesmon	+	-
Vinculine	-	+	-
Léiomodine 1	LMOD1	+	-
Cytokératine 8/18	CK8 et 18	-	+
Zonula occludens-2 protein	ZO-2	-	+
Cinguline	-	-	+
<i>Composants liés à la MEC</i>			
Collagène VIII	-	-	+
Ostéopontine	OPN	-	+
Métalloprotéinases matricielles -2,-9	MMP-2 et -9	-	+
Activateur du plasminogène de type urokinase	u-PA	-	+
Activateur tissulaire du plasminogène	t-PA	-	+
<i>Les protéines de liaison au calcium</i>			
S100A4	-	-	+
Calmodulin	CaM	-	+
<i>Cytokine</i>			
Monocyte chemo-attractant protein 1	MCP1	-	+
Interleukines-1b and -6	IL-1b et -6	-	+
Tumor necrosis factor- α	TNF- α	-	+
<i>Molécules transmembranaires</i>			
α 1b1, α 7b1, α 8b1 Intégrines	-	+	-
α 2b1, α 5b1, α vb3 Intégrines	-	-	+
Intercellular adhesion molecule-1	ICAM-1	-	+
Vascular cell adhesion molecule-1	VCAM-1	-	+
<i>Récepteurs</i>			
Toll-like receptors 2 et 4	TLR-2 et -4	-	+

1.2.2 La Matrice Extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) synthétisée par les CMLv est un assemblage de macromolécules qui fournissent un soutien ainsi que des propriétés élastiques à la paroi vasculaire. Outre son rôle structural, la MEC régule les processus cellulaires, notamment leur capacité à migrer, à proliférer et à survivre aux blessures (Raines, 2000). La MEC englobe les cellules qui la synthétisent et détermine leur phénotype. La MEC est synthétisée pendant le développement et la croissance de l'individu et est altérée lors de tout processus pathologique (Jacob, 2006).

Les macromolécules qui constituent la matrice extracellulaire sont : les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes. Les interactions qui existent entre ces composants sont essentielles au maintien de la cohésion tissulaire.

1.2.2.1 Les collagènes

Les collagènes forment une famille de 28 membres distincts regroupés en deux sous-groupes : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Chaque molécule de collagène est une triple hélice de trois chaînes α polypeptidiques, chacune ayant une séquence répétitive glycine-X-Y où le X est le plus souvent une proline et le Y est une hydroxyproline. Les collagènes les plus représentés dans les vaisseaux sont les collagènes I, III et IV. Leur fonction principale est de conférer la solidité (résistance à la rupture) et la rigidité à la paroi artérielle (Jacob, 2006; Raines, 2000).

1.2.2.2 L'élastine

L'élastine est une macromolécule qui constitue avec le collagène les composants majeurs de la MEC (Halper & Kjaer, 2014). L'élastine confère ses propriétés élastiques à la paroi artérielle (résistance à la dilatation) afin de s'adapter aux changements hémodynamiques et à la pression (Raines, 2000).

L'élastine est synthétisée par une variété de cellules dont les fibroblastes, les cellules endothéliales et musculaires lisses, les chondrocytes et les kératinocytes (Halper & Kjaer, 2014). Elle constitue 90% des fibres élastiques des artères et est associée aux 10% restant qui sont des microfibrilles formées des glycoprotéines de structure comme les fibrillines et les MAGP (microfibril-associated glycoproteins) (Jacob, 2006). Dans les artères, les fibres élastiques sont organisées en lames concentriques parallèles qui séparent les différentes couches du vaisseau et forment des barrières entre les couches des CMLv (Raines, 2000).

1.2.2.3 Les glycoprotéines de structure

Les glycoprotéines de structure sont des macromolécules formées par la liaison entre des structures protéiques et des courtes chaînes glucidiques. Elles peuvent être soit ubiquitaires comme la fibronectine soit exprimées spécifiquement dans les membranes basales comme les laminines. Ces glycoprotéines présentent une hétérogénéité de leur taille, leur structure et leur distribution tissulaire. Cependant, elles présentent plusieurs similarités : 1) présence de plusieurs domaines structuraux et fonctionnels, 2) présence de plusieurs sites de fixation aux cellules via les intégrines ou autres récepteurs dont le plus fréquent possède la séquence RGD (Arg-Gly-Asp), 3) présence de plusieurs sites d'interaction avec les autres macromolécules de la MEC (Jacob, 2006).

La fibronectine est une protéine ayant un poids moléculaire de 230-270 kDa. Elle est synthétisée par les hépatocytes, se trouve à des concentrations plasmatiques importantes et est également détectée dans la MEC vasculaire où elle est synthétisée par les CMLv de la média artérielle. La fibronectine est importante durant le développement embryonnaire et est essentielle pour la migration et la différenciation de plusieurs types cellulaires. Elle joue un rôle dans la fixation des cellules à leur MEC et dans l'organisation du cytosquelette (Halper & Kjaer, 2014).

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques formées des 3 chaînes α , β et γ et ayant un poids moléculaire de 850 kDa. Elles sont localisées dans les membranes basales des cellules endothéliales et des CMLv où elles contrôlent l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la polarisation des cellules avec lesquelles elles interagissent (Halper & Kjaer, 2014; Jacob, 2006).

1.2.2.4 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine appelée « core protein » reliées à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), des chaînes sucrées chargées négativement et très hydrophiles, qui jouent divers rôles dans la régulation de la structure et dans la perméabilité de la matrice (Jacob, 2006).

Les variations du type des monosaccharides et la présence ou l'absence de modification par sulfatation donnent lieu aux différentes catégories principales de GAG, notamment l'acide hyaluronique (le seul GAG non sulfaté), l'héparine/héparane sulfate, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et la kératane sulfate. Leur nomenclature se base sur leurs fonctions et sur la

qualité de la chaîne protéique (versicane, décorine). Les groupements carboxylates et sulfates sont fortement chargés négativement, une caractéristique qui va permettre aux GAG d'acquérir des propriétés de rétention d'eau, essentielles aux variations de la pression sanguine des vaisseaux (Casale & Crane, 2022).

1.3 Adventice

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi artérielle. Elle est composée d'un réseau de tissu conjonctif comprenant des fibres de collagène, du *vasa vasorum*, des terminaisons nerveuses, quelques cellules inflammatoires résidentes et des fibroblastes (J.-B. Michel et al., 2007). Grâce aux terminaisons nerveuses, l'adventice joue un rôle dans le contrôle du calibre (lumière) des vaisseaux en régulant le tonus des CMLv de la média (Majesky et al., 2011). Tous ces composants font de l'adventice la couche la plus hétérogène et la plus complexe de la paroi des vaisseaux.

1.3.1 Vasa Vasorum

Le *Vasa vasorum* (mot latin signifiant « vaisseaux des vaisseaux ») est un réseau complet de petits vaisseaux sanguins comprenant des artérioles, des capillaires et des veines. Les artérioles sont impliquées dans l'approvisionnement de la partie externe de la paroi artérielle en nutriments et en oxygène. Quant aux capillaires et aux veines, ils sont impliqués dans les échanges cellulaires et moléculaires y compris le drainage des composants solubles de la paroi (J.-B. Michel et al., 2007).

1.3.2 Les fibroblastes

Les fibroblastes constituent le type cellulaire le plus abondant de l'adventice vasculaire. Les fibroblastes proviennent d'au moins trois origines cellulaires distinctes : les cellules primaires mésenchymateuses, la transition épithélio-mésenchymateuse locale et les précurseurs dérivés de la moelle osseuse (Stenmark et al., 2013).

Les fibroblastes assurent la production et l'organisation des composants de la MEC conférant aux tissus une résistance mécanique. De plus, ces cellules sont capables de proliférer et de se différencier face aux agressions vasculaires tout en produisant des espèces réactives d'oxygène (ROS : reactive oxygen species), des chimiokines, des cytokines, des métalloprotéinases et de facteurs de croissance affectant ainsi le tonus et la croissance des CMLv et favorisant le déclenchement du processus inflammatoire (Stenmark et al., 2013).

2. Physiopathologie de l'athérome humain

L'athérosclérose est une maladie progressive et chronique qui touche les artères de gros et moyen calibre provoquant des cardiopathies ischémiques, des AVC et des maladies vasculaires périphériques, regroupés sous le nom des maladies cardiovasculaires (MCV) (Kobiyama & Ley, 2018). L'athérosclérose se développe tôt dans la vie sur des sites tels que les branches ou les courbures des artères où les forces de cisaillement sont faibles et le flux sanguin est perturbé (Chiu & Chien, 2011; Falk et al., 2013).

La physiopathologie de l'athérosclérose est complexe avec un rôle important des cellules immunitaires surtout à la fin de l'évolution de la maladie et d'autres acteurs cellulaires tels que les cellules endothéliales et les CMLv en association avec l'hyperlipémie notamment les taux élevés des LDL modifiées (oxydées, agrégées...) (Schaftenaar et al., 2016). Ces interactions cellulaires sont importantes car les CMLv subissent un changement phénotypique dépendamment de leur microenvironnement (Ramel et al., 2019). En effet, les études histologiques des plaques d'athérosclérose provenant des autopsies humaines et des modèles animaux ont révélé que les CMLv contribuent largement au développement de la plaque à tous les stades (Basatemur et al., 2019).

2.1 Classification des lésions athéromateuses

L'American Heart Association (AHA) avait classifiée les différentes lésions athéromateuses en 6 catégories distinctes : type I (lésions initiales), type II (stries lipidiques), type III (lésions intermédiaires), type IV (athérome), type V (fibro-athérome / lésions

fibrolipidiques) et type VI (lésions compliquées) (Stary et al., 1995). Cependant, cette classification ne couvrait pas tous les types de lésions. Ainsi une classification dynamique, plus physiopathologique, qui se base sur la morphologie descriptive des lésions avec une implication minimale des mécanismes impliqués a été instaurée (Virmani et al., 2000). Cette nouvelle classification divise les lésions en : lésions pré-athéromateuses, lésions athéromateuses progressives et lésions complexes.

2.1.1 Les lésions pré-athéromateuses

L'**épaississement intimal diffus** (DIT : diffuse intimal thickening) est souvent observé dans les artères sujettes à l'athérosclérose (artères coronaires, carotides et iliaques ainsi que l'aorte abdominale et thoracique descendante). Il est présent dès la naissance et est considéré comme une réponse physiologique au flux sanguin plutôt qu'un processus athéromateux (Yahagi et al., 2016). En revanche, la distribution des DIT chez les jeunes individus est similaire à celle des plaques d'athérosclérose à un âge plus avancé et ils sont largement considérés comme le précurseur le plus probable des plaques d'athérosclérose (Basatemur et al., 2019). Les DIT humains sont formés de CMLv, de protéoglycanes et d'élastine et sont dépourvus de macrophages et de thrombus (Basatemur et al., 2019).

Les **stries lipidiques** sont dues à la convection des LDL plasmatiques riches en cholestérol et phospholipides à travers la paroi artérielle et leur rétention suite à l'interaction entre les apolipoprotéines notamment l'apoB-100 avec les protéoglycanes sécrétés par les CMLv de l'intima, conduisant ainsi à l'accumulation de LDL dans la couche sous-endothéliale (Tabas et al., 2007). Cette rétention lipidique se traduit par des stries lipidiques sous endothéliales, identifiées macroscopiquement comme des bourrelets jaunes sur la surface lisse luminale de la paroi artérielle. Microscopiquement, ces renflements lipidiques se développent sur un fond riche en CMLv capables de synthétiser des protéoglycanes. A ce stade, l'accumulation des lipides peut être intracellulaire et extracellulaire. Lorsqu'elle est observée en intracellulaire, elle représente les cellules spumeuses (J. Michel & Ho-Tin-Noé, 2017).

2.1.2 Les lésions athéromateuses progressives

La première étape de l'athérosclérose est la **prolifération intimale** caractérisée par la présence de pools lipidiques extracellulaires comprenant du cholestérol libre au sein d'une

MEC riche en protéoglycanes et en glycosaminoglycanes (dont l'hyaluronane). Le type cellulaire dominant à ce stade est les CMLv de l'intima qui sont considérées comme la source principale de la MEC et qui jouent un rôle dans la rétention des lipides. Une fois retenues, les LDL seront oxydées ce qui déclenche le recrutement des macrophages ainsi que la prolifération, le changement phénotypique, voire la mort des CMLv. La mort progressive des cellules spumeuses induit le relargage de leur contenu en cholestérol. Ainsi, les microcalcifications observées au sein des pools lipidiques peuvent avoir comme source les CMLv activées (nombreux exosomes) voire des corps apoptotiques riches en phosphates exposés (Basatemur et al., 2019; Yahagi et al., 2016).

La prolifération intimale peut évoluer vers des **lésions fibrolipidiques** qui constituent un stade ultérieur de la maladie caractérisé par la présence d'une chape fibreuse et d'un noyau lipidique acellulaire généré par les pools lipidiques extracellulaires et par une efférocytose insuffisante des cellules spumeuses mortes (CMLv et macrophages) qui vont subir une nécrose secondaire et libérer des facteurs inflammatoires. Ce noyau lipidique acellulaire est pauvre en MEC et présente des calcifications plus étendues qui résultent de la libération des corps apoptotiques et de l'activité de cellules ostéochondrogéniques dont l'origine pourrait être les CMLv (Basatemur et al., 2019). Macroscopiquement, les bourrelets jaunes des stries lipidiques se recouvrent de bourrelets blancs qui représentent la prolifération des CMLv et la fibrose (**Figure 21**).

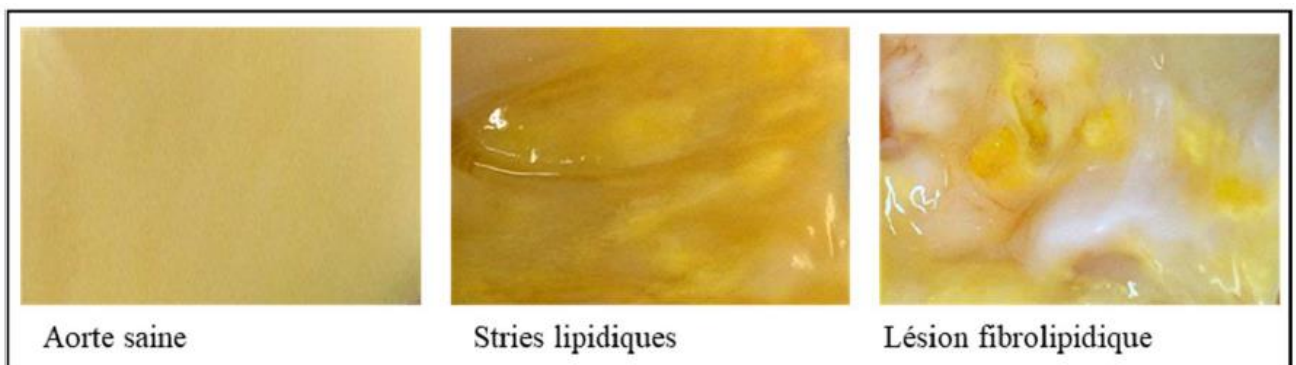


Figure 21 : Les aspects macroscopiques des stades de l'athérome humain utilisés dans notre étude.

2.1.3 Les lésions complexes

Les principales manifestations cliniques de l'athérosclérose causées le plus souvent par la présence d'une thrombose, dépendent de la localisation anatomique du vaisseau concerné

(angine de poitrine et infarctus du myocarde dans les coronaires et accident vasculaire cérébral dans les artères carotides). La cause primaire (représentant près de 60 -70% des cas) de la thrombose est la rupture de la plaque alors que les autres cas sont principalement le résultat de l'érosion de la plaque (Basatemur et al., 2019). La rupture de la plaque est le résultat d'une angiogenèse centripète à point de départ adventiciel. Le mécanisme de l'angiogenèse est lipide-dépendant. C'est la réponse tissulaire aux médiateurs lipidiques, aux phospholipides et aux prostaglandines synthétisés par l'intima. Suite à la convection pariétale de ces composants, le PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma) sera activé et induit la surexpression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par les CMLv de la média. Ce VEGF va stimuler le développement centripète des vaisseaux adventiciels (de l'adventice vers l'intima) en direction de la plaque (Ho-Tin-Noé & Michel, 2011). Cette néo-angiogenèse est la principale cause des hémorragies intraplaques et la formation d'hématome intraplaque qui accumulent des neutrophiles et des plaquettes riches en activités protéolytiques (MMP-P (matrix métalloprotéinase protein-9) et élastase) et oxydatives (myéloperoxydase) ce qui conduit à l'érosion/rupture de la plaque (J.-B. Michel et al., 2014). Finalement, dans la minorité des cas, les nodules calcifiés peuvent faire protrusion dans la lumière et entraîner ultérieurement la formation du thrombus (Pasterkamp et al., 2017).

2.2 Les acteurs impliqués dans la formation de la plaque athéromateuse

2.2.1 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont à l'origine de l'athérosclérose notamment les LDL. Ces dernières sont des particules lipidiques sphéroïdales riches en cholestérol, enveloppées d'un revêtement phospholipidique avec une apolipoprotéine B entourant leur région équatoriale et qui transportent le cholestérol insoluble dans l'eau à travers le sang. L'athérosclérose se produit probablement à la suite des concentrations élevées des LDL-C qui dépassent les besoins physiologiques (Libby et al., 2019). Les causes génétiques responsables de l'élévation du taux de cholestérol et de LDL-C causant les MCV sont détaillées dans le chapitre 1.

2.2.2 Les Récepteurs des lipoprotéines

Depuis la découverte du LDLr, de nombreux récepteurs apparentés sur le plan structurel et fonctionnel ont été identifiés. Ces récepteurs forment la famille des LDLr et comprennent les « LDL receptor-related proteins ou LRP », les récepteurs des VLDL et le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E. En plus de leur rôle initial dans le transport du cholestérol, ces LRP ont une large gamme de fonctions supplémentaires qui influencent divers processus physiologiques et pathologiques, notamment le développement embryonnaire, l'inflammation, la thrombose, l'hyperplasie néo-intimale et l'athérosclérose. De leur côté, les récepteurs éboueurs ou « scavengers » constituent une autre famille de récepteurs structurellement différents de la famille des LDLr et qui reconnaissent un large éventail de ligands dont les LDL oxydées (Mineo, 2020).

Dans cette partie, je détaillerai les récepteurs LRP-1, LOX-1 et CD36 afin d'évoquer le rôle joué par ces récepteurs dans le développement de l'athérosclérose.

2.2.2.1 Récepteurs « LDL receptor-related proteins » ou LRP

Le récepteur des LDL est le membre fondateur d'une superfamille constituée de plusieurs protéines transmembranaires structurellement apparentées (Roslan et al., 2019). Les membres de cette famille sont des récepteurs transmembranaires ancrés à la surface de la cellule. Ils interagissent avec divers groupes de ligands les délivrant aux lysosomes pour être dégradés (Hussain et al., 1999). Alors que le rôle principal du LDLr se limite à la régulation de l'homéostasie du cholestérol, il existe des études qui montrent que les autres membres de la famille ont des fonctions physiologiques supplémentaires en tant que transducteurs de signaux. Ces protéines participent donc à un large panel de processus physiologiques, notamment la régulation du métabolisme lipidique, l'athérogenèse, le développement neurologique, la thrombose, le transport des nutriments et des vitamines. L'importance fonctionnelle de chaque récepteur réside dans leur différente expression tissulaire (May et al., 2007).

Dans cette partie, je vais développer le récepteur LRP-1, notamment sa structure, son expression, ses fonctions et son rôle dans l'athérogenèse vu qu'il est exprimé par les CMLv.

2.2.2.1.1 LDL Receptor related protein 1 (LRP-1)

i. Structure et Régulation

LRP-1 est un récepteur transmembranaire ayant à la fois des propriétés d'endocytose et de signalisation cellulaire (Emonard et al., 2014). Il a été initialement identifié comme étant le

récepteur impliqué dans l'internalisation des remnants des chylomicrons et responsable du catabolisme des complexes α 2-macroglobuline protéinase. À ce jour, on sait que LRP-1 se lie à plus de 40 ligands distincts qui n'ont aucun lien structurel entre eux (Mineo, 2020).

LRP-1 appartient à la famille des récepteurs des LDL et il est synthétisé sous forme d'une protéine transmembranaire glycosylée de 600 kDa qui est ensuite clivée par une furine convertase en deux sous-unités reliées par des liaisons non covalentes. Une sous-unité extracellulaire α de 515 kDa et une deuxième sous-unité β de 85 kDa contenant un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire unique et un domaine intra-cytoplasmique de 100 acides aminés (**Figure 22**) (Emonard et al., 2014).

LRP-1 est exprimé par les CMLv, les CE, des neurones, les macrophages, les fibroblastes, les hépatocytes, les adipocytes, les cellules tumorales, les neutrophiles et les lymphocytes T (J. Chen et al., 2021).

Le LRP-1 subit une régulation post-transcriptionnelle par clivage protéolytique de son domaine extracellulaire générant une forme soluble (sLRP-1). Cette forme a été signalée pour la première fois dans du plasma humain et se caractérise par la présence du domaine extracellulaire de la chaîne α reliée d'une façon non covalente au domaine transmembranaire de la chaîne β (Quinn et al., 1997). Ce clivage protéolytique se fait par des protéases transmembranaires tels que les métalloprotéinases et par d'autres enzymes identifiées tels que les ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 10, 17 et 12, la MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase) et le t-PA (Emonard et al., 2014). Un second clivage se fait par le complexe préséniline formé de protéines transmembranaires qui constituent les sous-unités catalytiques des γ -sécrétases. Ce clivage induit la libération du domaine intracellulaire (May et al., 2002).

L'expression de LRP-1 est également régulée dans les CMLv et les macrophages. En effet, les CMLv hypoxiques des lésions athéromateuses stimulent l'expression de LRP-1 via HIF-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α). A noter que LRP-1 et HIF-1 α sont colocalisés dans la lésion (Castellano et al., 2011). Dans les macrophages, l'expression de LRP-1 est diminuée par l'interféron γ et les lipopolysaccharides (LPS) (LaMarre et al., 1993).

De plus, LRP-1 est surexprimé dans plusieurs pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Kanekiyo & Bu, 2014) et la cardiomyopathie ischémique (Cal et al., 2012). Dans le cancer, l'expression de LRP-1 dépend du tissu, du sous-type et du grade du cancer. Il est surexprimé dans le cancer du sein, de l'endomètre et de la prostate. En revanche, il est régulé négativement

dans le cancer des poumons et le cancer folliculaire de la thyroïde (Emonard et al., 2014). Ainsi, LRP-1 joue un rôle important dans la physiopathologie humaine.

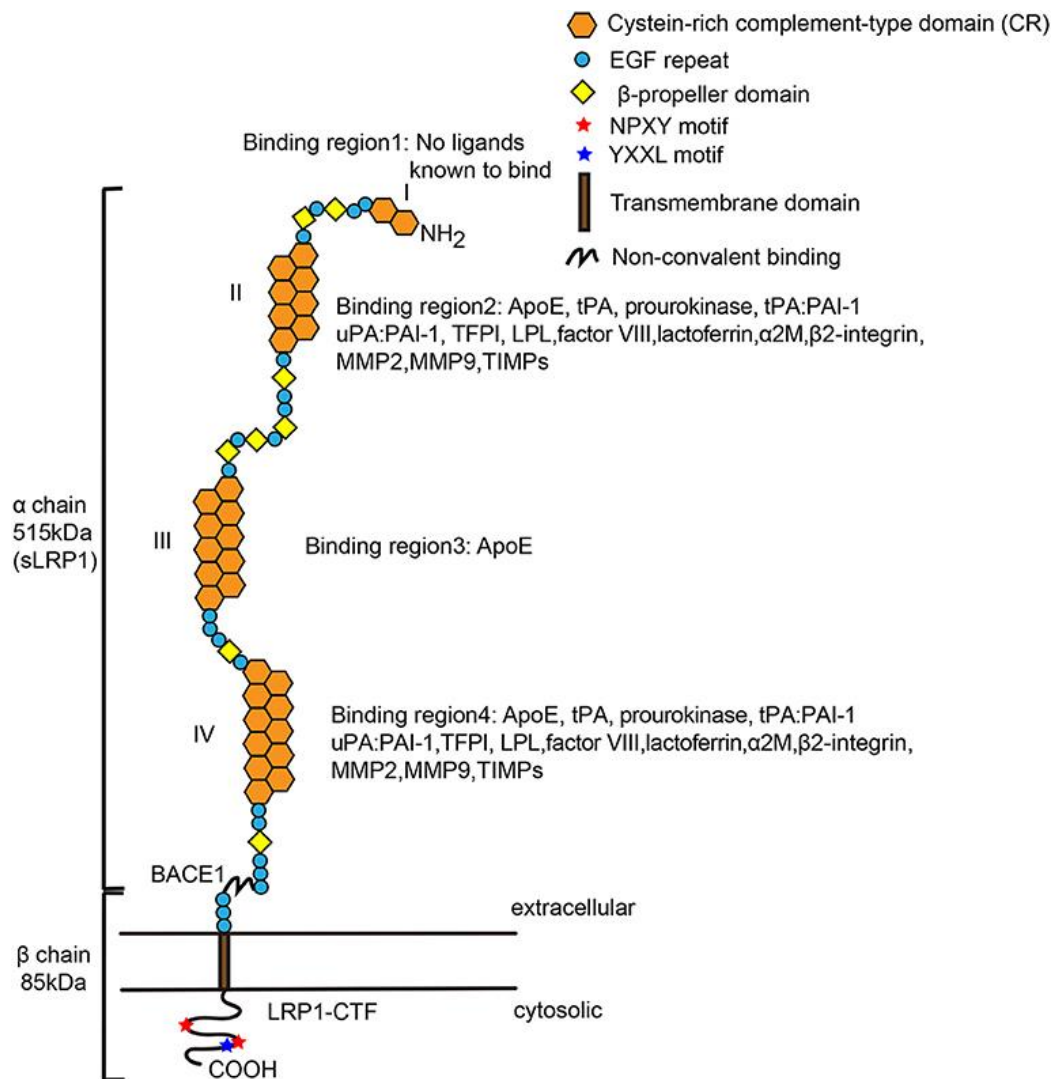


Figure 22 : Structure de la forme mature de LRP-1 (J. Chen et al., 2021)

LRP-1 est un récepteur multifonctionnel qui se lie à un large spectre de ligands extracellulaires et intracellulaires. La chaîne α contient des séquences répétées d'acides aminés riches en cystéine, ainsi que des séquences répétées de type EGF, des domaines de type β-propeller et de quatre domaines de liaison aux ligands (I, II, III, VI). La chaîne β contient deux motifs NPxY qui sont nécessaires à l'endocytose et à la signalisation. LRP-1 possède un motif YXXL adjacent qui permet une endocytose rapide. NPxY: Asn-Pro-X-Tyr, YXXL: Tyr-x-x-Leu.

ii. Fonctions de LRP-1

Comme décrit ci-dessus, le LRP-1 peut interagir avec différents ligands incluant les lipoprotéines, les protéines de la MEC, les facteurs de croissance, les complexes

protéases/antiprotéases et les toxines bactériennes. Chacun de ces ligands possède une ou plusieurs fonctions biologiques. Par conséquent, LRP-1 semble impliqué dans divers processus physiologiques et pathologiques (Emonard et al., 2014).

En effet, la délétion du gène *lrp-1* chez les souris entraîne une mort embryonnaire, révélant l'importance de ce récepteur au cours du développement (Boucher et al., 2003). De plus, LRP-1, via son domaine extracellulaire, est capable d'assurer l'internalisation et la clairance des ligands comme les remnants de lipoprotéines riches en triglycérides. Des études ont montré que la délétion du LRP-1 entraîne une augmentation des protéines plasmatiques (Emonard et al., 2014).

Des études GWAS ont révélé que le gène *LRP-1* représente un locus de susceptibilité aux anévrismes de l'aorte abdominale ainsi qu'à l'élévation des lipides plasmatiques et des maladies coronariennes (Bown et al., 2011; McCarthy et al., 2004; Teslovich et al., 2010).

LRP-1 est ainsi impliqué non seulement dans la régulation de processus physiologiques, mais également en situations pathologiques, notamment les pathologies vasculaires.

a. LRP-1 dans les CMLv et le développement de l'athérosclérose

Dans la paroi vasculaire, LRP-1 joue un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des CMLv et protège contre l'athérosclérose (Boucher & Herz, 2011). En effet, il a été démontré par Boucher et al. que les souris déficientes en *Lrp-1* dans les CMLv sur un fond génétique *Ldlr*^{-/-} et nourries par un régime riche en cholestérol, présentent une hyperplasie de la paroi aortique, une désorganisation de la couche élastique, la formation d'anévrismes aortiques et une susceptibilité accrue au développement des lésions athéromateuses (Boucher et al., 2003). Le mécanisme par lequel LRP-1 protège contre l'athérosclérose est médié par deux voies de signalisation distinctes des CMLv : la voie du facteur de croissance dérivé des plaquettes BB (PDGF-BB) et la voie du facteur de croissance transformant- β (TGF β). Ces deux voies sont responsables de la prolifération et de la migration des CMLv (Boucher et al., 2003).

Ces souris déficientes en *Lrp-1* spécifiquement dans les CML expriment de grandes quantités de PDGF β R au niveau de la paroi artérielle contrairement au souris *Lrp-1* contrôles (Boucher et al., 2003). Ainsi, la présence de LRP-1 peut moduler la signalisation du PDGF (Boucher & Gotthardt, 2004). Il a été aussi démontré que PDGF-BB est un ligand de LRP-1 et que l'apoE empêche la phosphorylation du domaine cytoplasmique de LRP-1 induite par PDGF-BB. Ainsi, l'apoE et le gleevec (un inhibiteur pharmacologique des tyrosines kinases parmi lesquelles celle du PDGF β R) bloquent le

domaine de phosphorylation de LRP-1 et réduisent l'épaississement de la paroi artérielle et la formation des cellules spumeuses chez des souris *Ldlr*^{-/-}, *smLrp-1*^{-/-} (Boucher et al., 2003). Sous son état non phosphorylé, le LRP-1 peut se lier à des protéines adaptatrices (comme Dab2) qui participent à la régulation de l'endocytose et à la dégradation des complexes LRP-PDGFR-PDGFR ce qui empêche la migration et la prolifération des CMLv dépendantes du PDGF et protège ainsi contre l'athérosclérose (Boucher & Gotthardt, 2004).

Une autre étude *in vitro* a montré l'importance de la voie TGFβ dans le développement de l'athérosclérose via la prolifération et la migration des CMLv. En effet, le traitement avec rosiglitazone, un agoniste de la PPARγ et un inhibiteur de la voie TGFβ a montré une réduction significative dans la taille des plaques d'athérome chez des souris déficientes en LRP-1 sur un fond génétique *Ldlr*^{-/-} (Boucher et al., 2007).

Cependant, d'autres études ont montré que LRP-1 peut favoriser la formation de cellules spumeuses dérivées des CMLv, ce qui entraîne la progression de l'athérosclérose (J. Chen et al., 2021). L'un des principaux événements du processus athérogène est l'accumulation de lipides, principalement du cholestérol estérifié dans l'espace sous-endothélial de la paroi artérielle (Llorente-Cortés et al., 2006).

Les cellules spumeuses de la plaque d'athérome dérivent des macrophages et des CMLv. Les macrophages deviennent des cellules spumeuses par l'absorption des LDL diversement modifiées (oxydées, agrégées) (Llorente-Cortés & Badimon, 2005), tandis que pour les CMLv, l'accumulation des lipides en intracellulaire est due à l'internalisation des LDL agrégées. Contrairement aux LDL natives, les LDL agrégées sont un fort inducteur de l'accumulation du cholestérol estérifié en intracellulaire dans les CMLv humaines, ce qui stimule la formation des cellules spumeuses (Llorente-Cortés et al., 2006). Ces LDL agrégées sont internalisées par LRP-1 qui est régulé positivement par le taux de cholestérol intracellulaire des CMLv, contrairement au LDLr (Llorente-Cortés et al., 2002). Ce mécanisme de rétrocontrôle positif stimule la formation de cellules spumeuses dérivées des CMLv qui sont un des principaux mécanismes pro-athérogènes de LRP-1. Par conséquent, dans les CMLv les LDL agrégées qui conduisent à l'accumulation du cholestérol estérifié en intracellulaire via LRP-1 sont responsables de la formation des cellules spumeuses et favorisent ainsi la progression de la pathologie athéromateuse (J. Chen et al., 2021).

b. Autres fonctions de LRP-1

En plus de l'athérogenèse, des études menées chez des souris ayant subi des modifications génétiques ont révélé que LRP-1 exprimé dans les CMLv joue un rôle protecteur contre la formation des anévrismes. En effet, les souris *Lrp-1*^{-/-} présentent une dilatation aortique exagérée attribuée à une perturbation de l'élasticité de la paroi vasculaire (Mineo, 2020). De plus, les analyses histologiques ont montré que les CMLv des souris *Lrp-1*^{-/-} présentent un phénotype synthétique par rapport à celui des souris témoins ce qui prédispose aux anévrysmes de l'aorte (Muratoglu et al., 2013). En effet, l'absence de LRP-1 active la voie de signalisation du TGFβ qui s'accompagne d'une désorganisation des couches élastiques, des aortes tortueuses et d'une augmentation de la fibrose similaire à ce qui est observé dans les syndromes de Marfan (Boucher et al., 2007).

Comme dans les CMLv, le rôle de LRP-1 dans les macrophages au cours du développement de l'athérosclérose est controversé (J. Chen et al., 2021). La complexité de ce lien peut être due aux différentes voies de signalisation et aux différents types de cellules impliquées. LRP-1 peut également jouer un rôle protecteur contre l'inflammation des macrophages (Mineo, 2020).

2.2.2.2 Récepteurs éboueurs ou « scavengers »

L'activité scavenger est associée à la capacité de certains récepteurs membranaires à se lier et à internaliser les LDL oxydées. En effet, on croyait que les récepteurs éboueurs (SR pour scavengers receptors) reconnaissaient spécifiquement les épitopes générés par l'oxydation des LDL natives et par suite permettaient de différencier les LDL natives des LDL oxydées qui sont impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Plus tard, de nouveaux membres de la famille des récepteurs scavenger ont été identifiés. Actuellement, il est connu que ces récepteurs reconnaissent différents types de ligands comme les particules de lipoprotéines modifiées, les phospholipides, les cellules apoptotiques, les glucides et les esters de cholestérol (Canton et al., 2013; Cuthbert et al., 2020).

Les SR ont été définis pour la première fois par Goldstein et Brown en 1979. En effet, ils ont démontré que les macrophages étaient capables de dégrader les LDL modifiées par acétylation et cela grâce à la présence d'un site de liaison haute affinité capable de reconnaître les charges négatives des LDL modifiées. Ainsi, les particules lipidiques seront internalisées aboutissant à la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Brown et al., 1979;

Goldstein et al., 1979). Différents SR ont été identifiés depuis et classés en 10 classes distinctes sur la base de leur structure primaire. La **Figure 23** représente les classes des récepteurs scavengers liés à l'athérosclérose (Zani et al., 2015).

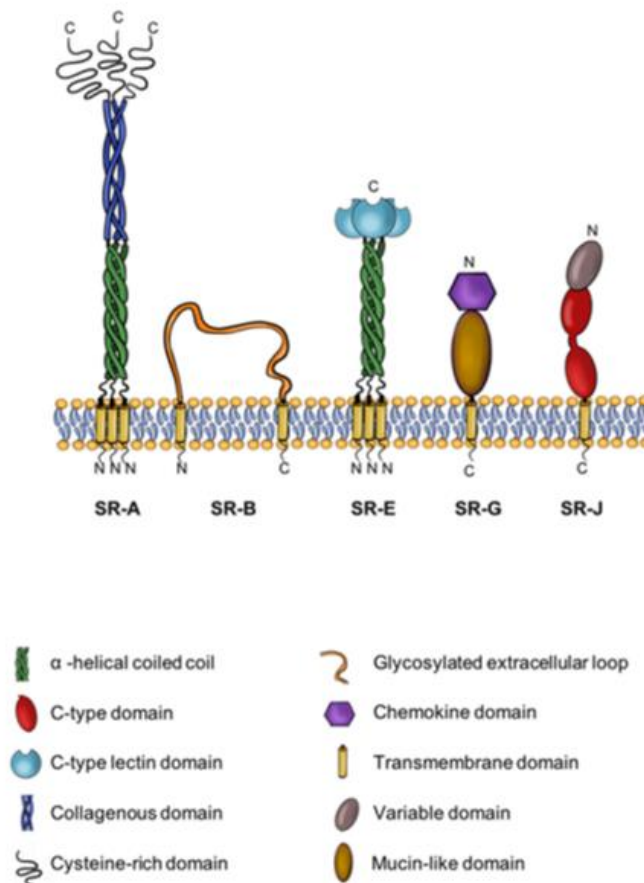


Figure 23 : Cinq classes différentes de SR (A, B, E, G, J) (Cuthbert et al., 2020)

Ces cinq classes sont les plus étroitement liées à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose. Ces molécules sont des biomarqueurs potentiels et des cibles thérapeutiques.

Les SR sont largement exprimés par les cellules vasculaires et immunitaires y compris les CMLv et les macrophages dans des conditions physiologiques ou pathologiques comme l'athérosclérose. Le large spectre d'expression des SR a été associé à des conditions pathologiques telles que les maladies dégénératives du cerveau (Singh et al., 2010, p. 10; Wilkinson & El Khoury, 2012), les tumeurs malignes (Bächli et al., 2006), les états inflammatoires systémiques comme la septicémie (L. Guo et al., 2012), la polyarthrite rhumatoïde (Matsushita et al., 2002) et la vascularite rénale (Nagai et al., 2016).

Un groupe de ces récepteurs reconnaissent et lient les lipoprotéines modifiées jouant ainsi un rôle dans le développement de la plaque d'athérome. La fonction des SR dans la régulation de l'athérosclérose est un axe majeur de la recherche portant sur l'amélioration du diagnostic et le traitement des MCV. Dans cette partie je vais détailler deux récepteurs de cette famille : SR-E ou LOX-1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor-1) et SR-B3 ou CD36 (Cluster of Differentiation 36).

2.2.2.2.1 Lectin-like Oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)

Lectin-like Oxidized low density lipoprotein receptor-1 ou LOX-1, également appelé OLR1 et SR-E1, est une glycoprotéine transmembranaire de 50 kDa contenant 273 acides aminés qui appartient à la famille des lectines de type C (Mineo, 2020). Ce récepteur a été initialement identifié dans les cellules endothéliales bovines responsables de la liaison, de l'internalisation et de la dégradation des LDL oxydées (Sawamura et al., 1997).

i. Structure de LOX-1

LOX-1 est un homodimère constitué de quatre domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique, un seul domaine transmembranaire, un domaine « NECK » connecteur extracellulaire et un domaine C-terminal extracellulaire lectin like (CTLD) (**Figure 24**) (Mineo, 2020).

Le domaine CTLD contient un groupe d'acides aminés chargés positivement et est impliqué dans la liaison des ligands chargés négativement. Les études ont montré que ce résidu chargé positivement dans le CTLD est indispensable pour la liaison des LDL oxydées chargées négativement. La délétion de ce domaine abolit complètement la liaison aux LDL oxydées (Barreto et al., 2021).

Un autre domaine important dans LOX-1 est le domaine NECK. Ce domaine de 80 acides aminés est lié à la fois au domaine transmembranaire et au domaine CTLD. L'importance du domaine NECK est qu'il est moins stable que les autres domaines et est la cible des protéases responsables du clivage de LOX-1 et de la libération de la forme soluble (sLOX-1) de 34 kDa. A noter que le domaine NECK n'a aucun effet sur la liaison aux LDL oxydées mais interagit avec le domaine CTLD et augmente sa stabilité (Barreto et al., 2021).

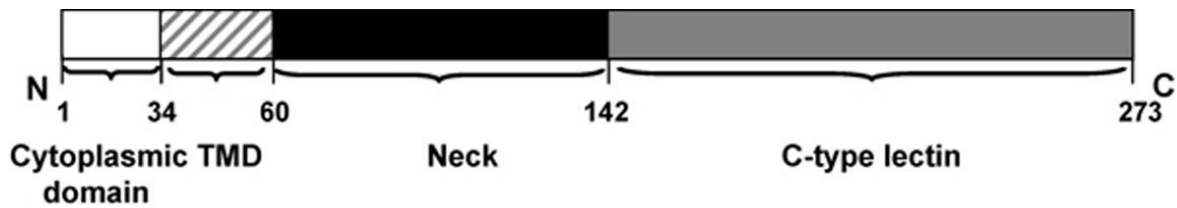


Figure 24 : Représentation schématique de la structure de LOX-1 (adaptée de (Murphy et al., 2006)).

N, N-terminal ; TMD, domaine transmembranaire ; C, C-terminal)

ii. Expression de LOX-1

LOX-1 est présent dans divers types cellulaires notamment les cellules endothéliales des artères coronaires humaines, les macrophages, les plaquettes, les fibroblastes, les CMLv et les cardiomyocytes (Mehta et al., 2006). L'expression basale de LOX-1 dans divers types de cellules est faible, mais elle est rapidement stimulée par divers signaux pro-oxydatifs et pro-inflammatoires tels que l'angiotensine II, les cytokines, les LDL oxydées, la TNF- α , ainsi que par les forces de cisaillement (Kume et al., 1998).

Des études réalisées dans des aortes humaines ont montré que l'expression de LOX-1 est faible dans des aortes saines. Par contre, il est exprimé dans des aortes athéromateuses et notamment dans les CE, les CMLv et les macrophages de l'intima (Kataoka et al., 1999) L'expression de LOX-1 est augmentée notamment dans diverses conditions considérées comme des facteurs de risque traditionnels dans le développement de l'athérosclérose, tels que le diabète, l'hypertension et la dyslipidémie (Pothineni et al., 2017).

iii. Fonctions de LOX-1

LOX-1 est un acteur majeur dans toutes les étapes de l'athérosclérose, en allant des stries lipidiques vers la formation de la plaque d'athérome. Ceci passe par le dysfonctionnement endothélial, l'adhésion des monocytes, le stress oxydatif, la formation de cellules spumeuses, la prolifération des CML, le dépôt de collagène et l'activation des plaquettes (Pothineni et al., 2017).

Le rôle joué par LOX-1 dans le développement de l'athérosclérose a été démontré par Mehta et al. chez des souris KO *Lox1*^{-/-}. Ces souris déficientes en *Lox-1* et hyperlipidémiques (*Ldlr*^{-/-}) présentaient une liaison atténuée aux LDL oxydées et se caractérisaient par une réduction marquée des plaques athéromateuses par rapport aux souris *Ldlr*^{-/-} sans déficit en

Lox-1. De plus, chez les souris déficientes en Lox-1 et LDLr, l'expression des marqueurs inflammatoires était diminuée (Mehta et al., 2007).

Le récepteur LOX-1 est également impliqué dans la pathogenèse de l'ischémie myocardique. En effet, une étude réalisée chez un modèle d'ischémie-reperfusion coronarienne chez le rat a montré qu'en bloquant le récepteur Lox-1 à l'aide d'un anticorps neutralisant, l'internalisation des LDL oxydées par Lox-1 sera inhibée et ainsi la taille de la région infarctée sera diminuée. L'inhibition du LOX-1 est également associée à une diminution de l'expression des marqueurs d'inflammation, d'apoptose et du stress oxydatif (D. Li et al., 2003).

Des études *in vitro* ont montré que les LDL oxydées provoquent l'apoptose et la nécrose des cellules endothéliales coronaires humaines via les caspases (J. Chen et al., 2004). Cet effet pro-apoptotique des LDL oxydées peut être bloqué par l'anticorps anti-LOX-1 ainsi que par l'antisens LOX-1 (Mehta et al., 2006).

Concernant les CML, une étude a montré qu'en réponse à une lésion vasculaire dans des modèles animaux, l'expression de l'ARNm et de la protéine LOX-1 ont été augmentées dans les CMLv médiales et néo-intimales. L'administration de l'anticorps bloquant LOX-1 induit la réduction de l'hyperplasie néo-intimale ainsi que la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'infiltration des leucocytes dans la paroi artérielle (Hinagata et al., 2006). De plus, dans les CMLv, LOX-1 est impliqué dans la déstabilisation de la plaque et induit l'apoptose des cellules (Mineo, 2020).

En outre, LOX-1 a également été identifié dans les plaquettes et joue un rôle dans l'activation plaquettaire et la formation de thrombus (M. Chen et al., 2001). Ce récepteur joue également un rôle dans l'hypertension et le diabète. En effet, des études ont montré que l'expression de l'ARNm de *LOX-1* est augmentée dans les aortes des rats hypertensifs et diabétiques (Nagase et al., 1997).

Toutes ces données montrent que LOX-1 est impliqué dans la médiation des effets pro-athérogènes des LDL oxydées dans les cellules endothéliales et les CMLv au cours des diverses étapes de la progression de l'athérosclérose ainsi que dans d'autres maladies qui sont des facteurs de risque de l'athérosclérose (**Figure 25**).

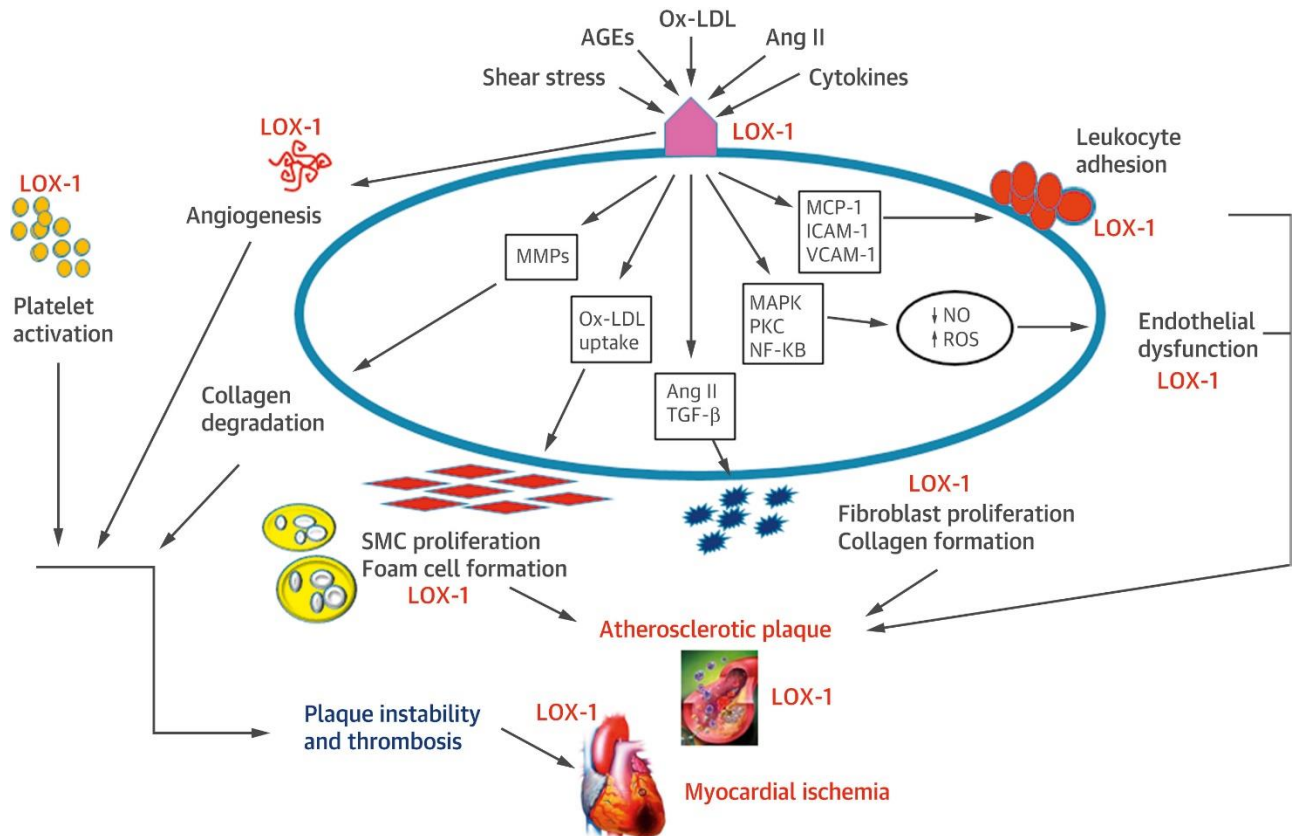


Figure 25 : Mécanismes de LOX-1 dans l'athérogenèse et l'ischémie myocardique (Pothineni et al., 2017)

L'activation de LOX-1 par les LDL oxydées et par d'autres stimuli entraîne une cascade de voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la formation de cellules spumeuses, à la prolifération des CML, l'activation des plaquettes, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la dégradation du collagène, autant d'étapes clés de l'athérosclérose.

↑ = augmentation ; ↓ = diminution ; AGE = produit final de glycation avancée ; Ang II = angiotensine II ; ICAM = molécule d'adhésion intercellulaire ; MAPK = protéine kinase activée par les mitogènes ; MCP = protéine chimio-attractante monocytaire ; MMP = métalloprotéinase matricielle ; NF-κB = facteur nucléaire-kappa B ; NO = monoxyde d'azote ; PKC = protéine kinase C ; TGF = facteur de croissance tumorale ; VCAM = molécule d'adhésion des cellules vasculaires.

iv. Génétique

Le récepteur LOX-1 est codé par le gène *OLR1* (oxidized low-density lipoprotein [lectin-like] receptor 1 ; OMIM # 602601) situé dans un groupe de gènes de la lectine de type C situé en p12.3-p13 sur le chromosome 12. Il s'étend sur 7000 pb et contient 6 exons et 5 introns (Barreto et al., 2021).

Des études génétiques ont identifié des SNP du gène *OLRI* qui sont associés à l'ischémie myocardique et aux maladies coronariennes (**tableau x**).

Tableau 5 : Polymorphismes nucléotidiques du gène *OLRI* codant LOX-1 et leur signification fonctionnelle (adapté de (Pothineni et al., 2017))

SNP	Locus	Conséquences fonctionnelles	Maladies associées
c.501G>C	Exon 4	Cette substitution faux-sens de l'acide aminé lysine (K) par une asparagine (N) en position 167 (K167N) entraîne la formation d'une protéine LOX-1 ayant une affinité réduite pour les LDL oxydées.	Une association inconsistante avec les maladies coronariennes et l'infarctus du myocarde a été signalée dans différentes études.
SNPs en déséquilibre de liaison (DL)	Bloc de 6 SNPs en DL (introns 4 et 5, 3'UTR)	Ces polymorphismes régulent l'épissage alternatif de l'ARNm de <i>OLRI</i> qui génère un isoforme de LOX-1 (LOXIN) dépourvu d'une partie du domaine de liaison au ligand et agit en bloquant l'effet négatif de l'activation du récepteur.	Des associations cohérentes avec les maladies coronariennes et l'infarctus du myocarde dans plusieurs études.
3'-UTR	Substitution du nucléotide C en T situé 188 nucléotides en aval du codon de terminaison de l'ARNm d' <i>OLRI</i>	En raison de son association avec les autres polymorphismes dans le bloc DL ci-dessus, ce polymorphisme est associé à la génération de l'isoforme LOXIN.	Des associations cohérentes avec les maladies coronariennes et l'infarctus du myocarde dans plusieurs études.

En effet, des études transversales ont montré que le SNP K167N (c.501 G>C) a été associé à une incidence accrue d'infarctus du myocarde ainsi qu'à une augmentation de l'épaisseur de l'intima-média carotidienne (Predazzi et al., 2012; Tatsuguchi et al., 2003; Trabetti et al., 2006). Une méta-analyse de sept cas témoins a indiqué que l'allèle C est significativement associé à l'accident vasculaire cérébral ischémique (Au et al., 2015). Cependant, une étude *in vitro* a montré que le variant K167N correspondant à l'allèle C, se lie aux LDL oxydées moins efficacement que le 167K (allèle G), ce qui confère probablement une protection contre l'athérosclérose (Biocca et al., 2009). Cette disparité dans les études doit être clarifiée.

De plus, le bloc des 6 SNPs en déséquilibre de liaison génère un isoforme LOX-1 auquel manque l'exon 5 et qui est considéré comme un facteur protecteur pouvant bloquer les effets pro-athéromateuse de LOX-1 (Jin & Cong, 2019).

Les études génétiques montrent ainsi le rôle joué par LOX-1 comme un médiateur important des fonctions pro-athérogènes des LDL oxydées.

2.2.2.2 Cluster of Differentiation 36 (CD36)

Le récepteur CD36 ou « Cluster of differentiation 36 » (également appelé SRB3), appartient à la famille des récepteurs scavenger de classe B qui comprend également le SRB1 et la SRB2 une protéine membranaire lysosomale dite « lysosomal integral membrane protein » (LIMP2).

CD36 est une glycoprotéine transmembranaire de 88 kDa, exprimée dans divers types de cellules, notamment les monocytes et les macrophages, les plaquettes, les CE, les CMLv, les adipocytes, les cellules épithéliales du rein et les myocytes cardiaques (Y. M. Park, 2014).

i. Structure de CD36

La protéine CD36 est composée d'une seule chaîne peptidique de 472 acides aminés. Elle est organisée en deux domaines cytoplasmiques très courts et un grand domaine extracellulaire glycosylé (**Figure 26**) (Y. M. Park, 2014). La glycosylation étendue du CD36 est nécessaire au trafic de ce récepteur vers la membrane plasmique (Hoosdally et al., 2009).

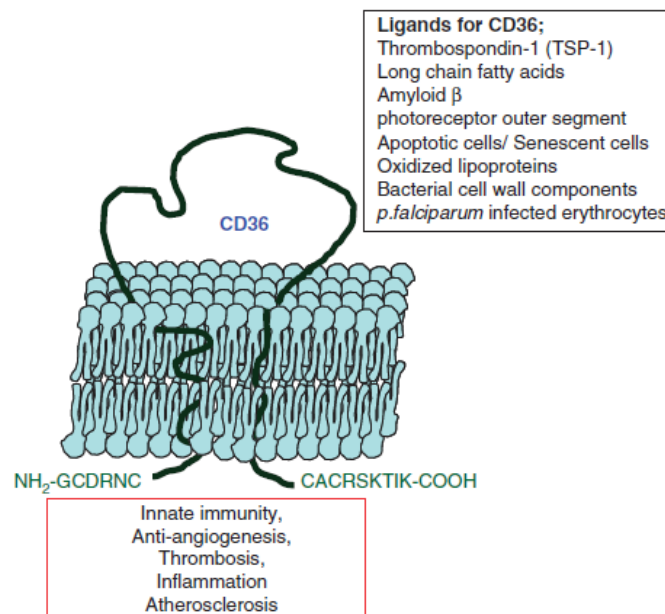


Figure 26 : Structure et fonction du récepteur CD36 (adaptée de (Y. M. Park, 2014))

Le CD36 est un récepteur transmembranaire composé de deux domaines cytoplasmiques très courts et d'un grand domaine extracellulaire glycosylé. CD36 est capable de relier plusieurs ligands et il est impliqué dans de nombreux processus biologiques dont l'immunité innée, l'anti-angiogénèse, la thrombose, l'inflammation et l'athérosclérose.

ii. Fonctions de CD36

Le CD36 est capable de se lier à de nombreux ligands notamment la thrombospondine-1, les phospholipides oxydés, les LDL oxydées, les acides gras à longue chaîne. Le site de liaison de chaque ligand est différent. Grâce à ces différentes interactions, CD36 est capable d'exercer différentes fonctions (Moore & Freeman, 2006).

En effet, la liaison de la thrombospondine-1 au CD36 endothélial inhibe l'angiogenèse en induisant l'apoptose (Moore & Freeman, 2006). De plus, le CD36 se lie aux acides gras libres et facilite leur translocation du milieu extracellulaire vers le cytoplasme notamment des myocytes et des adipocytes. Il agit également comme un SR en internalisant des signaux de danger exogènes et endogènes, notamment les LDL et les HDL modifiées (Mineo, 2020).

Les études *in vitro* ont montré qu'en présence de LDL oxydées, CD36 favorise l'accumulation de lipides dans les macrophages en culture (Mineo, 2020). Il a également été démontré que le CD36 contribue au développement de l'hyperplasie néo-intimale par l'augmentation de la prolifération des CMLv et son absence favorise l'expression des protéines contractiles. Yue et al. ont découvert que le CD36 est fortement exprimé dans les vaisseaux humains présentant une hyperplasie intimale et des maladies vasculaire obstructives. De plus, les souris hyperlipidémique déficitaires en CD36 globalement ou sélectivement dans les CMLv présentent une réduction de la prolifération intimale induite par des lésions de l'artère carotide (Yue et al., 2019).

Dans les cellules endothéliales, des études récentes ont montré que les souris déficitaires en CD36 ont une absorption réduite des acides gras par le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux brun, et que ces souris ne développent pas une résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisses (Son et al., 2018).

Le CD36 favorise également l'activation des plaquettes et la coagulation via les LDL oxydées, contribuant aux phénotypes pro-thrombotiques en cas d'hyperlipidémie (Mineo, 2020).

iii. Génétique

Le CD36 est codée par le gène humain *CD36* qui est situé sur le chromosome 7 en position 7q11.2 et est composé de 15 exons (Y. M. Park, 2014). Les exons 1, 2 et 15 sont non codants. Les exons 3 et 14 codent respectivement les domaines N-terminal et C-terminal de la protéine CD36 (Rač et al., 2007).

Chez l'homme, plusieurs mutations du gène *CD36* ont été signalées et entraînent une diminution de l'expression de la protéine CD36 (Rač et al., 2007). Le déficit en CD36 est divisé

en deux sous-groupes en fonction des phénotypes. La déficience de type I se caractérise par l'absence d'expression de la protéine CD36 dans de nombreux types de cellules, notamment les monocytes, les macrophages et les plaquettes. Dans la déficience de type II, la CD36 est déficiente uniquement dans les plaquettes. Cependant, les conséquences physiologiques de la déficience en CD36 n'ont pas été clairement vérifiées (Y. M. Park, 2014). Les patients présentant une déficience en CD36 de type II ont des fonctions plaquettaires normales (Yamamoto et al., 1990), alors que l'incidence de cardiomyopathie, d'hyperlipidémie et de résistance à l'insuline sont relativement élevées chez ces patients (Y. M. Park, 2014). Ces études ne montrent pas si les effets de la déficience en CD36 humaine sont causés par l'absence de CD36 dans certains types de cellules ou s'il existe des fonctions aberrantes de la CD36 mutée ou des effets compensatoires. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les effets de la déficience en CD36 chez l'homme (Y. M. Park, 2014).

2.3 Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires dans la progression de la pathologie athéromateuse

L'athérosclérose est caractérisée par une surcharge lipidique due à la convection radiale des particules lipidiques à travers la paroi artérielle et à leur rétention dans l'intima. Les CMLv sont impliquées dans toutes les étapes de la progression de l'athérosclérose en allant de la lésion intimale jusqu'à l'érosion de la plaque (Lacolley et al., 2012).

Les LDL plasmatiques convectées radialement sont retenues dans l'intima en raison de la capacité de l'apoB-100 à se lier aux protéoglycanes sulfatés, à la fibronectine et aux collagènes, tous sécrétés par les CMLv intimaux (Olofsson & Borèn, 2005). Les LDL retenues à l'abri des antioxydants plasmatiques sont susceptibles d'être modifiées et seront donc oxydées et agrégées (Libby et al., 2019).

Les LDL modifiées, ainsi que d'autres facteurs athérogènes, favorisent l'activation des CE qui secrètent de molécules adhésives (ICAM pour intercellular adhesion molecule 1, VCAM pour vascular cell adhesion molecule 1, sélectine) ce qui entraîne le recrutement de monocytes qui, dans l'intima, se différencient en macrophages exprimant des récepteurs scavengers. Les LDL modifiées sont absorbées par les macrophages ce qui favorise la formation de cellules spumeuses (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

Les CMLv, comme les macrophages de l'intima, sont capables d'internaliser le cholestérol sous forme d'esters de cholestérol et cela grâce à la présence des récepteurs scavengers et des récepteurs LRP dont, comme déjà mentionné, l'expression ne diminue pas en fonction du taux intracellulaire du cholestérol contrairement aux LDLr (Libby et al., 2019). D'autre part, la surcharge en esters de cholestérol est due à la diminution de l'expression de la cholestérol estérase et du transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) qui joue un rôle dans l'efflux de cholestérol. Ceci entraîne l'absorption des LDL oxydées et la formation de cellules spumeuses caractérisées par un cytoplasme chargé de gouttelettes lipidiques (Allahverdian & Francis, 2010).

En réponse à la lésion lipidique initiale, la maladie évolue vers la prolifération intimale où certaines CMLv localisées dans la média, et grâce à leurs plasticités phénotypiques, perdent plusieurs marqueurs de leur fonction contractile physiologique et acquièrent un phénotype synthétique et prolifératif (Lacolley et al., 2012). La plasticité phénotypique des CMLv est régulée par divers facteurs tels que :

- les facteurs de transcription : KLF4 (Krüppel-like factor 4) qui réprime l'expression des gènes liés à la contraction et la myocarde (MYOCD) qui code les protéines de la contraction et dont l'expression sera diminuée en cas d'altérations des CMLv.
- les facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet-derived Growth Factor) impliqué dans la répression de l'expression des gènes contractiles (transgeline (*TAGLN*), myosine (*MYH11*), actine (*αSMA*)).

A des stades plus avancés les CMLv jouent un rôle dans la formation de la chape fibreuse (Basatemur et al., 2019).

En plus de leur capacité à endocyter les molécules solubles telles que les LDL, les CMLv sont impliquées dans la phagocytose des cristaux, des microparticules, des particules de fer, des cellules apoptotiques via l'activation du phagolysosome (Lacolley et al., 2012).

Les CMLv, grâce à leurs changements phénotypiques, sont impliquées dans tous les stades de l'athérosclérose et constituent la source majeure de cellules de la plaque d'athérome (Basatemur et al., 2019). En revanche, leur présence dans la plaque athéromateuse est sous-estimée par rapport aux macrophages. En effet, l'activité d'endocytose/phagocytose des CMLv induit la surexpression des marqueurs fonctionnels tels que le récepteur scavenger de classe D associés aux protéines de membranes lysosomales (CD68). Ainsi, nous ne pouvons pas considérer le CD68 comme étant un marqueur spécifique d'une lignée cellulaire, notamment les macrophages, mais plutôt comme un marqueur fonctionnel de l'activité d'endocytose de

différentes lignées cellulaires (Lacolley et al., 2012). Par conséquent, nous avons besoin de nouveaux marqueurs épigénétiques spécifiques qui sont acquis durant le développement des lignées monocytes et CMLv autres que les marqueurs fonctionnels existants tels que le CD68 pour pouvoir discriminer entre les différentes lignées cellulaires notamment les macrophages et les CMLv dans les lésions athéromateuses (**Figure 27**) (Lacolley et al., 2012). Le KLF4 joue un rôle dans le changement phénotypique des CML et pourrait ainsi être utilisé comme un marqueur spécifique pour différencier les CML d'autres types cellulaires au cours de la pathologie athéromateuse (Shankman et al., 2015).

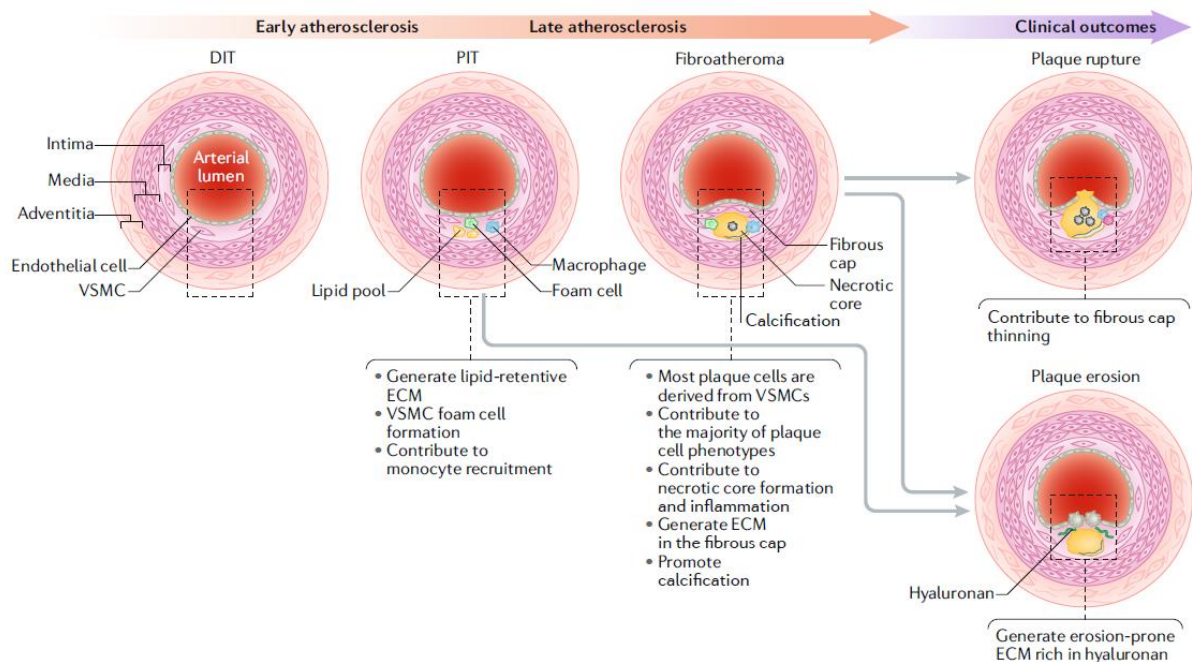


Figure 27 : Rôle des cellules musculaires lisses vasculaires dans l'athérosclérose (Basatemur et al., 2019)

Les CMLv constituent la source majeure de cellules de la plaque et de la MEC à tous les stades de l'athérosclérose et contribuent à de nombreux processus tout au long de la maladie *DIT*, *diffuse intimal thickening*; *PIT*, *pathological intimal thickening*

OBJECTIFS

PCSK9 est le troisième gène impliqué dans l'ADH. Son identification a permis une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol ainsi que de ses complications cardiovasculaires. Des études récentes ont dévoilé un nouvel aspect de *PCSK9* comme molécule pro-athérogène, au-delà de son rôle sur le récepteur des LDL. Ainsi, dans ce projet j'ai étudié *PCSK9* dans le contexte de l'hypercholestérolémie familiale et de l'athérosclérose. L'objectif des études que j'ai mené entre l'INSERM U1148 à Paris et le LBTM (Laboratoire de Biochimie et Thérapies Moléculaires) à Beyrouth était donc d'élucider le rôle joué par *PCSK9* sur les plans moléculaires et physiopathologiques.

1. Hypercholestérolémie familiale

La première partie de ce travail visait à dater la mutation gain de fonction p.(Ser127Arg) dans *PCSK9*. La p.(Ser127Arg) est l'une des premières mutations hypercholestérolémiques retrouvée actuellement chez 67% des patients ADH français, révélant ainsi la présence d'un effet fondateur. Afin de dater la mutation, 6 familles ADH françaises ainsi que 10 proposants français non apparentés ont été recrutés. J'ai génotypé des marqueurs polymorphes (microsatellites, SNPs) qui couvrent la région autour de la mutation pour tous les sujets et j'ai construit les haplotypes. La datation de la mutation, à il y a 612 années, a été réalisée par une méthode de vraisemblance qui se base sur les informations fournies par les haplotypes. Les détails de cette étude sont développés dans le chapitre 1 des « Résultats ». J'ai réalisé ce travail dans mon équipe à l'INSERM U1148 et en collaboration avec les cliniciens qui suivent les patients et l'équipe d'Emmanuelle Génin à Brest pour la datation.

2. Dosage des taux circulants de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique libanaise

Le deuxième objectif de ce travail était de doser les taux plasmatiques de *PCSK9* dans une cohorte pédiatrique libanaise afin de pouvoir étudier le lien entre les taux plasmatiques de *PCSK9* et les données démographiques, les paramètres lipidiques ainsi qu'avec la ménarche chez les filles et la testostérone chez les garçons. Ce travail a été réalisé entre mon équipe à l'INSERM U1148 et mon équipe au LBTM à l'Université Saint-Joseph de Beyrouth. En collaboration avec les endocrinologues de l'Hôtel Dieu de France de Beyrouth, 681 écoliers libanais ont été recrutés. Le dosage a été réalisé par une technique d'Elisa LuminexTM afin d'analyser les corrélations entre les taux plasmatiques de *PCSK9* et l'âge, le sexe, l'IMC et les différents paramètres lipidiques. Les résultats ont montré une corrélation entre *PCSK9* et les taux de CT, LDL-C et non-HDL-C et que les taux de *PCSK9* étaient significativement élevés chez les enfants dyslipidémiques. Ces corrélations suggèrent l'utilisation de *PCSK9* comme un

marqueur de prédiction de la survenue des atteintes cardiovasculaires. Les détails de cette étude sont retrouvés dans le chapitre 2 des « Résultats ».

3. Rôle de PCSK9 dans le développement de l'athérosclérose *via* les CMLv

Le dernier objectif était d'évaluer le rôle joué par PCSK9 dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose à travers sa localisation tissulaire à différents stades de la maladie et son éventuelle interaction avec les récepteurs scavengers des CMLv. Dans un premier temps, nous avons localisé PCSK9 dans la paroi d'aortes athéromateuses au sein des CMLv, et montré son interaction avec les récepteurs scavengers LRP-1 et LOX-1. Dans un second temps, l'étude des CMLv primaires a permis de valider les résultats tissulaires, d'étudier les capacités d'endocytose du cholestérol par les CMLv et d'éclaircir la voie d'entrée de PCSK9 dans les CMLv. Les résultats de ces études sont expliqués dans le chapitre 3 des « Résultats ».

RÉSULTATS

Chapitre 1 : Datation de la mutation française fondatrice p.(Ser127Arg) dans *PCSK9*

1. Introduction

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est une maladie génétique qui prédispose à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires prématurées en raison des taux plasmatiques élevés de cholestérol total et de LDL-C (Toft-Nielsen et al., 2022). L'HF à transmission autosomique dominante est due à des mutations au niveau de quatre gènes principaux : *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *APOE*. Des études récentes ont montré que la prévalence de cette maladie est de 1 sur 313 pour sa forme hétérozygote et 1 sur 300000 pour sa forme homozygote (Beheshti et al., 2020). Cette prévalence est plus élevée dans certaines populations dû à la présence de mutations à effet fondateur. C'est le cas des Afrikaners, des Canadiens Français, des Libanais, des Indiens d'Asie, des Tunisiens, et des Juifs de Johannesburg (Beheshti et al., 2020).

En France, l'HF est largement sous-diagnostiquée avec probablement moins de 1% des patients qui sont diagnostiqués. C'est pour cette raison principale qu'en 2015 le registre REFERCHOL (pour REgistre Français de l'hypERCHOLestérolémie familiale) a été mis en place. C'est un registre national et multicentrique qui collecte et analyse les données cliniques, biologiques et génétiques de patients atteints d'HF dans le but d'améliorer la prise en charge et le traitement des patients afin de réduire le risque de maladies cardiovasculaires (Béliard-Lasserre, 2020). En 2017, parmi les 3381 proposant HF inclus dans REFERCHOL, 2054 ont eu un dépistage moléculaire et 1150 (56%) étaient porteurs de mutations : 1075 (93,5 %) dans le gène *LDLR*, 54 (4,7 %) dans *APOB* et 21 (1,8 %) dans *PCSK9* (Rabès et al., 2018). Au total, 416 variants pathogènes différents ont été retrouvés dans le gène *LDLR*. Parmi les patients porteurs de mutations dans le gène *APOB*, 85% sont porteurs de la mutation fondatrice Européenne, p.(Arg3527Gln). En ce qui concerne *PCSK9*, la mutation la plus fréquente, p.(Ser127Arg) (c.381T>A), est retrouvée chez 14 patients (Rabès et al., 2018). C'est la première mutation identifiée au sein de deux familles HF Françaises (Abifadel et al., 2003). La mutation p.(Ser127Arg) a été retrouvée chez d'autres patients, Norvégiens et Sud Africains,

sans qu'elle ne soit plus fréquente que les autres mutations de *PCSK9* (Huijgen et al., 2021; Leren & Bogsrud, 2021). En France, elle représente 67% des mutants *PCSK9*, ce qui indique que c'est une mutation à effet fondateur (Rabès et al., 2018). Elle touche un acide aminé essentiel au clivage auto-catalytique de PCSK9, lui-même crucial pour la sécrétion de la protéine PCSK9 par la cellule (Pandit et al., 2008). Elle se caractérise donc par une diminution de la sécrétion de PCSK9. La sérine en position 127 est aussi impliquée dans l'interaction entre PCSK9 et le LDLr. La mutation p.(Ser127Arg) confère à PCSK9 une plus forte affinité pour le LDLr entraînant une diminution de l'expression des LDLr à la surface cellulaire, et diminuant ainsi l'internalisation du LDL-C (Martin et al., 2020).

L'objectif principal de ce travail est d'estimer l'âge de l'ancêtre commun le plus récent porteur de la mutation p.(Ser127Arg) de *PCSK9*.

2. Article 1

Estimating the age of the founding French p.(Ser127Arg) mutation in PCSK9

Yara Azar, Thomas Ludwig, Olivier Bluteau, Mathilde Di-Filippo, Alain Carrié, Hedi Chtioui, Sophie Béliard, Emmanuelle Génin, Philippe Moulin, Jean Ferrières, Valérie Carreau, Catherine Boileau, Marianne Abifadel, Jean-Pierre Rabès, Mathilde Varret

En cours de finalisation et sera soumis à European Journal of Human Genetics
(EJHG)

Title: Estimating the age of the founding French p.(Ser127Arg) mutation in *PCSK9*

Yara Azar^{1,2}, Thomas E. Ludwig^{3,4}, Olivier Bluteau⁵, Mathilde Di-Filippo^{6,7}, Alain Carrié⁵, Hedi Chtioui⁸, Sophie Béliard⁸, Emmanuelle Génin³, Philippe Moulin^{6,7}, Jean Ferrières⁹, Valérie Carreau¹⁰, Catherine Boileau^{1,11}, Marianne Abifadel^{1,2}, Jean-Pierre Rabès^{1,12,13}, Mathilde Varret^{1*}

1. Paris Cité University and Sorbonne Paris Nord University, INSERM UMRS 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), F-75018 Paris, France; yara.azar@inserm.fr (YA), catherine.boileau@inserm.fr (CB), marianne.abifadel@usj.edu.lb (MA), jean-pierre.rabes@aphp.fr (JPR), mathilde.varret@inserm.fr (MV).
2. Saint-Joseph University of Beirut, Faculty of Pharmacy, Pôle Technologies-Santé (PTS), Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Beirut 1004 2020, Lebanon; yara.azar@inserm.fr (YA), marianne.abifadel@usj.edu.lb (MA).
3. Brest University, INSERM, EFS, UMR 1078, GGB, F-29238 Brest, France. thomas.ludwig@inserm.fr (TL), emmanuelle.genin@inserm.fr (EG).
4. CHU Brest, Brest, France. thomas.ludwig@inserm.fr (TL).
5. Sorbonne University, Faculty of Medicine Pitié-Salpêtrière, INSERM UMRS 1166, F-75005 Paris, France. olivier.bluteau@aphp.fr (OB), alain.carrie@aphp.fr (AC).
6. Lyon 1 University, INSERM U1060, INRAE U1397, CarMen Laboratory, F-69921 Oullins, France; mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr (MDF).
7. Hospices Civils de Lyon, Department of Biochemistry and Molecular Biology, F-69500 Bron, France; mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr (MDF).
8. Aix-Marseille University, Nutrition Department, AP-HM, La Conception Hospital, Faculty of Medicine, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France. Hedi.CHTIOUI@ap-hm.fr (HC), Sophie.BELIARD@ap-hm.fr (SB).
9. Department of Cardiology, Toulouse Rangueil University Hospital, UMR 1295 INSERM, F-31400 Toulouse, France. jean.ferrieres@univ-tlse3.fr (JF).
10. Department of Endocrinology and Prevention of Cardiovascular Disease, Institute of Cardio Metabolism and Nutrition (ICAN), La Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, F-75005 Paris, France; valerie.carreau@aphp.fr (VC).
11. Genetic Department, AP-HP, Bichat-Claude Bernard Hospital, F-75018 Paris, France. catherine.boileau@inserm.fr (CB).
12. Biochemistry and Molecular Genetics Department, AP-HP, Ambroise Paré University Hospital (APHP), Université Paris-Saclay, F-92104 Boulogne-Billancourt, France; jean-pierre.rabes@aphp.fr (JPR).
13. Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines University, UFR (Unité de Formation et de Recherche) Simone Veil-Santé, F-78180 Montigny-le-Bretonneux, France ; jean-pierre.rabes@aphp.fr (JPR).

* Correspondence: mathilde.varret@inserm.fr (MV); Tel.: +33140257521.

Abstract

PCSK9 is the third gene involved in autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH) encoding the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. The first ADH-causing *PCSK9* mutation, p. (Ser127Arg), is almost exclusively reported in French patients and represents 67% of the *PCSK9* variants in France due to a founder effect. This study aims to estimate the age of the most recent common ancestor with the French p.(Ser127Arg) mutation in *PCSK9*. Six families and 10 index cases carrying the p.(Ser127Arg) mutation were selected for genotyping. Haplotypes were constructed using 11 microsatellites and 6 SNPs spanning 19.6Mb around *PCSK9*. The most likely ancestral haplotype carrying the p.(Ser127Arg) mutation is: 163-175-

237-136-182-188-L9-A-G-G-A-A-169-248 -235-240-208/-223-242-204. The age of the most recent common ancestor was estimated to be 23-26 generations [95% CI: 16-38]. We postulate that the original mutation occurred in the common ancestor of living PCSK9-p.(Ser127Arg) carriers, who lived in France about 612 years ago [95% CI:400-950].

Introduction

Autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH, MIM #143890) is one of the most frequent monogenic diseases, with a prevalence of one in 312 (1), characterized by high plasma levels of cholesterol carried by low-density lipoproteins (LDL-C). Lifelong exposure of arteries to elevated levels of cholesterol promotes early atherosclerotic plaque development and premature cardiovascular disease increasing the risk of heart attack, stroke, and peripheral vascular disease (2). ADH is due to mutations in four genes encoding the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*), the apolipoprotein B (*APOB*), the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease (*PCSK9*) (3), and the apolipoprotein E (*APOE*) (4). The respective contributions of these four genes in French ADH patients are: *LDLR* 52%, *APOB* 3%, *PCSK9* 1% (5), and *APOE* <1% (4). The first *PCSK9* gain of function mutation, p.(Ser127Arg), was identified in two ADH families from different French regions. In the two families, the p.(Ser127Arg) is carried by the same haplotype suggesting that they share a common ancestor (6).

PCSK9 is characterized by autocatalytic cleavage of its precursor form (74-KDa) to produce its mature and active form (60-KDa) which is secreted in the circulation (7). Independently of its catalytic activity, *PCSK9* binds the LDL receptor at the cell surface and drives it to the lysosome where the complex is degraded (7). *PCSK9* binds to the LDL receptor through the combined interaction between the *PCSK9* catalytic domain and the LDL receptor epidermal growth factor domain A, and the *PCSK9* pro-domain and the LDL receptor β -propeller (8). The serine at position 127 is highly conserved between species and plays an important role in the recognition of the autocatalytic cleavage site (7). Compared to wild type *PCSK9*, the Ser127Arg mutant appeared to have a 66% reduction in autocatalytic cleavage activity, leading to higher levels of unprocessed pro-*PCSK9* relative to the mature *PCSK9* (7). The p.(Ser127Arg) has also been shown to have a higher binding affinity for the LDL receptor through the enhanced interaction between the *PCSK9* pro-domain and the LDL receptor β -propeller (8). This mutant was also associated with an overproduction of ApoB-containing VLDL particles, based on kinetic studies in human patients (9).

In addition to the two French families carrying the p.(Ser127Arg) mutation, three South African ADH patients were reported with the p.(Ser127Arg) within 27 carriers of a *PCSK9* mutation (10). Among 10 Norwegian ADH index patients with a *PCSK9* mutation, three carried the p.(Ser127Arg) (11). While no p.(Ser127Arg) carriers were reported in a cohort of 11 Turkish ADH-*PCSK9* mutation carriers (12). Thus, the p.(Ser127Arg) is not more common than the other ADH-*PCSK9* mutations in populations aside from the French population where it accounts for 67% of the ADH-*PCSK9* mutants due to a founder effect (5).

This study aims to estimate the age of the most recent common ancestor with the French p.(Ser127Arg) mutation in *PCSK9*.

Materials and Methods

Patients and families

Probands were included according to the identification of the p.(Ser127Arg) *PCSK9* mutation in routine diagnosis. Families from 6 probands were enlarged, the HC2, HC92, and HC806 families have been previously reported (6,13). The HC2062, HC748, and HCL1 families are presented **in Figure S1**. This study was conducted as part of trial # 05-07-06 approved by French Consultative Committee for the Protection of Person in Biomedical Research (CCPPRBs) Paris, Necker, and according to the French bioethics' regulations. All subjects gave informed consent.

Multiple of median for total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and TG levels

The multiple of median (MoM) for the total cholesterol (TC-MoM), LDL-C (LDL-MoM), HDL-C (HDL-MoM), and triglyceride (TG-MoM) values measured the deviation of an individual test result from the median of a reference population. It allows the comparison of lipid levels adjusted for age and gender using data from a French population of children (14) and a Dutch population of adults (15). The MoMs are ratios determined by the following: $TC-/LDL-/HDL-/TG-MoM = (TC/LDL-C/HDL-C/TG \text{ of the patient}) / (TC/LDL-C/HDL-C/TG \text{ of the 50th percentile of his sex and age class})$.

Estimation of tMRCA

All members from the 6 families and 10 index cases were genotyped for 11 microsatellites spanning 19.6 Mb around *PCSK9* (D1S211, D1S451, D1S2720, D1S197, D1S2661, D1S417,

D1S200, D1S2742, D1S220, D1S473, D1S390) and 6 Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) located in exon 1: p.(Leu21dup), intron 2: c.400-201 A>G, intron 3: c.524-90G>C and c.524-68G>C, intron 4: c.657+82 A>G, and exon 9: p.(Val474Ile) (**Figure 1**). The microsatellites PCR products (fluorescent-labeled specific primers) were analyzed in three multiplex runs on a Genetic Analyzer (Applied Biosystems 3500 Series). GeneMapper® software was used to define each individual genotype. SNPs in exons 1 and 4 were genotyped by Sanger sequencing and analyzed using CodonCode Aligner® Software. SNPs in exon 3 and exon 9 were genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays. In the 6 families, haplotypes were reconstructed manually. The age of the most recent common ancestor (tMRCA) of p.Ser127Arg carriers was estimated from the length of the haplotypes shared by the carriers using the *Estiage* software (16). For each p.(Ser127Arg) carrier, haplotypes were reconstructed using either familial information when available or using a maximum parsimony principle as recommended when using *Estiage*. Only microsatellite markers were considered. A mutation rate of 0.001 per meiosis was assumed and a stepwise mutation model was considered. Allele frequencies were estimated on 12 non-carrier individuals who were genotyped at the same markers as the carriers.

Results

The genotyping of 88 patients for, at first, the 6 intragenic SNPs and 3 flanking microsatellites (D1S417, D1S200, D1S2742) revealed that all p.(Ser127Arg) carriers share the same intragenic haplotype, L9-A-G-G-A-A (**Table 1**) previously identified in the HC2 and HC92 families (6). To estimate the age of the most recent common ancestor (tMRCA), additional microsatellites markers (D1S211, D1S451, D1S2720, D1S197, D1S2661, D1S220, D1S473, D1S390) were genotyped (**Table 1 & S1**). There is an ambiguity for the most likely ancestral haplotype carrying the p.(Ser127Arg) *PCSK9* mutation: 163-175-237-136-182-188-L9-A-G-G-A-A-169-248-235-240-208 (**Table 1**), and 163-175-237-136-182-188-L9-A-G-G-A-A-169-248-223-242-204 (**Table S1**). The age of the most recent common ancestor was estimated to be 23 generations with a 95% confidence interval (CI) of 16 to 35 for the first haplotype, and 26 generations with a 95% CI of 18 to 38 for the second haplotype. Assuming that one generation equals 25 years, the mutation would therefore be about 612 years old, between 400 and 950 years old with a 95% CI. The mutation would therefore have appeared in France between 1070 and 1620 AD, in a period of five centuries from the Christian Crusades to the regency of Queen Marie de Médicis.

While comparing the group of carriers to the non-carriers of the *PCSK9* p.(Ser127Arg) mutation, TC-MoM, LDL-MoM, and TG-MoM were significantly higher in the carrier's group while HDL-MoM was significantly lower (**Table 2**).

Discussion

In this study we estimated the age of the most recent common ancestor carrying the *PCSK9* p.(Ser127Arg) mutation in French ADH patients, using the Estiage software. And we showed that the mutation would have appeared between the 11th and the 16th century, around 612 years ago.

According to the worldwide ADH prevalence estimated at 1 in 312 (1), around 217,340 subjects in France may have heterozygous ADH which led to the creation of the French Registry of Familial Hypercholesterolemia (2,5). Among the investigated index cases included in the French Registry (N=2,054 patients), 1,150 (56%) carry an ADH-mutation including 1.8% (N=21 patients) in the *PCSK9* gene. The most frequent is the p.(Ser127Arg) detected in 14 patients (67%) (5). This low genetic heterogeneity in the French population suggests a founder effect. In a multinational study, to evaluate the *PCSK9* inhibitor alirocumab response, among the 17 p.(Ser127Arg) carriers 12 are from France, 3 from Norway, and 2 from South Africa, suggesting a French founder effect (17). *PCSK9* mutations are distributed in localized geographical regions and a limited number of persons. The absence of mutations overlapping between Holland and Japanese populations indicates geographically isolated mutations of recent origin (17).

A founder effect is also reported for loss of function mutants in *PCSK9* leading to hypocholesterolemia. The two common nonsense mutations, p.(Tyr142X) and p.(Cys679X), in African Americans are rare in European Americans and most carriers of either mutation share the same haplotype, suggesting that each is inherited from a single founder (18).

The *APOB* p.(Arg3527Gln) responsible for the familial defective apo B-100 (FDB) phenotype is reported in many ethnicities, most notably Europeans. Worldwide p.(Arg3527Gln) carriers have the same haplotype (XbaI, MspI, EcoRI), suggesting that all carriers share the same ancestor (19). In addition, the prevalence of this disorder in Switzerland is 1/209. This extremely high prevalence in Switzerland, and the prevalence gradient that persists in the neighboring regions (high prevalence in eastern France and southern Germany, low prevalence

in Italy), suggest that the mutation may have developed in the common ancestor of the population living in this region today (20). Based on a molecular and genetic approach the age of the *APOB* p.(Arg3527Gln) was estimated at 6,750 years ago (19). The *PCSK9* p.(Ser127Arg) seems to be much more recent, which could explain why it is less prevalent globally and less geographically dispersed.

This is the first study to date a gain of function *PCSK9* mutation. We provide molecular evidence that the p.(Ser127Arg) mutation originates from France. We cannot, however, rule out the likelihood that a founder from somewhere else brought the mutation to Europe at this time. For a better understanding of *PCSK9* variations' geographic distribution, additional demographic research is required.

Acknowledgments

The authors thank Alison Makhoul for her good technical advice and her help with the analysis of the microsatellites genotyping.

Author contributions

YA performed the genotyping, established the haplotypes, analyzed the data, and wrote the manuscript; OB, MDF, AC, HC, SB, and JPR performed the data and DNA collection; PM, JF and VC performed families recruitment; TL and EG estimated the tRMCA with the EstiAge software; CB and MA acquired the funding; MV designed and supervised the study, established the haplotypes, analyzed the data, acquired the funding and wrote the manuscript. All authors edited or commented the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the national project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by the National Research Agency (ANR-16-RHUS-0007) (MV), and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) (CB). YA is supported by grants from AMGEN funding (PCSK9013) (MV), the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L), and the Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon (MA).

Institutional Review Board Statement: The study was performed in accordance with French bio-ethics regulations with adherence to the Declaration of Helsinki principles. The research project received IRB approval (research project trial #05-07-06 approved by the French Consultative Committee for the Protection of Person in Biomedical Research, Paris, Necker).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is available on request to the corresponding author.

References:

1. Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(20):2553-66.
2. Béliard S, Boccara F, Cariou B, Carrié A, Collet X, Farnier M, et al. High burden of recurrent cardiovascular events in heterozygous familial hypercholesterolemia: The French Familial Hypercholesterolemia Registry. *Atherosclerosis.* 2018;277:334-40.
3. Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, Hegele RA, Santos RD, Wierzbicki AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17093.
4. Abou Khalil Y, Marmontel O, Ferrières J, Paillard F, Yelnik C, Carreau V, et al. APOE Molecular Spectrum in a French Cohort with Primary Dyslipidemia. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5792.
5. Rabès JP, Béliard S, Carrié A. Familial hypercholesterolemia: experience from France. *Curr Opin Lipidol.* 2018;29(2):65-71.
6. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-6.
7. Seidah NG. The PCSK9 discovery, an inactive protease with varied functions in hypercholesterolemia, viral infections, and cancer. *Journal of Lipid Research.* 2021;62:100130.
8. Martin WR, Lightstone FC, Cheng F. In Silico Insights into Protein-protein Interaction Disruptive Mutations in the PCSK9-LDLR complex. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):E1550.
9. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1448-53.
10. Huijgen R, Blom DJ, Hartgers ML, Chemello K, Benito-Vicente A, Uribe KB, et al. Novel PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) Variants in Patients with Familial Hypercholesterolemia From Cape Town. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(2):934-943..
11. Leren TP, Bogsrud MP. Molecular genetic testing for autosomal dominant hypercholesterolemia in 29,449 Norwegian index patients and 14,230 relatives during the years 1993-2020. *Atherosclerosis.* 2021;322:61-6.
12. Kaya E, Kayıkçıoğlu M, Tetik Vardarlı A, Eroğlu Z, Payzın S, Can L. PCSK 9 gain-of-function mutations (R496W and D374Y) and clinical cardiovascular characteristics in a cohort of Turkish patients with familial hypercholesterolemia. *Anatol J Cardiol.* 2017;18(4):266-72.

13. Ghaleb Y, Elbitar S, Khoury PE, Rabes JP, Boileau C, Abifadel M, et al. Usefulness of the genetic risk score to identify phenocopies in families with autosomal dominant hypercholesterolemia? *Atherosclerosis*. 2017;263:e83.
14. Mellerio H, Alberti C, Druet C, Capelier F, Mercat I, Josserand E, et al. Novel modeling of reference values of cardiovascular risk factors in children aged 7 to 20 years. *Pediatrics*. avr 2012;129(4):e1020-1029.
15. Balder JW, de Vries JK, Nolte IM, Lansberg PJ, Kuivenhoven JA, Kamphuisen PW. Lipid and lipoprotein reference values from 133,450 Dutch Lifelines participants: Age- and gender-specific baseline lipid values and percentiles. *J Clin Lipidol*. août 2017;11(4):1055-1064.e6.
16. Genin E. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 1 juin 2004;41(6):445-9.
17. Hopkins PN, Defesche J, Fouchier SW, Bruckert E, Luc G, Cariou B, et al. Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and Its Specific Treatment With Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody. *Circ Cardiovasc Genet*. déc 2015;8(6):823-31.
18. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. févr 2005;37(2):161-5.
19. Myant NB, Forbes SA, Day INM, Gallagher J. Estimation of the Age of the Ancestral Arginine3500→ Glutamine Mutation in Human ApoB-100. *Genomics*. oct 1997;45(1):78-87.
20. Miserez AR, Muller PY. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the mesolithic ancestors of Celtic peoples? *Atherosclerosis*. févr 2000;148(2):433-6.

Table 1

Family Nb carriers / Nb Meiosis Reference		Ancestral	HC2 8/7 (6)	HC92 16/13 (6)	HC748 5/4 *	HC806 4/2 (13)	HC2062 3/2 *	HCL1 2/1 *	Index cases									
Marker	Position**								1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									Haplotypes									
D1S211	43765684	163	163	181	183	169	165	175	163	165	183	163	183	163	183	185	183	165
D1S451	45291668	175	175	175	175	175	175	175	175	177	177	175	179	175	175	179	175	173
D1S2720	47442211	237	237	235	237	241	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237
D1S197	50284826	136	136	134	138	140	136	132	136	132	136	134	134	138	134	142	136	128
D1S2661	53869043	182	182	182	182	-	-	186	-	190	-	186	186	182	188	188	184	182
D1S417	54848120	188	188	188	188	188	188	188	-	188	190	188	188	188	188	188	188	188
p.(Leu21dup)	55039879	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9
p.(Ser127Arg)	55044016	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
400 -201 A>G	55046322	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
524-90 G>C	55052188	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
524-68 G>C	55052210	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
657+82 A>G	55052493	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
p.(Val474Ile)	55058564	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D1S200	55544489	169	169	169	169	169	169	169	-	169	169	169	169	169	169	169	169	163
D1S2742	56227761	248	248	248	260	248	248	246	-	248	-	246	248	248	248	248	246	240
D1S220	58820642	235	235	223	235	235	235	225	233	235	223	235	237	233	223	235	235	235
D1S473	61441151	240	238	242	240	240	240	252	234	234	242	242	244	242	244	244	240	244
D1S390	63334381	208	204	204	208	208	208	204	212	208	204	208	204	208	196	208	212	196

Table 1: Haplotypes of the 19.6 Mb region including *PCSK9* gene in the 6 families and 10 index cases. Microsatellites' number refers to the PCR product size given by GeneMapper® software. Recombinant alleles are highlighted in dark grey. The most likely ancestral haplotype is highlighted in light grey. * Figure S1. ** GRCh38.

Table 2

	Carriers p.(Ser127Arg)	Non-Carriers p.(Ser127Arg)	P value
N	48	40	
Age	34 (11.5-47.5)	22 (13-42)	0.69
Gender	26M/22F	22M/18F	0.57
TC-MoM	1.80 (1.61-2.04)	1.06 (0.93-1.23)	<0.0001
LDL-MoM	2.26 (1.54-2.79)	0.82 (0.64-0.96)	<0.0001
HDL-MoM	0.96 (0.74-1.12)	1.1 (0.98-1.30)	0.0012
TG-MoM	1.13 (0.89-1.49)	0.89 (0.69-1.22)	0.0061

Table 2: Demographic and biological characteristics of the p.(Ser127Arg) carriers and non-carriers

Continuous variables are expressed as Median with its interquartile ranges (1st quartile–3rd quartile). The Chi-square test and Mann–Whitney U test were used to perform univariate analysis.

Figure 1

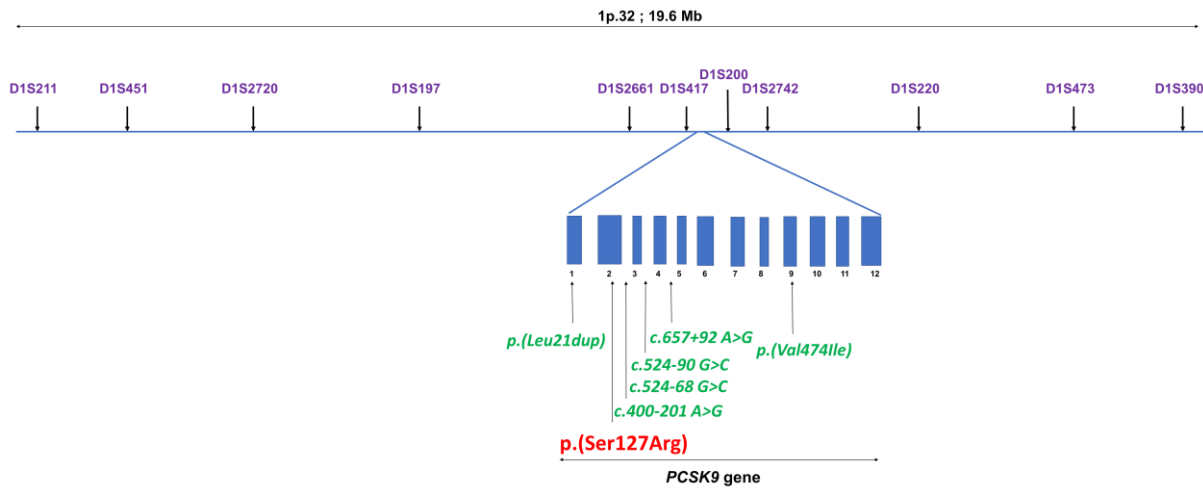
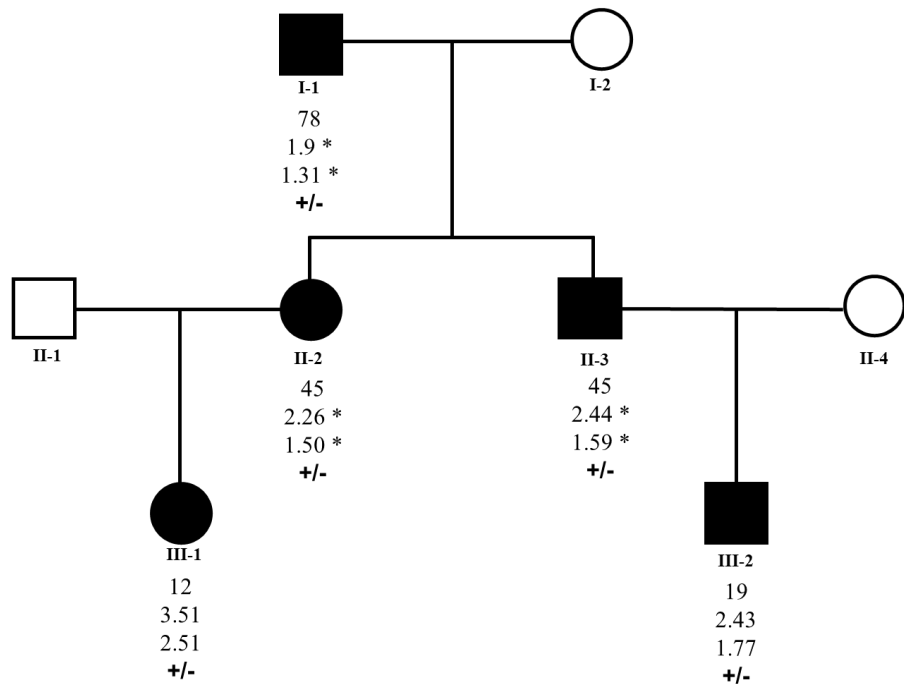


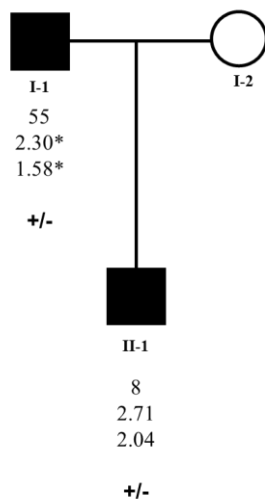
Figure 1: Diagram of the 19.6 Mb region at chromosome 1p.32 including the *PCSK9* gene. The 12 *PCSK9* exons are represented by the blue rectangles. The p.(Ser127Arg) mutation is shown in red. The 11 microsatellites are in purple and the 6 intragenic SNPs are in green.

Figure S1:

Family HC748



Family HCL1



Family HC2062

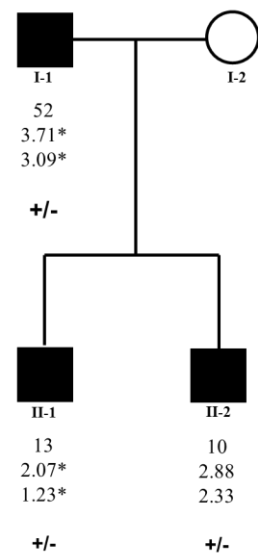


Figure S-1: Pedigree of three ADH families carrying the *PCSK9* p.(Ser127Arg) mutation. The characteristics of each individual are represented as follows: individual number, age (in years), total cholesterol (TC) levels (in g/L), and LDL-C levels (in g/L). +/- indicate individuals heterozygous for the mutation. * under cholesterol-lowering therapy.

Table S1

Family		Ancestral	HC2 8/7 (6)	HC92 16/13 (6)	HC748 5/4 *	HC806 4/2 (13)	HC2062 3/2 *	HCL1 2/1 *	Index cases									
Nb carriers / Nb Meiosis Reference									1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marker	Position**	Haplotypes																
D1S211	43765684	163	163	181	183	169	165	175	163	165	183	163	183	163	183	185	183	165
D1S451	45291668	175	175	175	175	175	175	175	175	177	177	175	179	175	175	179	175	173
D1S2720	47442211	237	237	235	237	241	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237	237
D1S197	50284826	136	136	134	138	140	136	132	136	132	136	134	134	138	134	142	136	128
D1S2661	53869043	182	182	182	182	-	-	186	-	190	-	186	186	182	188	188	184	182
D1S417	54848120	188	188	188	188	188	188	188	-	188	190	188	188	188	188	188	188	188
p.(Leu21dup)	55039879	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9	L9
p.(Ser127Arg)	55044016	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
400 -201 A>G	55046322	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
524-90 G>C	55052188	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
524-68 G>C	55052210	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
657+82 A>G	55052493	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
p.(Val474Ile)	55058564	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D1S200	55544489	169	169	169	169	169	169	169	-	169	169	169	169	169	169	169	169	163
D1S2742	56227761	248	248	248	260	248	248	246	-	248	-	242	248	248	248	248	246	240
D1S220	58820642	223	235	223	235	235	235	225	233	223	223	235	223	225	223	225	235	235
D1S473	61441151	242	238	242	240	240	240	252	234	234	242	242	244	242	244	244	240	244
D1S390	63334381	204	204	204	208	208	208	204	212	208	204	208	204	208	196	208	212	196

Table S1: Haplotypes of the 19.6 Mb region including PCSK9 gene in the 6 families and 10 index cases. Microsatellites' number refers to the PCR product size given by GeneMapper® software. Recombinant alleles are highlighted in dark grey. The most likely ancestral haplotype is highlighted in light grey. * Figure S1. ** GRCh38.

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons estimé l'âge de l'ancêtre commun de la mutation à effet fondateur p.(Ser127Arg) dans *PCSK9*.

Notre étude portait sur 10 proposant non apparentés ainsi que six familles d'origine française : la famille HC2 formée de 23 patients, la famille HC92 formée de 41 patients, la famille HC748 formée de 5 patients, la famille HC806 formée de 8 patients, la famille HC2062 formée de 4 patients, la famille de Lyon formée de 2 patients. Tous sont porteurs de la mutation p.(Ser127Arg).

Afin de pouvoir dater la mutation, des haplotypes ont été construits avec 3 marqueurs microsatellites (D1S200, D1S417, D1S2742) couvrant la région 1p34.1-p32 autour de *PCSK9*. J'ai réalisé le génotypage des microsatellites en utilisant des séquenceurs automatiques (le logiciel GeneMapper® a été utilisé pour déterminer la longueur des allèles (pb)) (**Figure 28**). En plus de ces 3 microsatellites, j'ai génotypé 6 SNPs dans *PCSK9* : p.(Leu21dup), c.524-68 G>C, c.524-90G>C, c.657+82 A>G, analysés par séquençage Sanger et c.400-201 A>G, p.(Val474Ile) analysés par sondes TaqMan® allèles spécifiques afin de discriminer entre les deux allèles d'un SNP déterminé (**Figure 29**).

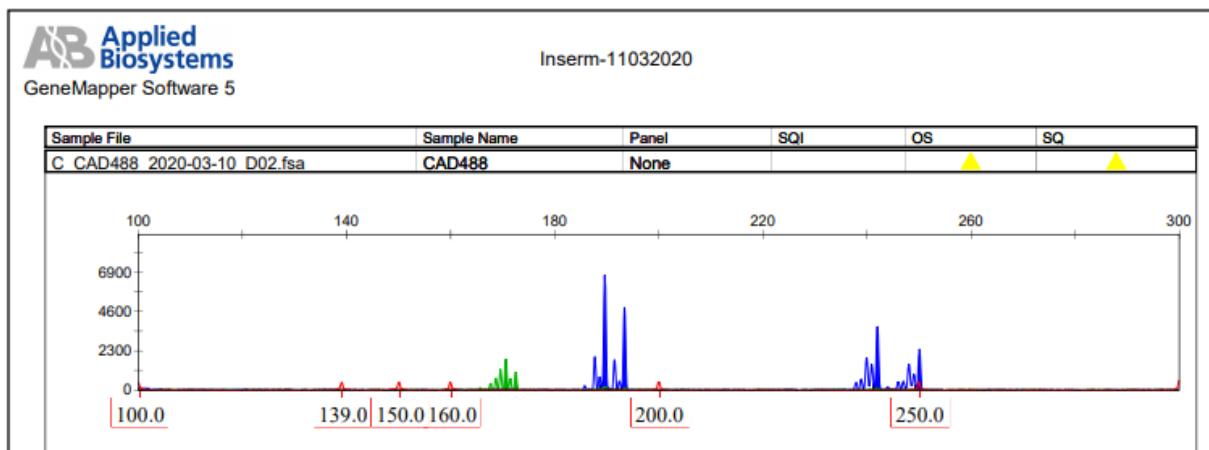


Figure 28 : Résultats des microsatellites.

Les pics représentent les allèles différents de chaque microsatellite. Ces derniers sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces couplées à des fluochromes (FAM (fluorescéine, fluorescent dans le bleu) et HEX (6-carboxy 2',4',7',4,7-hexachlorofluorescéine, fluorescent dans le jaune)). Ainsi, pour un même individu, plusieurs microsatellites de tailles proches peuvent être analysés dans un même run. Un marqueur de taille couplé à un fluorochrome (ROX) est présent dans chaque puits et migre en même temps que les produits PCR. Cela permet de calibrer et de définir la taille des différents allèles du microsatellite dans l'intervalle 50-350 pb. Le logiciel GeneMapper® est utilisé pour déterminer la taille des différents allèles des microsatellites (pb).

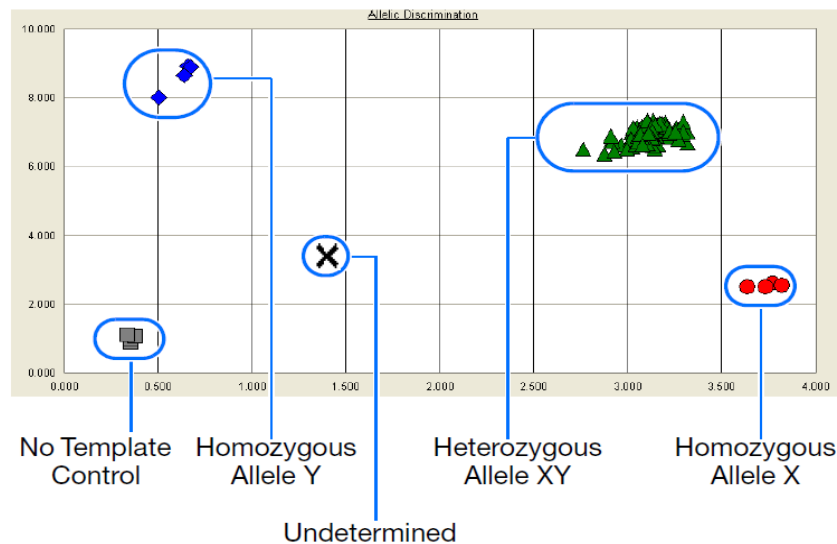


Figure 29 : Résultats de Génotypage

Appareil Real-Time PCR de Applied Biosystems ®

Pour l'analyse des haplotypes, pour chaque marqueur, l'allèle commun chez les porteurs de la p.(Ser127Arg) a été interprété comme l'allèle associé à la mutation. Les résultats préliminaires ont montré que l'haplotype des porteurs de la mutation p.(Ser127Arg) est le même dans toutes les familles étudiées ainsi que chez les 10 cas isolés : 5'-188/190-L9-A-G-G-A-A-169-248-3'. La différence pour les allèles du microsatellite D1S417, 188/190, peut être due à la perte d'une répétition CA au cours des générations. Ces résultats ont validé l'effet fondateur déjà connu de la mutation p.(Ser127Arg) (Abifadel et al., 2003).

Afin de dater l'âge de l'ancêtre commun le plus récent, des microsatellites supplémentaires (D1S211, D1S451, D1S2720, D1S197, D1S2661, D1S220, D1S473, D1S390) ont été ajoutés, élargissant la région génotypée autour de la mutation. Les résultats de l'analyse des haplotypes ont révélé que l'haplotype ancestral le plus probable porté par tous les patients était : 5'-163-175-237-136-182-188-L9-A-A-G-G-A-A-169-248-235-240-208/-223-242-204-3'.

L'âge de l'ancêtre commun le plus récent a été estimé à partir d'une méthode de vraisemblance qui utilise des marqueurs hautement polymorphes développée par l'équipe d'Emmanuelle Genin à Brest (*Estiage* software). Cette méthode est basée sur les informations fournies par les individus atteints. La longueur des haplotypes hérités sous forme de segments du porteur ancestral varie en raison d'événements de recombinaison aléatoires. Sur la base de leurs longueurs qui diminuent avec le temps, l'âge de la variation est estimé.

L'âge de l'ancêtre commun le plus récent de la mutation p.(Ser127Arg) est estimé à 23-26 générations avec un intervalle de confiance à 95 % (de 16 à 38). En supposant qu'une génération est égale à 25 ans, la mutation serait donc âgée d'environ 612 ans (intervalle de confiance à 95% de 400 à 950).

Les mutations gain de fonction de *PCSK9* sont identifiées dans des populations localisées dans des zones géographiques déterminées et dans un nombre limité de familles. Ainsi, l'isolement géographique de ces mutations suggère qu'elles sont probablement dues à des mutations privées dans différentes populations et sont alors des mutations à effet fondateur. C'est le cas de la mutation p.(Ser127Arg) retrouvée quasi-exclusivement chez des patients FH français et qui est datée à 612 ans.

La mutation p.(Ser127Arg) de *PCSK9* est aussi retrouvée en Norvège (Leren & Bogsrud, 2021) et en Afrique du Sud (Huijgen et al., 2021) et serait apparût en France entre l'an 1070 et l'an 1620, dans une période de 5 siècles (XI^{ème} – XVII^{ème}) des croisades au règne de Marie de Médicis. Sur la fin de cette période, des migrations de France vers l'Europe du Nord et l'Afrique sont survenues avec l'exode des huguenots français vers les pays protestants afin d'échapper aux persécutions. De 1560 à 1760, plus de deux cent mille huguenots ont pri le chemin de l'exil. Une première vague de départ a lieu dès le XVI^e siècle avec les premières persécutions de 1560, et surtout après la Saint-Barthélemy, des fugitifs quittent le royaume pour Genève, l'Angleterre ou les Pays Bas. D'autres huguenots, très minoritaires, s'établissent plus loin : dans les états protestants du nord de l'Europe (Danemark, Norvège, Suède) jusqu'à Saint-Pétersbourg et outre-mer en Afrique du Sud ou dans les colonies britanniques d'Amérique du Nord (« Le Refuge huguenot », s. d.). Environ 1 200 des 200 000 protestants qui quittèrent la France après la révocation de l'édit de Nantes, de 1685 à 1715, choisissent de partir pour l'Afrique du Sud et rejoignirent la colonie du Cap. Aujourd'hui, 20% des Afrikaners (Sud-africain blanc d'origine néerlandaise, française, allemande ou scandinave) portent des noms français. Une seconde vague d'émigration vers le Nord a lieu entre 1720 et 1750, en liaison avec l'essor du commerce colonial car les ports de la mer du Nord et de la Baltique possédaient d'importantes communautés de réfugiés huguenots très impliqués dans le commerce international. En Norvège, Jacques Buttaud, originaire de Saint-Martin-de-Ré, se réfugie à Bergen, où il crée une entreprise d'importation de vin et de sel français. Quelques années plus tard, en 1716, le roi de France le nomme consul de la nation française dans le port norvégien (Pourchasse, 2010).

En supposant que la mutation identifiée aujourd'hui en Norvège et en Afrique du Sud soit issue du même ancêtre commun que la mutation française, elle serait apparue avant ces

migrations de protestants vers l'Europe du Nord et l'Afrique. A notre connaissance, la mutation p.(Ser127Arg) de *PCSK9* n'est pas rapportée dans d'autres pays refuge des hugenots.

L'étude de l'haplotypage de la région encadrant *PCSK9* chez ces porteurs de la mutation p.(Ser127Arg) Norvégiens et Sud-Africains est en cours d'étude et pourrait apporter plus d'éléments quant à l'origine de cette mutation gain de fonction de *PCSK9*.

Chapitre 2 : Dosage de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique libanaise

1. Introduction

PCSK9 est le troisième gène impliqué dans l'ADH (Abifadel et al., 2003). Il code une protéine qui induit la dégradation des récepteurs des LDL au niveau hépatique indépendamment de son activité catalytique jouant ainsi un rôle dans l'homéostasie du cholestérol (Abifadel et al., 2014). Les mutations gain de fonction de *PCSK9* sont responsables de l'hypercholestérolémie alors que les mutations perte de fonction sont associées à des concentrations faibles de LDL-C (Baass et al., 2009).

Des études réalisées chez l'adulte ont montré que les taux plasmatiques de PCSK9 sont positivement corrélés au taux de cholestérol total et de LDL-C (Alborn et al., 2007; Mayne et al., 2007). De plus, d'autres études ont montré que les taux circulants de PCSK9 sont significativement corrélés à la glycémie à jeun et à l'indice de masse corporelle (BMI) (Dubuc et al., 2010).

Une étude réalisée par Bass et al. dans une cohorte d'enfants et d'adolescents a montré que les taux circulants de PCSK9 sont associés à l'âge, au sexe et à de multiples marqueurs métaboliques dans l'enfance (Baass et al., 2009). En effet, les taux de cholestérol dans l'enfance et l'adolescence peuvent prédire la survenue de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Labarthe et al., 2003).

La population libanaise est caractérisée par une fréquence élevée de dyslipidémies. Une étude réalisée chez des enfants libanais âgés de 2 à 10 ans a montré une prévalence élevée de dyslipidémies dans cette cohorte par rapport aux enfants des autres populations (Georges et al., 2019). Cependant, les taux plasmatiques de PCSK9 n'ont pas été mesurés dans des populations pédiatriques du Moyen Orient. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les taux plasmatiques circulants de PCSK9 dans une cohorte formée d'écoliers libanais âgés entre 8 et 18 ans et d'étudier son association avec l'âge, le sexe, le BMI, les paramètres lipidiques et la Lp(a). De plus, les relations entre PCSK9 et la ménarche chez les filles et entre PCSK9 et le taux de testostérone chez les garçons sont évaluées.

2. Article 2

Circulating PCSK9 Linked to Dyslipidemia in Lebanese Schoolchildren

Yara Azar, Marie-Hélène Gannagé-Yared, Elie Naous, Carine Ayoub, Yara Abou Khalil, Elise Chahine, Sandy Elbitar, Youmna Ghaleb, Catherine Boileau, Mathilde Varret, Petra El Khoury, Marianne Abifadel

Metabolites. 2022 May 31;12(6):504. doi: 10.3390/metabo12060504

Article

Circulating PCSK9 Linked to Dyslipidemia in Lebanese Schoolchildren

Yara Azar ^{1,2,3,†}, Marie-Hélène Gannagé-Yared ^{4,5,*†}, Elie Naous ⁵, Carine Ayoub ¹, Yara Abou Khalil ^{1,2}, Elise Chahine ⁵, Sandy Elbitar ^{1,2}, Youmna Ghaleb ^{1,2}, Catherine Boileau ^{2,3,6}, Mathilde Varret ^{2,3}, Petra El Khoury ^{1,2,†} and Marianne Abifadel ^{1,2,†}

- ¹ Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie-Santé (PTS), Saint-Joseph University of Beirut, Beirut 17-5208, Lebanon; yara.azar@inserm.fr (Y.A.); carine.ayoub@net.usj.edu.lb (C.A.); aboukhalilyara@gmail.com (Y.A.K.); sandyelbitar@gmail.com (S.E.); youmna.ghaleb@inserm.fr (Y.G.); petra.el-khoury@inserm.fr (P.E.K.); marianne.abifadel@usj.edu.lb (M.A.)
 - ² Laboratory for Vascular Translationnal Science (LVTS), INSERM U1148, Bichat Hospital, F-75018 Paris, France; catherine.boileau@inserm.fr (C.B.); mathilde.varret@inserm.fr (M.V.)
 - ³ Centre Hospitalo-Universitaire Xavier Bichat, Paris Cité University, F-75018 Paris, France
 - ⁴ Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Saint-Joseph University of Beirut, Beirut 17-5208, Lebanon
 - ⁵ Division of Endocrinology, Hôtel-Dieu de France Hospital, Beirut 166830, Lebanon; elie.naous@net.usj.edu.lb (E.N.); elise.adel.chahine@gmail.com (E.C.)
 - ⁶ Genetic Department, AP-HP, Centre Hospitalo-Universitaire Xavier Bichat, F-75018 Paris, France
- * Correspondence: mariehelene.yared@usj.edu.lb
† These authors contributed equally to the work.

Citation: Azar, Y.; Gannagé-Yared, M.-H.; Naous, E.; Ayoub, C.; Abou Khalil, Y.; Chahine, E.; Elbitar, S.; Ghaleb, Y.; Boileau, C.; Varret, M.; et al. Circulating PCSK9 Linked to Dyslipidemia in Lebanese Schoolchildren. *Metabolites* **2022**, *12*, 504. <https://doi.org/10.3390/metabo12060504>

Academic Editor: Clinton Bruce

Received: 26 April 2022

Accepted: 24 May 2022

Published: 31 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In adults, elevated levels of circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) have been associated with increased Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), and worse cardiovascular outcomes. However, few studies analyzed the relation between PCSK9 and lipid parameters in pediatric populations. The aim of our study is to evaluate the distribution and the correlation of serum PCSK9 levels with lipid parameters in a sample of Lebanese school children. Using an immunofluorescence assay, we measured serum PCSK9 levels in 681 school children recruited from ten public and private Lebanese schools. We analyzed the association between PCSK9 and age, sex, Body Mass Index (BMI), and lipid parameters (total cholesterol (TC), LDL-C, TG, High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), non-HDL-C, and lipoprotein (a) (Lp(a)). Serum PCSK9 levels were significantly correlated with TC, LDL-C, and non-HDL-C (p value < 0.0001) but not with TG, HDL-C, and Lp(a). PCSK9 levels were also significantly higher in children with high TC, LDL-C, and non-HDL-C (p values = 0.0012, 0.0002, 0.001, respectively). No significant gender differences in PCSK9 were found. In addition, no significant associations between PCSK9 and both age and BMI percentiles were observed. In girls, no difference in PCSK9 values was observed according to menarche while in boys, testosterone levels were not significantly associated with PCSK9. Serum PCSK9 levels were significantly correlated with TC, LDL-C, and non-HDL-C levels. Further studies are needed to find if PCSK9 measurements have an additional value to predict future cardiovascular outcomes in pediatric populations.

Keywords: pediatric; dyslipidemia; PCSK9; lipoprotein (a); cholesterol; Lebanon

1. Introduction

Atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) is a leading cause of mortality in the world [1]. Atherosclerotic lesions begin early in life and are highly correlated with dyslipidemia [2–4]. At an early age, high low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ac-

celerates the onset of atherosclerosis leading to coronary heart disease (CHD) in adulthood [5]. Early diagnosis and optimal management of abnormal lipid profile will likely slow down the progression of atherosclerosis [6]. Lipoprotein(a) (Lp(a)) is another lipoprotein associated to ASCVD [7]. It has a similar composition to LDL-C and is characterized by the presence of a covalent bond between apolipoprotein(a) (apo (a)) and apolipoprotein(B) (apo B100) [8].

The Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) gene was identified in 2003 by Abifadel et al. as the third gene responsible for familial hypercholesterolemia (FH) [9]. The encoded protein of 692 amino acids is an enzyme belonging to the large family of proprotein convertases, and it is mainly expressed in the liver, gut, kidney, and nervous system [10]. PCSK9 degrades the LDL receptor (LDLr) by binding to its epidermal growth factor-like domain A (EGF-A) independently of its catalytic activity and directs the LDLr into lysosomes for degradation [10]. The PCSK9 gain of function variants are associated with elevated levels of LDL-C and are responsible for some forms of FH and an increase in coronary heart disease [11], while loss-of-function variants are associated with low LDL-C levels and a decrease in ASCVD risk [12]. In adult populations, several studies have evaluated the association between PCSK9 levels and other lipid or inflammatory parameters [13–16]. Elevated levels of circulating PCSK9 have also been associated with increased LDL-C, triglycerides (TG), and worse cardiovascular outcomes [17]. However, only one study has been conducted on children based on a French-Canadian population sample [18].

Dyslipidemia refers to a group of lipid disorders characterized by high levels of total cholesterol (TC), LDL-C, non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C), TG, and low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) [19]. Non-HDL-C, which is calculated by subtracting HDL-C from TC, is as good as or better than other lipid measures, such as LDL-C, in predicting atherosclerosis. In addition, because in children the difference between fasting and nonfasting TG levels is minimal, a nonfasting measurement of TG could be reliable [20].

Dyslipidemia is highly prevalent in Lebanon in both adults [21,22] and children [19,23,24]. In our previous study, we found that the prevalence of high non-HDL-C, high TG, and high Lp(a) in Lebanese school children are, respectively, 9.2%, 26.6%, and 14.4% [23,24]. However, PCSK9 has never been measured in Middle Eastern pediatric populations.

The objective of this study is to evaluate circulating PCSK9 levels in a sample of the Lebanese pediatric population and to characterize its association with age, gender, BMI, lipid parameters, and Lp(a). In addition, the relationship of PCSK9 with menarchal status in girls and with testosterone in boys is assessed.

2. Results

2.1. Characteristics of the Population

A total of 681 children, 347 boys and 334 girls (50.95% boys and 49.05% girls) were included in the study (Table 1). The median age of the population was 12.94 (10.68–14.73) years with no significant gender difference (p -value = 0.19). As shown in Table 1, 40.97% of subjects are aged between 8–11 years, 35.7% between 12 to 15 years, and 23.3% between 15 and 18 years. A total of 183 girls (54.80%) had their menarche.

Table 1. Baseline demographic, BMI percentile, and lipid parameters of the total population, and boys and girls when taken separately. Categorical variables are expressed as percentages and non-normal continuous variables are expressed as Median with its interquartile ranges (1st quartile–3rd quartile).

	Total Population (<i>n</i> = 681)	Boys (<i>n</i> = 347)	Girls (<i>n</i> = 334)
Age	12.94 (10.68–14.73)	13.21 (10.80–14.73)	12.54 (10.52–14.73)
Age groups			
8–11 years (<i>n</i> = 279)	40.97%	37.18%	44.91%
12–14 years (<i>n</i> = 243)	35.68%	39.19%	32.04%
15–18 years (<i>n</i> = 159)	23.35%	23.63%	23.05%
BMI percentiles			
Obese (<i>n</i> = 77)	11.31%	13.26%	9.28%
Overweight (<i>n</i> = 130)	19.09%	21.90%	16.17%
Normal or thinness (<i>n</i> = 474)	69.60%	64.84%	74.55%
Lipid parameters			
TC (mmol/L)	4.10 (3.60–4.60)	4.00 (3.54–4.50)	4.19 (3.60–4.60)
LDL-C (mmol/L)	2.50 (2.08–2.96)	2.45 (2.05–2.94)	2.56 (2.14–3.01)
TG (mmol/L)	1.08 (0.80–1.56)	1.05 (0.75–1.48)	1.14 (0.84–1.61)
HDL-C (mmol/L)	1.30 (1.10–1.50)	1.25 (1.10–1.50)	1.30 (1.10–1.50)
Non-HDL-C (mmol/L)	2.70 (2.30–3.20)	2.61 (2.27–3.20)	2.80 (2.32–3.30)
Lp(a) (nmol/L)	26 (10–48)	25 (10–46)	26 (10–55)

The median BMI percentile was 69.50 (38.00–88.90) with no significant difference between boys and girls [70.20 (38.20–90.70) vs. 68.60 (37.70–85.35), respectively, p -value = 0.23]. 11.31% (13.26% boys and 9.28% girls) of the participants were obese and 19.09% (21.90% boys and 16.17% girls) were overweight, with a significant gender difference when comparing the 3 BMI groups (p -value = 0.02).

2.2. Distribution of Lipid Parameters According to Age and Gender

Lipid parameters in the entire population and by gender are also shown in Table 1. Girls had significantly higher TC, non-HDL-C, and TG levels than boys (p values of 0.02, 0.048, and 0.03, respectively), while no significant gender differences are observed for HDL-C and LDL-C. No significant difference was observed in Lp(a) between girls and boys (p -value = 0.34). 19 children (2.8%) had very high LDL-C (≥ 4.1 mmol/L) suggestive of FH [25]. However, in these children, we did not collect information on their family history of premature coronary artery disease or perform a DNA analysis to confirm the diagnosis of FH.

2.3. PCSK9 Levels Distribution in the Overall Population

In the overall population, serum PCSK9 levels varied from 13.48 to 692.9 ng/mL (Figure 1) with no significant gender difference (p -value = 0.60) as shown in Table 2. No significant correlation was observed between PCSK9 and both age and BMI percentiles in the entire sample ($r = -0.013$, $p = 0.74$; $r = 0.035$, $p = 0.36$, respectively), and when the analysis was performed separately in boys and girls (For age: [$r = -0.079$, $p = 0.14$ in boys and $r = 0.057$, $p = 0.30$ in girls]). For BMI percentiles: [$r = 0.08$, $p = 0.14$ in boys and $r = -0.036$, $p = 0.51$ in girls, respectively]) (Table 2).

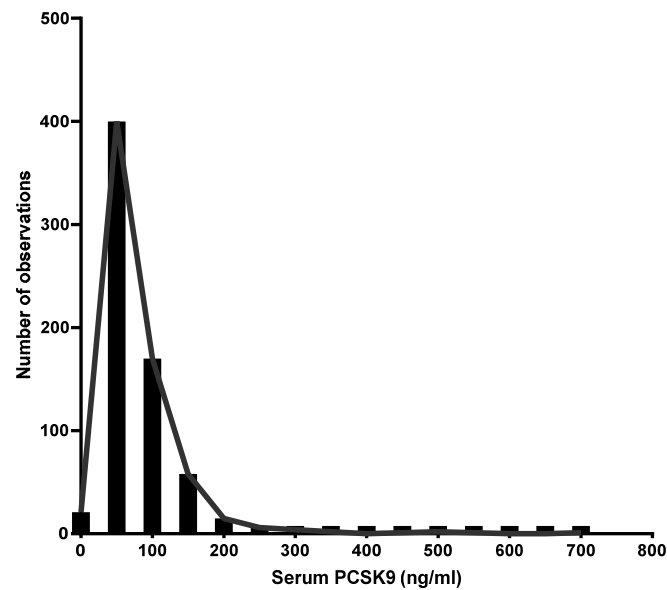


Figure 1. The distribution of serum proprotein-convertase-subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in the overall population.

Table 2. The relationship between PCSK9 levels and age and Body Mass Index (BMI). The PCSK9 concentrations (ng/mL) are expressed as median with interquartile ranges (1st quartile–3rd quartile). The Mann–Whitney U test was used to calculate the *p* values of PCSK9 between boys and girls. The Kruskal–Wallis test yielded *p* values for age groups and BMI categories.

Characteristics	Total Population	Boys	Girls	<i>p</i> -Value (Gender)
Total population	63.22 (44.59–91.80)	65.14 (42.40–95.80)	62.05 (46.48–88.45)	0.60
Age groups				
8–11 years (<i>n</i> = 279)	64.30 (46.95–93.38)	71.08 (47.55–109.0)	59.63 (46.26–86.75)	0.07
12–14 years (<i>n</i> = 243)	63.22 (42.82–86.83)	63.62 (40.53–85.91)	63.16 (46.36–88.18)	0.91
15–18 years (<i>n</i> = 159)	60.55 (44.51–93.96)	58.70 (40.69–86.03)	61.74 (47.30–95.34)	0.35
<i>p</i> -value (age groups)	0.49	0.13	0.71	
BMI percentiles				
Obese	64.86 (46.60–90.45)	67.41 (48.34–99.83)	58.84 (44.76–85.71)	0.55
Overweight	68.30 (49.17–100.10)	73.80 (48.97–102.60)	62.67 (48.94–96.08)	0.39
Normal or thinness	61.56 (43.26–89.69)	60.02 (40.61–94.41)	62.25 (46.36–88.70)	0.75
<i>p</i> -value (BMI group)	0.13	0.15	0.76	

2.4. PCSK9 Relationship with Lipid Parameters

In the total population, PCSK9 levels correlated significantly, with TC, LDL-C and non-HDL-C levels: $r = 0.198$, $p < 0.0001$; $r = 0.196$, $p < 0.0001$; and $r = 0.185$, $p < 0.0001$, respectively. This correlation was still significant when boys and girls were analyzed separately: $r = 0.19$, $p = 0.0003$; $r = 0.19$, $p = 0.0003$; and $r = 0.18$, $p = 0.0011$, respectively, for boys, and $r = 0.21$, $p < 0.0001$; $r = 0.21$, $p < 0.0001$; and $r = 0.21$, $p < 0.0001$, respectively, for girls.

However, in the overall population as well as in boys and girls, no significant correlation between PCSK9 and TG was found ($r = 0.037$, $p = 0.33$; $r = 0.038$, $p = 0.49$; and $r = 0.047$, $p = 0.39$, respectively). Similarly, no significant correlation was found between PCSK9 and HDL-C ($r = 0.028$, $p = 0.46$; $r = 0.055$, $p = 0.31$; and $r = 0.00038$, $p = 0.99$, respectively), or Lp(a) ($r = -0.022$, $p = 0.56$; $r = -0.067$, $p = 0.21$; and $r = 0.034$, $p = 0.53$, respectively).

2.5. Comparison of PCSK9 Levels between Normolipidemic and Hyperlipidemic Subgroups

In the overall population, 53 subjects (7.78%) had high TC, 87 (12.78%) had high LDL-C, 72 (10.57%) had high non-HDL-C, and 198 (29.07%) had high TG. The PCSK9 levels were 31.80%, 26%, and 18.7% higher in the subgroups with high TC, high LDL-C, and high non-HDL-C, respectively, compared to the normal/borderline subgroups ($p = 0.001$, $p = 0.0002$, $p = 0.001$, respectively) (Figure 2). No significant difference was found in PCSK9 levels between the subgroup with high TG compared to the one with normal/borderline TG (p -value = 0.86) (Table 3).

Finally, PCSK9 levels did not differ between the 88 children (12.92%) with abnormal Lp(a) levels and the rest of the sample (p -value = 0.23) (Table 3).

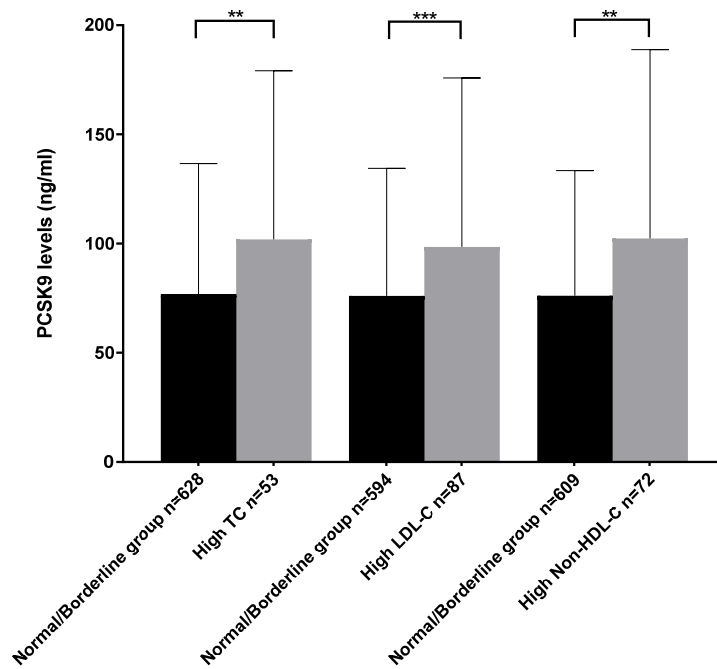


Figure 2. Median PCSK9 levels in the normal group and in the three subgroups [high TC (≥ 5.2 mmol/L), high LDL-C (≥ 3.4 mmol/L), high Non-HDL-C (≥ 3.8 mmol/L)]. ** $p = 0.001$, *** $p = 0.0002$.

Table 3. Baseline demographic, PCSK9 values, and lipid parameters of the five subgroups (high TC, high LDL-C, high Non-HDL-C, high Lp(a), high TG) when taken independently. Categorical variables are expressed as percentages and non-normal continuous variables are expressed as median with its interquartile ranges (1st quartile–3rd quartile).

	Normal/ Borderline Group (n = 628)	High TC (n = 53)	Normal/ Borderline Group (n = 594)	High LDL-C (n = 87)	Normal/ Borderline Group (n = 609)	High Non-HDL-C (n = 72)	Normal/ Borderline Group (n = 593)	High Lp(a) (n = 88)	Normal/ Borderline Group (n = 483)	High TG (n = 198)
Age	12.95 (10.74–14.71)	12.72 (10.15–15.15)	12.95 (10.67–14.71)	12.94 (10.92–15.28)	12.94 (10.72–14.69)	13.00 (10.32–15.40)	12.90 (10.59–14.71)	13.31 (11.32–14.95)	13.18 (10.88–15.23)	12.33 (10.34–14.24)
PCSK9 value (ng/mL)	62.29 (44.05–89.17)	82.10 (55.72–120.6)	61.30 (43.98–88.25)	77.25 (53.60–119.10)	61.85 (43.99–89.31)	73.40 (57.18–118.60)	63.85 (45.31–92.13)	58.09 (41.15–84.92)	63.39 (45.07–90.96)	62.95 (43.85–96.05)
Lipid parameters										
TC (mmol/L)	4.00 (3.57–4.40)	5.60 (5.43–5.90)	4.00 (3.50–4.380)	5.30 (4.90–5.70)	4.00 (3.52–4.40)	5.48 (5.00–5.80)	4.10 (3.60–4.59)	4.10 (3.73–4.78)	4.00 (3.50–4.47)	4.30 (3.89–4.80)
LDL-C (mmol/L)	2.44 (2.06–2.84)	3.94 (3.59–4.20)	2.40 (2.04–2.79)	3.62 (3.45–4.05)	2.41 (2.05–2.81)	3.77 (3.55–4.10)	2.48 (2.07–2.95)	2.59 (2.19–3.10)	2.40 (2.04–2.86)	2.77 (2.29–3.25)
TG (mmol/L)	1.05 (0.78–1.50)	1.38 (1.09–1.91)	1.025 (0.77–1.47)	1.43 (1.10–1.92)	1.02 (0.77–1.44)	1.74 (1.22–2.45)	1.07 (0.79–1.57)	1.20 (0.84–1.54)	0.89 (0.71–1.13)	1.92 (1.63–2.46)
HDL-C (mmol/L)	1.30 (1.10–1.50)	1.30 (1.15–1.65)	1.30 (1.10–1.50)	1.20 (1.00–1.40)	1.30 (1.10–1.50)	1.10 (1.00–1.32)	1.30 (1.10–1.50)	1.30 (1.1–1.50)	1.30 (1.20–1.50)	1.10 (1.00–1.30)
Non-HDL-C (mmol/L)	2.64 (2.30–3.10)	4.30 (3.90–4.55)	2.60 (2.26–3.00)	4.00 (3.72–4.38)	2.60 (2.30–3.10)	4.10 (3.90–4.40)	2.70 (2.30–3.20)	2.90 (2.40–3.30)	2.60 (2.20–3.00)	3.11 (2.70–3.70)
Lp(a) (nmol/L)	24 (10–46.75)	44 (20–104)	24 (10–46.25)	35 (15–65)	25 (10–48)	32.50 (14.25–62)	21 (8–40)	130 (94–175)	25 (10–48)	29 (10–52)

2.6. Relationship between PCSK9 and Menarche in Girls and Testosterone in Boys

The PCSK9 levels did not differ significantly between girls who already had their menarche ($n = 183$) and those who did not ($n = 151$) (61.85 ng/mL (46.64–89.65) vs. 62.32 ng/mL (46.36–87.81), p -value = 0.94).

A significant positive correlation between serum PCSK9 levels and TC, LDL-C and non-HDL-C was observed in post menarche ($r = 0.323$, $p < 0.0001$; $r = 0.30$, $p < 0.0001$; $r = 0.31$, $p < 0.0001$, respectively), but not in pre-menarche ($r = 0.077$, $p = 0.34$; $r = 0.071$, $p = 0.38$; $r = 0.071$, $p = 0.39$, respectively).

In boys, the correlation between serum PCSK9 levels and testosterone levels for values above the detectable threshold of >20 ng/mL ($n = 216$) was not significant ($r = -0.014$, p -value = 0.84).

2.7. Multiple Linear Regression Analysis with PCSK9 as the Dependent Variable

Using multiple linear regression, PCSK9 remained significantly associated with non-HDL-C in both boys and girls (respective p -values = 0.0003 and 0.0001), while no independent association was found between PCSK9 and age, BMI, TG, HDL-C (Table 4).

Table 4. Two separate multiple linear regression analyses for boys and girls with PCSK9 as a dependent variable and age, BMI, non-HDL-C, TG, HDL-C, and Lp(a) as independent variables. Due to their non-normal data, lipid parameters, and BMI were entered into the model using their natural logarithmic transform. BMI: Body Mass Index.

Variable	B	Std. Error	p -Value
A-Boys			
Intercept	4.07	0.28	<0.0001
Age	-0.007	01	0.62
Ln (BMI)	-0.03	0.04	0.43
Ln (Non-HDL-C)	0.48	0.13	0.0003
Ln (TG)	0.02	0.08	0.84
Ln (HDL-C)	0.25	0.17	0.16
Ln (Lp(a))	-0.06	0.03	0.07
B-Girls			
Intercept	3.55	0.23	<0.0001
Age	0.02	0.01	0.11
Ln (BMI)	-0.02	0.03	0.52
Ln (Non-HDL-C)	0.48	0.12	0.0001
Ln (TG)	-0.01	0.07	0.86
Ln (HDL-C)	0.04	0.14	0.78
Ln (Lp(a))	-0.006	0.03	0.82

3. Discussion

Our results showed a positive correlation between PCSK9 and TC, LDL-C, and non-HDL-C levels in a sample of 681 Lebanese school children. This finding was observed in both boys and girls. The same result was also found in a sample of 1736 French-Canadian children and adolescents aged 9, 13, and 16 years [18]. Other studies have also demonstrated that serum PCSK9 levels were significantly correlated with TC concentrations and serum LDL-C in adults [16,17]. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 is one of the ligands of LDLr; it uses it as an exit route from the plasma compartment while also inducing its degradation; thus, plasma PCSK9 levels, LDLr expression, and plasma LDL-C levels are all reciprocally regulated [26]. The PCSK9 half-life was shown to be much longer in LDLr $^{-/-}$ mice, while overexpression of hepatic LDLr decreases serum levels of murine

PCSK9 [27]. The LDL particle also increases PCSK9 affinity for the LDLr by protecting its cleavage from furin; this results in a substantial decrease in plasma PCSK9 activity [26].

Interestingly, we found significantly higher PCSK9 levels among children with high TC, LDL-C, and non-HDL-C groups compared to those with lower levels. As far as we know, our study is the first to report this association. It has already been shown in adults that PCSK9 levels were higher in untreated homozygous or heterozygous FH patients compared to controls and that there was a correlation between PCSK9 levels and LDL-C in untreated subjects with FH [15,28]. It is noteworthy that another study has demonstrated that PCSK9 levels could be related to cardiovascular (CV) events independently of the levels of atherogenic lipoproteins [29]. Finally, Leander et al. showed that even after adjusting for known CV risk factors, the association between serum PCSK9 and CV risk remained, suggesting that PCSK9 levels may play a role in CV events apart from regulating LDL cholesterol [30].

We did not find any correlation between both TG, HDL-C levels, and serum PCSK9 concentrations, although Baass et al. reported in a French-Canadian pediatric cohort a correlation between PCSK9 and both TG and HDL-C levels in boys and girls [18]. Lakoski et al. also found in adults a positive association between PCSK9 and TG in a large ethnically diverse population [17]. On the opposite, and similarly to our report, Lambert et al. did not show this correlation [31]. Ethnic differences, non-fasting samples, or the smaller sample of our population could explain these differences.

We also did not find any correlation between PCSK9 and Lp(a). The correlation between PCSK9 and Lp(a) has never been studied in children. In adult populations, PCSK9 has been found to be positively correlated with Lp(a) [32]. The absence of a relationship between Lp(a) and PCSK9 can be explained by the highly genetic determination of Lp(a). It is also possible that the difference observed between adults and children is related to sex steroids or ethnicity.

Furthermore, we did not find any relationship between PCSK9 and age, gender, or BMI. A gender and age difference in PCSK9 levels was reported in the French-Canadian study [18]. The latter found that PCSK9 values were significantly higher in 9-year-old boys than in 13 and 16-year-old boys, whereas the inverse was true in girls. They also reported no significant relationship between PCSK9 levels and BMI in both boys and girls, which is similar to our findings [18]. On the opposite, higher BMI was associated with higher PCSK9 levels in an obese Sub-Saharan African adult population [33]. While in the present report no significant relationship was noted between PCSK9 and BMI, it is noteworthy that in our previously published results on the same cohort, BMI was significantly correlated with non-HDL-C and TG [23]. This might suggest that PCSK9 is more genetically determined compared to the other lipoproteins.

Finally, we looked at the relation between PCSK9 and pubertal status. We did not find any significant difference in PCSK9 levels according to menarchal status. Estradiol (E2) has been shown to regulate circulating PCSK9. In fact, in vitro studies found that E2 increases *LDLr* gene expression by 4 to 5-fold and downregulates the hepatic and plasma PCSK9 levels through the decrease in sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) mRNA levels, resulting in a decrease in both PCSK9 and LDL-C levels [34,35]. In premenopausal women, PCSK9 levels were found to be inversely associated with E2 levels, with the lowest values occurring during ovulation, when E2 levels are at their highest levels [36]. The absence of difference that we found in PCSK9 between pre- and post-menarche girls may be explained by the fact that E2 levels at the starting stages of puberty are not sufficiently high enough to induce a decrease in PCSK9 levels. In addition, E2 levels start to increase well before the onset of menarche leading to a wide variation of E2 levels around the timing of menarche. We also interestingly found in post-menarchal girls, a significant positive correlation between serum PCSK9 levels and TC, LDL-C, and non-HDL-C a finding not observed in premenarchal girls. This finding can be explained by the change in lipid profile with age as we previously reported in the same cohort [24]. In this

study, we found that 53.6% of school children have normalized their abnormal lipid profile after a 3-years follow-up. Therefore, stable levels of PCSK9 across time as opposed to the variability in the lipid profile could explain the different relationship between PCSK9 and lipid profile in pre- and post-menarchal girls. Similarly, in boys, we found no correlation between testosterone and serum PCSK9 levels. In another previous report, testosterone levels were also not associated with PCSK9 or LDL-C in healthy adult individuals [37].

The positive association we found between PCSK9 and TC, LDL-C, and non-HDL-C are important for the potential use of PCSK9 as a predictor of cardiovascular (CV) risk in children. Previous studies have found that elevated circulating PCSK9 levels in adults are predictors of CV events and are independently associated with arterial stiffness [38]. It was also speculated that PCSK9 can be used as a possible early marker of CV risk in healthy adults [29]. Extending these studies to the pediatric population would be also interesting since pediatric dyslipidemia leads to early atherosclerosis in autopsy studies [6]. Moreover, approximately one-half of children with abnormal lipoprotein values continue to have elevated lipid levels in adulthood [6,39,40]. The PCSK9 gene has been associated with inflammation in several studies as reviewed by Momtazi-Borojeni et al. Furthermore, the subendothelial accumulation of cholesterol caused by hypercholesterolemia leads to vascular inflammation [41]. This highlights the importance of identification and management of risk factors to slow down the progression towards atherosclerosis that begins early in childhood and in young adult life [6]. Further prospective studies are needed on a larger scale in different populations to confirm if PCSK9 levels provide additional information in predicting CVD beyond the recognized CV factors.

The current study has several limitations: first, the children's sampling was not performed in a fasting state. However, circulating PCSK9 seems to be poorly affected by a fasting state since in healthy adults, plasma PCSK9 concentrations vary minimally in response to a short-term high-fat diet [42]. Second, estradiol was not measured in girls to examine the relationship between PCSK9 and estradiol. Third, no data were collected on the food intake of the recruited children since it has been demonstrated that PCSK9 can be affected by diet [43]. Furthermore, the cross-sectional nature of our study precludes any causality link between PCSK9 and the other components of the lipid profile. Finally, the lack of a standardized PCSK9 assay could explain the discrepancies in plasma PCSK9 levels reported in different studies.

4. Materials and Methods

4.1. Population

The population included in this study is a subgroup of our initial cohort. In our previous cross-sectional reports, 969 school children aged 8 to 18 years were recruited from 10 different private and public Lebanese schools using a stratified random sampling [23,44]. The schools were selected in the Greater Beirut and Mount Lebanon regions, where most of the Lebanese population is concentrated. Recruitment was conducted between May 2013 and October 2014.

Exclusion criteria were: any acute or chronic medical condition (such as diabetes or hypothyroidism) or intake of drugs that can affect the lipid profile (contraceptive pills, isotretinoin, oral corticosteroids, atypical antipsychotics, or immunosuppressive therapies).

The same device was used to measure height and weight on the day of sampling. Body Mass Index (BMI) was calculated by dividing weight in kilograms by height in meters squared (kg/m^2). To account for age and sex differences, all BMI measurements were compared to age and sex-specific reference values from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) growth charts from 2000 to determine weight status [45]. This comparison was chosen because of the scarcity of reference values in Lebanon. BMI for sex and age below the 85th percentile was classified as normal, overweight was defined as

BMI for sex and age between the 85th and 95th percentile, and obesity was defined as BMI for sex and age over the 95th percentile [45]. The population was categorized into three age groups: 8–11 years, 12–14 years, and 15–18 years as performed in our previous publications [23,44].

Blood samples were collected in 2013 and 2014 from non-fasting children between 8 and 10 AM. Serum was then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until PCSK9 measurements in 2020. From the initial cohort, 288 children were excluded due to insufficient serum volume to perform PCSK9 measurement [23].

Based on the lipid thresholds established by the NHLBI [46], lipid values were defined as follows: (1) for TC: normal ($<4.4\text{ mmol/L}$), borderline ($4.4\text{--}5.2\text{ mmol/L}$), high ($\geq 5.2\text{ mmol/L}$), (2) for LDL-C: normal ($<2.8\text{ mmol/L}$), borderline ($2.8\text{--}3.4\text{ mmol/L}$), high ($\geq 3.4\text{ mmol/L}$), (3) for non-HDL-C: normal ($<3.1\text{ mmol/L}$), borderline ($3.1\text{--}3.8\text{ mmol/L}$), high ($\geq 3.8\text{ mmol/L}$), (4) for TG: normal ($<0.8\text{ mmol/L}$ for children ≤ 9 years and $<1\text{ mmol/L}$ for children >10 years), borderline ($0.8\text{--}1.1\text{ mmol/L}$ for children ≤ 9 years, $1\text{--}1.5\text{ mmol/L}$ for children >10 years) high ($>1.1\text{ mmol/L}$ for children ≤ 9 years and >1.5 for children >10 years). Based on epidemiological and Mendelian randomization studies, we defined the fifth group characterized by high Lp(a) ($\geq 75\text{ nmol/L}$) [47–49].

Informed consent was signed by all the parents' children. Subjects aged 18 years signed the consent form as they do not need the consent of their parents. Children who refused blood sampling were excluded from the study. The study was approved by the ethics committee of Hôtel-Dieu de France university hospital, Beirut, Lebanon (2013 CEHDF 518, 2018 CEHDF 1174).

4.2. Biological Parameters

4.2.1. Serum PCSK9 Assay

The PCSK9 measurements were performed using a commercial ELISA Kit (Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Duoset catalog no. DY3888, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and the Luminex Bio-Plex Pro assay technology as previously described [50]. This assay is based on the use of carboxy-coated Bio-Plex ProTM COOH beads (catalog no. MC10035-01, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) covalently coupled with a PCSK9 capture antibody using the Bio-Plex Kit Amine Coupling Kit (catalog no. 171-406001, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Next, the diluted samples were incubated with the coupled beads before the PCSK9 detection antibody was added. Then, streptavidin-phycoerythrin conjugate (Bio-Plex Streptavidin-PE catalog no.171304501, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was added to form the final detection complex. The intensity of the fluorescence signal was acquired using a Luminex-based reader (Bio-Plex 200 Systems, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [50].

4.2.2. Lipid Profile

The measurements of TC, HDL-C, and TG were performed on a Vitros 5.1 FS machine (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA) as previously described [23]. Non-HDL-C was calculated by subtracting HDL-C from the TC. LDL-C was calculated using the Friedewald formula where LDL-C, TC, and HDL-C are expressed in mmol/L ($\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/2.2)$).

4.2.3. Lipoprotein (a)

The Lp(a) measurement was performed using an immunoturbidimetric assay (Cobas Integra 400 plus system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) as previously described [44]. In this procedure, human Lp(a) agglutinates with latex particles coated with anti-Lp(a) antibodies. Turbidimetry at 659 nm is used to determine the precipitate. According to the manufacturer, the threshold value which indicates an increased risk is 75 nmol/L. The intra and inter-coefficient of variation is less than 4%.

4.2.4. Total Testosterone

Total testosterone levels were measured only in boys using the Immulite 2000 automate (Siemens, Berlin, Germany). The sensitivity of the method is 20 ng/mL and the coefficient of variation was < 10% for values > 150 ng/mL.

4.2.5. Statistical Analysis

The variables were analyzed using the GraphPad Prism version 9. Quantitative variables were not normally distributed using the Kolmogorov–Smirnov statistic to test for normality. Results for quantitative variables were expressed as median with its interquartile ranges (1st quartile and 3rd quartile). The Chi-square test and Mann–Whitney U test were used to perform univariate analysis. Spearman correlation was performed to measure the strength and direction of a linear relationship between PCSK9 and other quantitative variables. A Kruskal–Wallis test was used to compare the lipid parameters according to age and BMI groups. Two separate multiple linear regression analyses were performed in boys and girls with natural logarithm (Ln (PCSK9) as a continuous dependent variable and age, Ln(BMI), Ln(non-HDL-C), Ln(TG), Ln(Lp(a)) as independent variables. In the regression, TC, and LDL-C were not entered as independent variables because TC, LDL-C, and non-HDL-C are very strongly interdependent. Non-HDL-C was chosen as an independent variable because the sampling of children was performed in a non-fasting state and non-HDL-C has been recommended as a better measurement, especially among subjects with high TG levels. In addition, non-HDL-C is considered as good as or better than other atherogenic lipoproteins in predicting adult dyslipidemia and subclinical atherosclerosis [51].

5. Conclusions

We found a positive correlation between serum PCSK9 levels and TC, LDL-C, and non-HDL-C levels and higher PCSK9 levels among children with high TC, LDL-C, and non-HDL-C, while no relationship was observed between PCSK9 and TG, HDL-C or Lp(a). Age, gender, and BMI were also not found to be associated with PCSK9. Since high levels of PCSK9 play a significant role in the progression of atherosclerotic lesions, measuring PCSK9 in children, particularly those with high CV risk, could be useful to predict the risk of future CV events. To confirm this, further studies are needed to fully understand the genetic and metabolic factors that influence circulating PCSK9 levels in children.

Author Contributions: Funding acquisition: M.-H.G.-Y., M.A., C.B. and M.V.; Conception of the work: M.A., M.-H.G.-Y. and P.E.K.; Acquisition of data: Y.A., M.-H.G.-Y., C.A., Y.A.K., E.C. and P.E.K.; Analysis of data: Y.A., M.-H.G.-Y., E.N., S.E., M.A. and P.E.K.; Statistical analysis: Y.A., M.-H.G.-Y., Y.G.; Drafting the work: Y.A., M.-H.G.-Y., E.N., M.A.; Revising the work critically: All. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; and the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Program franco-libanais PHC-CEDRE (2018). This work was also supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the national project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007), and by Fondation-Leducq (FLQ # 13 CVD 03) through the Transatlantic Networks of Excellence in Cardiovascular Research program ("The function and regulation of PCSK9: a novel modulator of LDLR activity"). Yara Azar and Carine Ayoub are supported by grants from the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and the Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph of Beirut, Lebanon; Yara Azar is supported by a grant from an AMGEN funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hôtel Dieu de France university hospital, Beirut, Lebanon (CEHDF 2013 reference 546, CEHDF 2018 reference 1174).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the parents' children involved in the study. Subjects aged 18 years old signed the consent form as they do not need the consent of their parents.

Data Availability Statement: All the data have been included in article.

Acknowledgments: The authors would like to thank Racha Aaraj for her assistance and validation of the statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Libby, P.; Buring, J.E.; Badimon, L.; Hansson, G.K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M.S.; Tokgözoğlu, L.; Lewis, E.F. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5*, 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.
2. de Ferranti, S.D.; Steinberger, J.; Ameduri, R.; Baker, A.; Gooding, H.; Kelly, A.S.; Mietus-Snyder, M.; Mitsnefes, M.M.; Peterson, A.L.; St-Pierre, J.; et al. Cardiovascular Risk Reduction in High-Risk Pediatric Patients: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2019**, *139*, e603–e634. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000618>.
3. Coakley, J.C. Lipids in Children and Links to Adult Vascular Disease. *Clin. Biochem. Rev.* **2018**, *39*, 65–76.
4. Kwiterovich, P.O. Recognition and Management of Dyslipidemia in Children and Adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 4200–4209. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1270>.
5. Raitakari, O.T.; Juonala, M.; Kähönen, M.; Taittonen, L.; Laitinen, T.; Mäki-Torkko, N.; Järvisalo, M.J.; Uhari, M.; Jokinen, E.; Rönnemaa, T.; et al. Cardiovascular Risk Factors in Childhood and Carotid Artery Intima-Media Thickness in Adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* **2003**, *290*, 2277–2283. <https://doi.org/10.1001/jama.290.17.2277>.
6. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents; National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents: Summary Report. *Pediatrics* **2011**, *128* (Suppl. 5), S213–S256. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2107C>.
7. Miksenas, H.; Januzzi, J.L., Jr.; Natarajan, P. Lipoprotein(a) and Cardiovascular Diseases. *JAMA* **2021**, *326*, 352–353. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3632>.
8. Ellis, K.L.; Watts, G.F. Is Lipoprotein(a) Ready for Prime-Time Use in the Clinic? *Cardiol. Clin.* **2018**, *36*, 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2017.12.010>.
9. Abifadel, M.; Varret, M.; Rabès, J.-P.; Allard, D.; Ouguerram, K.; Devillers, M.; Cruaud, C.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Erlich, D.; et al. Mutations in PCSK9 Cause Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 154–156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>.
10. Abifadel, M.; Elbitar, S.; El Khoury, P.; Ghaleb, Y.; Chémaly, M.; Moussalli, M.-L.; Rabès, J.-P.; Varret, M.; Boileau, C. Living the PCSK9 Adventure: From the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs. *Curr. Atheroscler Rep.* **2014**, *16*, 439. <https://doi.org/10.1007/s11883-014-0439-8>.
11. Luquero, A.; Badimon, L.; Borrell-Pages, M. PCSK9 Functions in Atherosclerosis Are Not Limited to Plasmatic LDL-Cholesterol Regulation. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 639727. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.639727>.
12. Rosenson, R.S.; Hegele, R.A.; Fazio, S.; Cannon, C.P. The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.054>.
13. Ferri, N.; Ruscica, M.; Coggi, D.; Bonomi, A.; Amato, M.; Frigerio, B.; Sansaro, D.; Ravani, A.; Veglia, F.; Capra, N.; et al. Sex-Specific Predictors of PCSK9 Levels in a European Population: The IMPROVE Study. *Atherosclerosis* **2020**, *309*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.07.014>.
14. Li, S.; Zhang, Y.; Xu, R.-X.; Guo, Y.-L.; Zhu, C.-G.; Wu, N.-Q.; Qing, P.; Liu, G.; Dong, Q.; Li, J.-J. Proprotein Convertase Subtilisin-Kexin Type 9 as a Biomarker for the Severity of Coronary Artery Disease. *Ann. Med.* **2015**, *47*, 386–393. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1042908>.
15. Huijgen, R.; Fouchier, S.W.; Denoun, M.; Hutten, B.A.; Vissers, M.N.; Lambert, G.; Kastelein, J.J.P. Plasma Levels of PCSK9 and Phenotypic Variability in Familial Hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 979–983. <https://doi.org/10.1194/jlr.P023994>.
16. Alborn, W.E.; Cao, G.; Careskey, H.E.; Qian, Y.-W.; Subramaniam, D.R.; Davies, J.; Conner, E.M.; Konrad, R.J. Serum Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Is Correlated Directly with Serum LDL Cholesterol. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 1814–1819. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.091280>.
17. Lakoski, S.G.; Lagace, T.A.; Cohen, J.C.; Horton, J.D.; Hobbs, H.H. Genetic and Metabolic Determinants of Plasma PCSK9 Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 2537–2543. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0141>.
18. Baass, A.; Dubuc, G.; Tremblay, M.; Delvin, E.E.; O'Loughlin, J.; Levy, E.; Davignon, J.; Lambert, M. Plasma PCSK9 Is Associated with Age, Sex, and Multiple Metabolic Markers in a Population-Based Sample of Children and Adolescents. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1637–1645. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.126987>.
19. Georges, N.; Simon, A.; Naim, B.; Georges, N.; Georges, A.F.; Tanios, A. Universal Screening Program for Lipid Disorders in 2–10 Years Old Lebanese Children: A New Approach. *Int. J. Pediatr. Adolesc. Med.* **2019**, *6*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2019.05.003>.
20. Steiner, M.J.; Skinner, A.C.; Perrin, E.M. Fasting Might Not Be Necessary Before Lipid Screening: A Nationally Representative Cross-Sectional Study. *Pediatrics* **2011**, *128*, 463–470. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0844>.

21. Aydenian, H.; Fadel, M.A.; Baddoura, R. Epidemiological study of hyperlipemia in a Lebanese population. *Ann. Biol. Clin.* **1999**, *57*, 697–703.
22. Hirbli, K.; Barakat-el Khoury, W.; Abi-Saab, M.; Bitar, H.; Najem, R. Blood cholesterol profile of the Lebanese population. *Diabete Metab.* **1990**, *16*, 435–440.
23. Gannagé-Yared, M.-H.; Farah, V.; Chahine, E.; Balech, N.; Ibrahim, T.; Asmar, N.; Barakett-Hamadé, V.; Jambart, S. Distribution and Correlates of Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides in Lebanese School Children. *J. Clin. Lipidol.* **2016**, *10*, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.12.018>.
24. Saadé, C.; Sleilaty, G.; Gannagé-Yared, M.-H. Longitudinal Changes of Lipid Profile in the Lebanese Pediatric Population. *Lipids Health Dis.* **2019**, *18*, 48. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0991-x>.
25. Hopkins, P.N.; Toth, P.P.; Ballantyne, C.M.; Rader, D.J.; National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. Familial Hypercholesterolemias: Prevalence, Genetics, Diagnostics and Screening Recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* **2011**, *5*, S9–S17. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2011.03.452>.
26. Shapiro, M.D.; Tavori, H.; Fazio, S. PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 1420–1438. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311227>.
27. Tavori, H.; Fan, D.; Blakemore, J.L.; Yancey, P.G.; Ding, L.; Linton, M.F.; Fazio, S. Serum Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Cell Surface Low-Density Lipoprotein Receptor: Evidence for a Reciprocal Regulation. *Circulation* **2013**, *127*, 2403–2413. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001592>.
28. Raal, F.; Panz, V.; Immelman, A.; Pilcher, G. Elevated PCSK9 Levels in Untreated Patients with Heterozygous or Homozygous Familial Hypercholesterolemia and the Response to High-Dose Statin Therapy. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, *2*, e000028. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.000028>.
29. Ruscica, M.; Ferri, N.; Fogacci, F.; Rosticci, M.; Botta, M.; Marchiano, S.; Magni, P.; D’Addato, S.; Giovannini, M.; Borghi, C.; et al. Circulating Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Arterial Stiffness in a Large Population Sample: Data From the Brisighella Heart Study. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e005764. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005764>.
30. Leander, K.; Mälarstig, A.; Van’t Hof, F.M.; Hyde, C.; Hellénus, M.-L.; Troutt, J.S.; Konrad, R.J.; Öhrvik, J.; Hamsten, A.; de Faire, U. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation* **2016**, *133*, 1230–1239. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018531>.
31. Lambert, G.; Ancellin, N.; Charlton, F.; Comas, D.; Pilot, J.; Keech, A.; Patel, S.; Sullivan, D.R.; Cohn, J.S.; Rye, K.-A.; et al. Plasma PCSK9 Concentrations Correlate with LDL and Total Cholesterol in Diabetic Patients and Are Decreased by Fenofibrate Treatment. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1038–1045. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.099747>.
32. Tavori, H.; Christian, D.; Minnier, J.; Plubell, D.; Shapiro, M.D.; Yeang, C.; Giunzioni, I.; Croyal, M.; Duell, P.B.; Lambert, G.; et al. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ. Res.* **2016**, *119*, 29–35. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308811>.
33. Mba, C.M.; Mbacham, W.; Sobngwi, E.; Mbanya, J.C. Is PCSK9 Associated with Plasma Lipid Levels in a Sub-Saharan African Population of Patients with Obesity and Type 2 Diabetes? *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *12*, 2791–2797. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S234243>.
34. Persson, L.; Gälman, C.; Angelin, B.; Rudling, M. Importance of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 in the Hormonal and Dietary Regulation of Rat Liver Low-Density Lipoprotein Receptors. *Endocrinology* **2009**, *150*, 1140–1146. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1281>.
35. Persson, L.; Henriksson, P.; Westerlund, E.; Hovatta, O.; Angelin, B.; Rudling, M. Endogenous Estrogens Lower Plasma PCSK9 and LDL Cholesterol but Not Lp(a) or Bile Acid Synthesis in Women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 810–814. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242461>.
36. Ghosh, M.; Gälman, C.; Rudling, M.; Angelin, B. Influence of Physiological Changes in Endogenous Estrogen on Circulating PCSK9 and LDL Cholesterol. *J. Lipid. Res.* **2015**, *56*, 463–469. <https://doi.org/10.1194/jlr.M055780>.
37. Ooi, T.C.; Raymond, A.; Cousins, M.; Favreau, C.; Taljaard, M.; Gavin, C.; Jolly, E.E.; Malone, S.; Eapen, L.; Chretien, M.; et al. Relationship between Testosterone, Estradiol and Circulating PCSK9: Cross-Sectional and Interventional Studies in Humans. *Clinica. Chimica. Acta.* **2015**, *446*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.03.036>.
38. Vlachopoulos, C.; Terentes-Printzios, D.; Georgiopoulos, G.; Skoumas, I.; Koutagiari, I.; Ioakeimidis, N.; Stefanadis, C.; Tousoulis, D. Prediction of Cardiovascular Events with Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Atherosclerosis* **2016**, *252*, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.922>.
39. Haney, E.M.; Huffman, L.H.; Bougatsos, C.; Freeman, M.; Steiner, R.D.; Nelson, H.D. Screening and Treatment for Lipid Disorders in Children and Adolescents: Systematic Evidence Review for the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics* **2007**, *120*, e189–e214. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1801>.
40. Webber, L.S.; Srinivasan, S.R.; Wattigney, W.A.; Berenson, G.S. Tracking of Serum Lipids and Lipoproteins from Childhood to Adulthood. The Bogalusa Heart Study. *Am. J. Epidemiol.* **1991**, *133*, 884–899. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115968>.
41. Momtazi-Borojeni, A.A.; Sabouri-Rad, S.; Gotto, A.M.; Pirro, M.; Banach, M.; Awan, Z.; Barreto, G.E.; Sahebkar, A. PCSK9 and Inflammation: A Review of Experimental and Clinical Evidence. *Eur. Heart. J. Cardiovasc. Pharmacother.* **2019**, *5*, 237–245. <https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvz022>.
42. Cariou, B.; Langhi, C.; Le Bras, M.; Bortolotti, M.; Lê, K.-A.; Theytaz, F.; Le May, C.; Guyomarc’h-Delasalle, B.; Zair, Y.; Kreis, R.; et al. Plasma PCSK9 Concentrations during an Oral Fat Load and after Short Term High-Fat, High-Fat High-Protein and High-Fructose Diets. *Nutr. Metab. (Lond.)* **2013**, *10*, 4. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-4>.

43. Scicchitano, P.; Cameli, M.; Maiello, M.; Modesti, P.A.; Muiesan, M.L.; Novo, S.; Palmiero, P.; Saba, P.S.; Pedrinelli, R.; Ciccone, M.M. Nutraceuticals and Dyslipidaemia: Beyond the Common Therapeutics. *J. Funct. Foods* **2014**, *6*, 11–32. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.006>.
44. Gannagé-Yared, M.-H.; Lahoud, C.; Younes, N.; Chedid, R.; Sleilaty, G. Prevalence and Status of Lipoprotein (a) among Lebanese School Children. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20620. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77689-5>.
45. Kuczmarski, R.J.; Ogden, C.L.; Guo, S.S.; Grummer-Strawn, L.M.; Flegal, K.M.; Mei, Z.; Wei, R.; Curtin, L.R.; Roche, A.F.; Johnson, C.L. 2000 CDC Growth Charts for the United States: Methods and Development. *Vital Health Stat.* **2002**, *11*, 1–190.
46. Eilers, L.; Zachariah, J.P. Lipid Screening in Youth. In *Endotext*; Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., et al., Eds.; MDText.com, Inc.: South Dartmouth, MA, USA, 2000.
47. Emerging Risk Factors Collaboration; Erqou, S.; Kaptoge, S.; Perry, P.L.; Di Angelantonio, E.; Thompson, A.; White, I.R.; Marcovina, S.M.; Collins, R.; Thompson, S.G.; et al. Lipoprotein(a) Concentration and the Risk of Coronary Heart Disease, Stroke, and Nonvascular Mortality. *JAMA* **2009**, *302*, 412–423. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1063>.
48. Clarke, R.; Peden, J.F.; Hopewell, J.C.; Kyriakou, T.; Goel, A.; Heath, S.C.; Parish, S.; Barlera, S.; Franzosi, M.G.; Rust, S.; et al. Genetic Variants Associated with Lp(a) Lipoprotein Level and Coronary Disease. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2518–2528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902604>.
49. Verbeek, R.; Boekholdt, S.M.; Stoekenbroek, R.M.; Hovingh, G.K.; Witztum, J.L.; Wareham, N.J.; Sandhu, M.S.; Khaw, K.-T.; Tsimikas, S. Population and Assay Thresholds for the Predictive Value of Lipoprotein (a) for Coronary Artery Disease: The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J. Lipid. Res.* **2016**, *57*, 697–705. <https://doi.org/10.1194/jlr.P066258>.
50. El Khoury, P.; Roussel, R.; Fumeron, F.; Abou-Khalil, Y.; Velho, G.; Mohammedi, K.; Jacob, M.-P.; Steg, P.G.; Potier, L.; Ghaleb, Y.; et al. Plasma Proprotein-Convertase-Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) and Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2018**, *20*, 943–953. <https://doi.org/10.1111/dom.13181>.
51. Frontini, M.G.; Srinivasan, S.R.; Xu, J.; Tang, R.; Bond, M.G.; Berenson, G.S. Usefulness of Childhood Non-High Density Lipoprotein Cholesterol Levels versus Other Lipoprotein Measures in Predicting Adult Subclinical Atherosclerosis: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* **2008**, *121*, 924–929. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1472>.

3. Discussion

Dans cette étude, j'ai dosé les taux plasmatiques de PCSK9 chez 681 écoliers libanais recrutés par des endocrinologues de l'hôpital universitaire Hôtel Dieu de France à Beyrouth, Liban. Il s'agit des sujets âgés de 8 à 18 ans (347 garçons et 334 filles). Le recrutement a été effectué dans 10 écoles situées dans les régions du Grand Beyrouth et du Mont-Liban.

J'ai étudié l'association entre les taux plasmatiques de PCSK9 et les données démographiques, les paramètres lipidiques ainsi qu'avec la ménarche chez les filles et les taux de testostérone chez les garçons de cette cohorte pédiatrique.

Les taux plasmatiques de PCSK9 ont été mesurés par la technologie luminex™ qui se base sur le principe de la cytométrie en flux et qui utilise des microbilles fluorescentes. Ces microbilles sont couplées à leur surface à des anticorps permettant ainsi la détection de la protéine d'intérêt qui est, dans ce cas, PCSK9. Cette méthode de dosage a été initialement mise au point dans l'équipe pour le dosage de PCSK9 dans le sérum de deux cohortes de patients diabétiques de type 2 (El Khoury et al., 2018).

Les résultats ont montré que les concentrations plasmatiques de PCSK9 varient entre 13,48 à 692,9 ng/mL et sont significativement corrélées avec les taux de CT, de LDL-C et de non-HDL-C ($p < 0,0001$) chez les garçons et les filles. En revanche, l'association n'était pas significative avec les taux de TG et de la Lp(a) ($p > 0,05$).

De plus, j'ai identifié des sous-groupes avec des taux élevés de CT (N = 53, 7,78%), LDL-C (N = 87, 12,78%) et non-HDL-C (N = 72, 10,57%). Ces sous-groupes se caractérisaient par des taux de PCSK9 qui étaient de 31,80%, 26% et 18,7% plus élevés respectivement par rapport aux sous-groupes normaux ou limites. Cette différence significative n'a pas été retrouvée dans le sous-groupe avec des taux de TG élevés (N = 198, 29,07%).

Il n'y avait pas de différence significative entre les taux de PCSK9 avant et après la ménarche chez les filles. Cependant, les taux de PCSK9 étaient corrélés avec les taux de CT, LDL-C et non-HDL-C après la ménarche. Concernant les garçons, aucune corrélation significative n'a été retrouvée avec les taux de testostérone.

Ces résultats montrent que les taux plasmatiques de PCSK9 corrélaient avec les taux de CT, LDL-C, non-HDL-C. Cette corrélation peut s'expliquer par le fait que PCSK9 induit la dégradation des LDLr via leur internalisation au niveau hépatique. Ainsi, la PCSK9, les LDLr et les particules LDL sont tous régulés réciproquement. Les taux élevés de PCSK9 dans les sous-groupes dyslipidémiques suggèrent que PCSK9 pourrait être utilisée comme un marqueur chez les enfants afin de prédire le risque d'événements cardiovasculaires dans le futur, surtout

qu'environ la moitié des enfants présentant des valeurs anormales de lipoprotéines continuent à présenter un bilan lipidique anormal à l'âge adulte (Haney et al., 2007; Webber et al., 1991). Les taux plasmatiques de PCSK9 étaient également corrélés avec les taux de CT, LDL-C et non-HDL-C chez les filles en post ménarche. Cette corrélation semble être dépendante de la variation des taux lipidiques et des changements hormonaux avec l'âge. Persson et al. ont montré que les oestrogènes sont un modulateur de PCSK9, elles réduisent les taux de LDL-C en régulant négativement PCSK9 au niveau hépatique et plasmatique (Persson et al., 2012).

Des études supplémentaires sont ainsi nécessaires afin d'identifier les facteurs génétiques et métaboliques qui régulent la variation endogène de PCSK9 afin de valider son utilisation comme marqueur dans la prédiction des MCV surtout chez les enfants qui présentent des bilans lipidiques anormaux et ont une prédisposition familiale.

Chapitre 3 : Rôle de PCSK9 dans le développement de l'athérosclérose

1. Introduction

La majorité des recherches menées ces dernières années se sont concentrées sur l'impact de l'inhibition de PCSK9, d'importants axes de recherche ont émergé pour caractériser la physiologie unique de PCSK9 en relation avec le métabolisme du cholestérol et l'athérosclérose.

Il a été montré que PCSK9 est détectable dans les plaques d'athérosclérose humaines (Ferri et al., 2012) et que les taux sériques de PCSK9 corrélaient avec la survenue de MCV indépendamment des facteurs de risque traditionnels. PCSK9 augmente à la fois les niveaux d'expression génétique et protéique de SRA, CD36, LOX-1 et LRP-1 ce qui entraîne une augmentation de l'internalisation des LDL modifiées (Canel et al., 2013; Ding, Liu, et al., 2018). Ces récepteurs scavengers sont exprimés par les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv), un acteur majeur dans la progression de l'athérosclérose (Lacolley et al., 2012). De plus, une étude *in vitro* et dans des modèles animaux a montré que PCSK9 joue un rôle direct dans la formation néo-intimale suite à une lésion vasculaire alors que son absence préserve le phénotype contractile des CMLv (Ferri et al., 2016).

Tous ces résultats montrent un rôle pro-athérogène de PCSK9 d'où l'objectif de cette étude qui est d'évaluer la relation entre PCSK9 et l'athérosclérose à travers la description de la localisation et de l'abondance de PCSK9 aux différents stades de l'athérosclérose chez l'homme et la régulation par PCSK9 des fonctions d'endocytose du cholestérol par CMLv humaines *in vitro* à travers un éventuel rôle des récepteurs scavengers.

2. Article 3

Role of PCSK9 in human atherosclerotic lesion development through interaction with scavenger receptors in vascular smooth muscle cells

Yara Azar, Yara Abou-Khalil, Youmna Ghaleb, Sandy Elbitar, Marie-Nathalie Lebel, Catherine Deschildre, Sébastien Dupont, Isabelle Guillas, Wilfried Le Goff, Catherine Boileau, Marianne AbiFadel, Jean-Baptiste Michel, Mathilde Varret, Petra El Khoury

En cours de relecture par les co-auteurs

Role of PCSK9 in human atherosclerotic lesion development through interaction with scavenger receptors in vascular smooth muscle cells

Yara Azar^{1,2*}, Yara Abou-Khalil^{1,2*}, Youmna Ghaleb^{1,2}, Sandy Elbitar^{1,2}, Marie-Nathalie Lebel¹, Catherine Deschildre¹, Sébastien Dupont¹, Isabelle Guillas^{3,4}, Wilfried Le Goff^{3,4}, Catherine Boileau^{1,5}, Marianne AbiFadel^{1,2}, Jean-Baptiste Michel¹, Mathilde Varret^{1*}, Petra El Khoury^{1,2*}

- 1 Paris Cité University and Sorbonne Paris Nord University, INSERM UMRS 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Paris, France;
- 2 Saint-Joseph University of Beirut, Faculty of Pharmacy, Pôle Technologies-Santé (PTS), Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Beirut, Lebanon;
- 3 National Institute for Health and Medical Research (INSERM) UMR_S 1166, Faculty of Medicine Pitié-Salpêtrière, Paris, France;
- 4 Sorbonne University, Faculty of Medicine Pitié-Salpêtrière, Paris, France;
- 5 Genetic Department, AP-HP, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France.

*These authors contributed equally to the work

Abstract

Background and Aims

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is the third gene involved in familial hypercholesterolemia, a major cause of atherosclerosis. Its role in regulating plasma cholesterol levels has been widely reported, and anti-PCSK9 drugs have been developed. Nevertheless, direct interactions between PCSK9 and atherosclerotic pathology are not fully elucidated.

We aim at demonstrating that PCSK9 promotes atherosclerosis through vascular smooth muscle cells (vSMC) involved in foam cell formation, atherosclerosis initiation, and progression.

Methods

Healthy and atheromatous human aortas were collected, tissues were fixed, conditioned media were obtained after 24 hours of incubation in a serum-free culture medium, and primary vSMC were isolated from media of healthy aortas.

Results

We showed that PCSK9, although present in foam cells from fatty streaks, fibroatheromas, and absent in healthy tissues, is not synthesized in the arterial wall. PCSK9 levels were significantly higher in conditioned media from atheromatous aortas than from healthy aortas. Thus, PCSK9 penetrates through the arterial wall by outward convection from the circulation. We showed that primary vSMC uptake PCSK9 when added to the media. Moreover, the low density lipoprotein receptor related protein 1 gene was highly expressed in the arterial wall of healthy and affected aortas, and blocking its function using the receptor-associated protein significantly decreased the uptake of PCSK9 by vSMC. Also, PCSK9 and the lectin-type oxidized LDL receptor 1 colocalized in vSMC and PCSK9 uptake was reduced by oxidized low density lipoproteins.

Conclusions

We characterized the presence of PCSK9 in human atherosclerotic tissues and demonstrated that PCSK9 present in the aortic wall is not synthesized locally. Our results suggest that PCSK9 is being internalized and metabolized through scavenger receptors expressed by vSMC.

Keywords: atherosclerosis, PCSK9, vascular smooth muscle cells, scavenger receptors, LRP-1, LOX-1, CD36

1. Introduction

Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (*PCSK9*) is the third gene implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia (ADH) (1). It is mainly synthesized by the liver from where it is secreted after autocatalytic cleavage of its inactive proenzyme form (75 kDa) (2). The 14 kDa cleaved prodomain is still linked to the catalytic domain and blocks the PCSK9 active site, which may account for the lack of other PCSK9 proteolytic activity (2). PCSK9 promotes the degradation of the low-density lipoprotein receptor (LDLr) at the hepatic level by redirecting it to lysosomes, making it a key regulator of cholesterol homeostasis (2). A potential pharmacological option for the treatment of hypercholesterolemia and associated cardiovascular disorders is PCSK9 inhibitors which were studied in large clinical programs. Currently, two fully human monoclonal antibodies, alirocumab and evolocumab are approved. Based on clinical studies, PCSK9-inhibiting drugs can reduce by 60% the plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and the risk of major cardiovascular events (3). While the liver is the major source of PCSK9, additional organs and cells such as the kidney, small intestine, pancreas, central nervous system, vascular smooth muscle cells (vSMC), and endothelial cells also synthesized PCSK9, thus suggesting that PCSK9 has extrahepatic functions (4,5). An increased body of evidence suggests that PCSK9 plays a role in the development of atherosclerosis beyond its impacts on lipids *via* the LDLr. In vitro study showed that PCSK9 positively affects vSMC proliferation, migration, and differentiation in response to vascular injury, indicating that PCSK9 plays a pro-atherogenic role in the arterial wall (8). PCSK9 is detectable within atherosclerotic plaques, in regions occupied by α -SMA positive cells (such as vSMC), and reduces the expression of LDLr on the surface of macrophages through a paracrine action (5). In the inflammatory environment, PCSK9 is increased and induces the expression of scavenger receptors such as the scavenger receptor class A (SR-A), the cluster of differentiation 36 (CD36), and the lectin-type oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) known to be implicated in the uptake of oxidized LDL (oxLDL) and thus in the progression of atherosclerosis (6). Another study showed that PCSK9 regulates the expression of the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) (7). These data show that PCSK9 is potentially relevant for the pathophysiology of human atherosclerosis progression through its actions on vSMC and scavenger receptors. Furthermore, clinical studies showed that circulating PCSK9 levels were associated with a higher risk of

cardiovascular diseases even after adjustments for established cardiovascular risk factors (9,10). This indicates that PCSK9 inhibition might have additional therapeutic effects, beyond lowering LDL cholesterol levels, that are not yet fully understood. Thus, this work aims to decipher the potential role of PCSK9 in human atherosclerotic pathology. We describe the localization and the abundance of PCSK9 at the different stages of atherosclerosis in human arterial tissues, particularly in early stages, fatty streaks (FS) and fibrolipidic lesions (FLL), and we explore how PCSK9 regulates the cholesterol endocytosis in human vSMC *in vitro*.

2. Materiel and methods

2.1 Sample collection

Human atherosclerotic tissues (aorta, coronary arteries) at different stages of the disease (healthy arteries, fatty streaks, fibro-atheroma, calcified lesions) are explanted from deceased organ donors or before transplantation. All these human materials are collected in ethical good practices, including regular evaluation and declaration to the French Minister of research (Bio-banque Cardiovasculaire Bichat: BRIF BB-0033-00029 Réseau BIOBANQUE / BBMRI-EU / CODECOH 2018-3141) advice of ethical committees, authorization of the French BioMedicine Agency for healthy arterial tissues (PFS09-007, PSF17-002). Tissues preparations always include a fixation in 4% paraformaldehyde for histology. Each tissue is dissected, and when it is possible the intima is separated from the media. One part of the tissue is incubated in a serum-free RPMI culture medium for 24h at 37°C, 1g tissue in 6 mL RPMI. This method allows us to collect tissue secretomes, called conditioned media. The other part of the tissue is directly frozen. Samples of frozen tissues are cryopulverized and used for RNA and protein extraction. RNA is extracted using the RNeasy Mini Kit from Qiagen according to manufacturer's instructions. Tissues were lysed and proteins were extracted in RIPA buffer (50 mM of Tris, pH 7.5, 150 mM of NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) supplemented with a Halt™ protease inhibitor cocktail from (Sigma Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, France). Total proteins were measured using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) according to manufacturer's instructions.

2.2 Human Vascular Smooth Muscle Cell (vSMC) Culture

To obtain primary cultures of aortic vSMC, the media from aortas was separated from the adventitia before being cut into small pieces and incubated for 3 hours in a mixture of 0.3% collagenase (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) and 0.1% elastase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA). Cells were cultured in SMC growth medium supplemented with smooth muscle cell growth supplement kit classic (Pellobiotech, Planegg, Germany) and antibiotics. Passages 4 to 5 were used for experiments.

2.3 Histological Analyses on human aortic samples and vSMC primary cultures.

The aortic specimens were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned serially at 4 μ m sections. All sections were qualified through canonical histochemistry (Hematoxylin-eosin and Masson Trichrome staining), as a healthy artery, artery with fatty streaks, fibrolipidic lesion, intraplaque hemorrhages, micro- or macro-calcifications. Immunohistochemistry and immunofluorescence assays were performed on sections following antigen retrieval by heating in EDTA buffer, pH 9. Samples were permeabilized with 0.05% Triton X100 in PBS. Non-specific binding was blocked using Protein block Serum-free solution (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies and at room temperature for one hour with the secondary antibodies. All Antibodies are diluted in T-TBS 1% BSA and listed below (results section 2.5).

Oil red O staining was used for staining neutral lipids in Formalin-fixed vSMC primary cultures seeded in 8-well Nunk® Lab-Tek® Chamber Slide™ Permanox® Slide sterile (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France).

2.4 Immunohistochemistry

For PCSK9 staining, the primary antibody was a mouse monoclonal anti-PCSK9 IgM [ab84041] (Abcam, Paris, France), used at 1:100 dilution. The secondary antibody was a polyclonal goat anti-Mouse Immunoglobulin coupled to peroxidase [P0447] (Dako by Agilent Technologies, Les Ulis, France), used at 1:400 dilution. Positive staining was revealed using diaminobenzidine substrate (DAB) [K3468] (Dako by Agilent Technologies, Les Ulis, France),

and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. For negative control, the primary antibody was replaced by species and isotype-matched irrelevant IgM, Negative Control Mouse IgM [X 0942] (Dako by Agilent Technologies, Les Ulis, France), used at a similar concentration.

2.5 Immunofluorescence

For immunofluorescent staining of PCSK9, APOB, LOX-1, CD36, LRP-1 and α -SMA we used respectively the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-PCSK9 IgM [ab84041] (Abcam, Paris, France), at a 1:100 dilution; goat polyclonal anti-apolipoprotein B IgG [600-101-111] (Rockland by tebu-bio SAS, Le Perray-en-Yvelines, France), at a 1:200 dilution; goat polyclonal anti-LOX-1 IgG [AF1798] (R&D systems by Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France), at 1:100 dilution; and rabbit polyclonal anti-CD36 IgG [NB400-144] (Novus Biologicals by Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France), at a 1:50 dilution; rabbit monoclonal Anti-LRP-1 IgG [ab92544], at 1:200 dilution (Abcam, Paris, France), and rabbit polyclonal anti- α -SMA IgG [ab5694], at 1:100 dilution (Abcam, Paris, France). The Secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK), were respectively: Rhodamine RedTM-X-conjugated AffiniPure Fab Fragment donkey polyclonal anti-mouse IgM μ [715-296-020] at 1:400 dilution, Alexa Fluor[®] 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment rabbit polyclonal anti-goat IgG Fc Fragment specific [305-546-008] at 1:400, and Alexa Fluor[®] 488-conjugated AffiniPure Fab Fragment goat polyclonal anti-rabbit IgG (H+L) [111-547-003] at 1:400 dilution. Hoechst 33342 solution (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) was added to the secondary antibodies mix to stain the nuclei at a 1:1000. Slides were mounted with IMM ibidi Mounting Medium (ibidi by CliniSciences, Nanterre, France). For negative controls, primary antibodies were replaced by species and isotype-matched irrelevant immunoglobulins, used at similar concentrations. They were respectively mouse IgM [B11/7] [ab91545] (Abcam, Paris, France), ChromoPure goat IgG [005-000-003] (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK), and rabbit IgG [EPR25A] [ab172730] (Abcam, Paris, France). All Antibodies are diluted in T-TBS 1% BSA.

2.6 ELISA

PCSK9 levels in tissue-conditioned media were measured using the DuoSet Human PCSK9 ELISA kit [DY3888] (R&D Systems byBio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France) and the Luminex Bio-Plex Pro assay technology as previously described (11). Carboxy-coated Bio-Plex Pro™ COOH beads (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were covalently coupled with the PCSK9 capture antibody (DuoSet Human PCSK9 ELISA Kit) using the Bio-Plex Amine Coupling Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to manufacturer's instructions. The efficiency of the PCSK9-capture antibody coupling on the beads was validated by flow cytometry, using an AlexaFluor 488 goat-anti-rat secondary antibody. The assay procedure was as follows: beads were distributed into Bio-Plex Pro flat-bottom 96-well plates [171025001] (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) at a density of 3000 beads per well. Undiluted conditioned media were incubated with the beads for 2 hours. A series of washes were then performed using the Bio-Plex Pro II wash station (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to remove unbound protein. The biotinylated sheep antihuman PCSK9 detection antibody (DuoSet Human PCSK9 ELISA Kit) was then added for 1 hour to detect bead-bound PCSK9 molecules. Streptavidin-phycoerythrin conjugate [171304501] (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was then added for 30 minutes to form the final detection complex. The intensity of the fluorescence signal was acquired using a Luminex-based reader (Bio-Plex 200 Systems). A series of known concentrations of recombinant standard human PCSK9 protein (DuoSet Human PCSK9 ELISA Kit) ranging from 1.95 to 2000 pg/mL was used to build the standard curve. Data were analyzed using the Bio-Plex Manager software using a Five-Parameter Logistic standard curve. All measurements were carried out in triplicates. Internal control was used on each plate (n = 5) to assess reproducibility (inter-assay coefficient of variation 15%). The intra assay coefficient of variation of our immunoassay was 11%, calculated from the measurement of PCSK9 in solutions with the same concentration, repeated 5 times.

2.7 Immunoblotting

Proteins from vSMC were purified with RIPA Lysis Buffer (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) supplemented with a cocktail of proteases inhibitors [Halt™] (ThermoFisher Scientific,

Les Ulis, France). Centrifugation was used to clarify the lysates (14,000g, 15min at 4°C). The protein concentration of each sample was determined using a BCA protein assay (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Proteins were loaded onto Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, 4-20%, 10-well comb, 50µl, Long shelf-life precast gels for use with tris/glycine buffers [456-1094] (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), followed by transfer to Amersham™ Protran™ PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) blotting membranes (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). Membranes were incubated in blocking buffer (T-TBS 5% nonfat milk) for 1 hour and immunoblotted with the primary antibody of PCSK9, LRP-1, and β-actin respectively: polyclonal sheep IgG anti-human PCSK9 [AF3888] (R&D Systems by Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France) at 1:200 dilution, monoclonal rabbit IgG anti-human LRP-1 [ab92544] (abcam, Paris, France) at 1:100 dilution, monoclonal mouse Peroxidase conjugated anti-human β-actin [A3854] (Sigma Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 1:25,000 dilution, in T-TBS 5% BSA at room temperature for 1 hour. Membranes were then probed with the secondary antibody for PCSK9 and LRP-1, respectively: polyclonal donkey HRP conjugated anti-sheep IgG [HAF016] (R&D Systems by Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France) at 1:10000 dilution, polyclonal goat HRP conjugated anti-rabbit IgG [P0448] (Dako by Agilent Technologies, Les Ulis, France) at 1:2,000 dilution, in T-TBS 5% BSA for 1 hour at room temperature. Western blots were visualized by the iBright 1500 Imaging System from Invitrogen by ThermoFischer Scientific using the Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Human full-length recombinant PCSK9 D374Y expressed in HEK 293 cells [CR-R2310, CY-R2311] (Circulex by CliniSciences, Nanterre, France), at 1:400 dilution in serum-free RPMI culture medium, was used as a positive control. β-actin was used as a standard for quantification. Quantification was realized using the iBright Analysis software.

2.8 Real-time qPCR

Total cellular RNA was extracted from cryopulverized human arterial tissues using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. After purification, RNAs were eluted in 40 µL of RNase-free water and RNA concentrations were estimated by measuring absorbance at 260 nm, using Nanodrop 2000/2000c system (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Total cellular RNA was extracted from cultured

vSMC cells using TRIzol™ reagent (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) according to manufacturer's protocol.

Reverse transcription was performed using the miScript II Reverse Transcriptase kit from Invitrogen by Thermo Scientific, according to manufacturer's recommendations. RT-qPCR was performed using ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems™, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to manufacturer's instructions. Absolute Blue QPCR Mix SYBR® Green ROX (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) and specific primers were used to quantify *PCSK9*, *LOX-1*, *CD36*, *LRP-1*, and *LDLR* expression. The experiment was performed in triplicate. Results were then normalized with the expression of the housekeeping gene *HPRT* by the Δ CT method. PCSK9 expression was also quantified in HuH7 cells since *PCSK9* is known to be highly expressed in these cells.

2.9 Production of oxidized LDL

Human low-density lipoprotein purification and oxidation were performed as previously described (12).

2.10 vSMC treatment

Primary vSMC were seeded in six-well plates. When confluence is reached, cells were made quiescent in an RPMI serum-free medium (Thermoscientific) for 24 hours. Cells were then treated with oxidized LDL at 20ug/ml – 100 ug/ml alone, recombinant PCSK9 from [CR-R2310, CY-R2311] (Circulex by CliniSciences, Nanterre, France) at 0.2 ug/ml alone, or with both for 24 hours before mRNA and protein extraction. Cells were also treated with receptor-associated protein (RAP) (Molecular Innovation by tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France) at 50 µg/ml which was added for 2 hours at 37°C before adding the recombinant PCSK9 for 24 hours to evaluate the internalization of PCSK9 via the LRP-1 receptor. The Control vSMC are kept in RPMI serum-free medium throughout the experiment.

2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7. One-way ANOVA test or Kruskal-Wallis test were used to evaluate the differences among different groups. Two-way

ANOVA was used to evaluate the interaction between gene expressions and PCSK9 measurements in different localizations of the human aorta and different stages of atheroma. Mann Whitney was used for nonparametric analyses.

3. Results

3.1 Description of human atheroma progression

Macroscopic aspects of different stages of atheroma in the human aorta and coronary arteries are presented in **Figure 1**. A healthy endoluminal aorta is characterized by a smooth regular surface. As described previously (13), fatty streaks are identified as yellow bulges (lipids) on the luminal surface of the arterial wall. Fibrolipidic lesions are formed by endoluminal fibrocellular proliferation of vSMC (fibrocellular cap), covering the lipid core, and separating it from the circulating blood. The lipid core could be less or more developed, usually acellular, associated or not with cholesterol crystal formation, with intraplaque hemorrhages, and with or without calcifications. Histologic description of different stages of human atheroma following trichrome coloration is presented in **Figure S1**.

3.2 PCSK9 is localized in foam cells of aortas with atheroma

As shown in **Figures 2**, we observed specific PCSK9 staining in aortas that contain fatty streaks when compared to the control isotype. PCSK9 was also localized in more advanced atheroma lesions containing a fibrolipidic lesion. By contrast, PCSK9 staining in healthy aortas was very low (**Figures 2A**). At higher resolution, we can discern that PCSK9 is mainly localized in the intracellular compartment and particularly in foam cells of aortas with atheroma (**Figure 2C, 2D**). These results were confirmed by co-staining of PCSK9 and α -SMA, a marker of vSMCs, that showed that PCSK9 is located within vSMC in the intimal proliferation of atheromatous aortas with fatty streaks and fibrolipidic lesions. However, PCSK9 was not detected in vSMCs of healthy aortas (**Figure 3**).

3.3 PCSK9 levels are higher in the intima than in the media or the healthy aorta

PCSK9 levels were significantly different among healthy aortas, intima, and media of fatty streak lesions as well as intima and media of fibrolipidic lesions (One-way Anova, $p=0.001$) (**Figure 4A**). Interestingly, PCSK9 levels in conditioned media from fatty streaks (FS) and fibrolipidic lesions (FLL) were significantly higher in the intima than in the media from the same lesion ($2,306 \pm 651$ vs 740 ± 254 pg/g of tissue, $p=0.044$ for FS, and $2,306 \pm 375$ vs $1,113 \pm 181$ pg/g of tissue, $p=0.007$ for FLL), or than in healthy aorta ($2,306 \pm 651$ vs 695 ± 117 pg/g of tissue, $p=0.02$ for FS, and $2,306 \pm 375$ vs 695 ± 117 , $p = 0.001$ for FLL) (**Figure 4A**). These results were confirmed by immunoblot analysis of PCSK9 in conditioned media (**Figure S2**).

3.4 Low PCSK9 expression in either healthy aortas, fatty streaks, or fibrolipidic lesions

As PCSK9 is present in aortas with fatty streaks and fibrolipidic lesions we aimed to assess whether the detected PCSK9 is synthesized *in situ* by the cells of the aortic wall. We evaluated the mRNA expression of *PCSK9* in aortic lysates. Interestingly, *PCSK9* expression was very low in healthy aortas when compared to liver cells and undetectable (mean Ct>34) in aortas with fatty streaks or fibrolipidic lesions (**Figure 4B**). Moreover, in conditioned media from fatty streaks or fibrolipidic lesions the bands observed on the PCSK9 immunoblot correspond to the mature form (60 kDa) and the furin-cleaved form (50KDa) of PCSK9, but not the native form (75 kDa) (**Figure S2**). These results suggest that PCSK9 is not synthesized in the arterial wall at all stages of atheroma. However, we do not rule out the fact that PCSK9 mRNA might be degraded with sample treatment. Therefore, *in vitro* studies on vSMC are essential to confirm these observations.

3.5 PCSK9 does not colocalize with apoB in the arterial wall

To gain an insight into the mechanisms by which PCSK9 penetrates the aortic wall, we hypothesized that PCSK9, associated with LDL particles through interaction with apoB (14), is transported in the aortic wall by pressure-driven transmural convection. Thus, we investigated its co-localization with apoB, and we showed that apoB is present and abundant in the sub-

endothelial space of the aortas in the early stages of atheroma and is mainly extracellular, whereas PCSK9 is localized at the intracellular level, in the intimal proliferation space of the aorta (**Figure S3**). In advanced more complex lesions with hemorrhage, PCSK9 was abundant in vSMC within the intimal proliferation (**Figures 5B and 5C**), and it is weakly detected in the acellular lipid core of aortas with fibrolipidic lesions (**Figure 5A and 5B**). Thus, our data suggest that in the arterial wall PCSK9 co-localizes weakly with apoB.

3.6 PCSK9 colocalizes with LOX-1 but not with CD36 in the arterial wall

We then explored whether PCSK9 interacts with the scavenger receptors LOX-1 and CD36 within the arterial wall, particularly in vSMC. First, we showed that both *LOX-1* and *CD36* gene expression were significantly higher in the intima of aortas with atheroma compared to the media of the same lesion and to healthy aortas (**Figures 6A and 6B**). Two-way Anova analysis showed that intimal expression of both *LOX-1* and *CD36* were significantly higher than medial expression ($p=0.0009$ and 0.0028 respectively) whatever the stages of atheroma (FS & FLL) or the localization (NS). These results were confirmed by immunofluorescent staining of LOX-1 and CD36 (**Figures 6C and 6D**). Both LOX-1 and CD36 were not detected in healthy aortas (**Figure 6C.1 and 6D.1**). However, they were highly detected in the cells of the intimal proliferation in human aortas with an advanced atherosclerotic lesion (**Figure 6C.2 and 6D.2**). The co-staining of LOX-1 (green) and PCSK9 (red) showed that the two proteins colocalized (yellow) in vSMC of the intimal proliferation suggesting an interaction between PCSK9 and LOX-1 in vSMC during atherosclerosis development (**Figures 6C.2 and 6C.3**). Although CD36 and PCSK9 were both detected in intima vSMC of aortas with atheroma, they do not seem to colocalize which suggests that the two proteins do not directly interact.

3.7 LRP-1 is present in healthy and atheromatous aortas

We evaluated *LRP-1* gene expression in tissue lysates from healthy aortas and atheromatous ones at different stages, and showed that *LRP-1* is expressed in healthy as well as in atheromatous aortas, without a significant difference between both types and between intima and media of the same lesion ($p>0.05$) (**Figure 7A**). We also showed that LRP-1 is present in the intimal proliferation of atheromatous aortas (**Figure 7B**).

3.8 PCSK9 uptake by primary vSMC is reduced by oxidized LDL

The uptake of oxidized LDL (oxLDL) by primary vSMC was confirmed by the Oil Red-O staining that showed that vSMC contains lipid droplets stained in red, 24 hours after the treatment with oxLDL (**Figure 8A**). PCSK9 was not detected in control vSMC (n=6) and vSMC treated with only oxidized LDLs (n=6) (**Figure 8B**). However, PCSK9 was detected in the lysate of vSMC treated with either human PCSK9 only or both human PCSK9 and oxLDL. Interestingly, the amount of PCSK9 detected in the lysate of cells treated with both PCSK9 and oxLDLs was significantly lower than the amount detected in the lysate of cells treated with only PCSK9 ($p<0.05$). These data suggest that PCSK9 is not synthesized by human vSMC but can be endocytosed from the extracellular medium, and that PCSK9 endocytosis is reduced in presence of oxLDL.

3.9 LRP-1 is more expressed compared to LOX-1 and CD36 in vSMC

The *LOX-1*, *CD36*, *LDLR*, and *LRP-1* gene expression in vSMCs treated with oxidized oxLDL alone, PCSK9 alone, or both were evaluated. The results showed that *LRP1* is more expressed in all conditions compared to *LOX-1* and *CD36* ($p<0.0001$) (**Figure 9A**). Also, it was found that LRP-1 protein expression was present in vSMCs (**Figure 9B**).

3.10 Receptor-associated protein (RAP) decreases PCSK9 endocytosis by vSMC

We hypothesized that LRP-1, which is more expressed than the other scavenger receptors and the LDLr, may play a significant role in PCSK9 endocytosis by vSMCs. We, therefore, blocked LRP-1 using RAP, an LRP-1 antagonist that prevents ligands from binding to it (15). The results showed that in the presence of RAP, PCSK9 uptake by vSMC was significantly decreased (**Figure 10**).

4. Discussion

The expression of PCSK9 and its interactions with scavenger receptors in human atherosclerotic lesions and primary vSMC were examined in the current study. We have shown that PCSK9 is present in human atheromatous aortas. PCSK9 was mainly located at the intracellular level of vSMC. However, tissues staining and *PCSK9* gene expression suggested

that PCSK9 is not synthesized in the aortic wall but enters the endothelium wall from the circulation. It has been previously shown that the outward convection of LDL particles through the artery wall is the first step of atheroma in humans, followed by intimal retention of lipids in the intima through an apoB /vSMC glycosaminoglycans interaction (16). In this context, our results suggest that PCSK9, like LDL particles, enters the artery wall by outward convection from the circulation. We have showed that apoB is mostly present in the extracellular sub endothelial/intimal region and does not colocalize with PCSK9. However, given that Sun et al. showed that PCSK9 binds to apoB (14), we cannot rule out the possibility that PCSK9 and apoB initially enter the arterial wall together before splitting to proceed in separate pathways.

Most importantly, we observed that PCSK9 is strongly detectable in the intimal proliferative region of the aorta and is present at a higher level in the intima than the media in atheromatous aortas. It's important to note that PCSK9 is localized both inside foam cells as well as in the extracellular region of the intima. It has been established that the formation of fatty streaks, the initial stage of atheroma, is caused by cholesterol retention in the intima. The proliferation of intimal vSMC and their uptake of LDL cholesterol via their scavenger receptors, cause them to become foam cells which are a key component of fatty streaks (17).

In this context, we propose that foam vSMC located in the intimal region of the aorta is internalizing and catabolizing PCSK9, through their scavenger receptors. Our data showed that both LOX-1 and CD36 were upregulated in atherosclerotic plaques compared to healthy aortas. Interestingly, we observed that PCSK9 and LOX-1 colocalized in vSMC of intimal proliferation, suggesting that PCSK9 and LOX-1 interact via protein-protein interactions in human aortic tissues. Indeed, Ding et al. demonstrated that increased levels of PCSK9 potentially induce the production of scavenger receptors (mostly LOX-1) and oxLDL uptake in macrophages in an inflammatory environment, contributing to the atherogenesis process (6). We treated primary vSMCs with TNF- α , a pro-inflammatory factor, to better mimic the inflammatory environment associated with atherosclerosis (18), and observed a slight increase of *LOX-1* gene expression that didn't attend the significance level (data not shown). Therefore, additional studies on vSMCs are essential to better elucidate the potential effect of PCSK9 on *LOX-1* gene and LOX-1 cell-surface expressions. In fact, vSMCs are a major cell implicated in all stages of atherosclerosis for which content and function in plaques have both been underestimated (9). Our results on primary vSMC showed that they uptake LDL-

cholesterol and do not produce PCSK9 under normal conditions even after a stimulation with oxLDL. It's critical to bring attention to the heterogeneous results concerning PCSK9 expression in primary vSMC (5,19). Although primary cultures are more representative of physiological mechanisms, they are less homogeneous than cell lines, and occasionally their properties may depend on the culture setting, which can make reproducibility challenging. Nevertheless, when added to the culture medium, PCSK9 was detected in vSMCs lysate suggesting that PCSK9 was internalized by the cells. It is interesting to note that when oxLDL were added to the cell culture medium, there was a significant decrease in the amount of PCSK9 detected in vSMCs lysates. Two theories can be considered. PCSK9 and oxLDL particles could competitively bind and be internalized by the same surface receptor, or the oxLDL uptake could activate catabolic pathways for PCSK9 and increase its degradation. More research is required to identify the underlying mechanism. While studying the expression of scavenger receptors by vSMCs, we observed that *LRP-1* was highly expressed, 50-fold more than *LOX-1*, *CD36*, and *LDLR*, in both human healthy and atheromatous aortas. LRP-1 is a member of the low-density lipoprotein (LDL) receptor family. It is a multifunctional membrane receptor harboring both endocytosis and cell signaling functions (20). LRP-1 binds a range of ligands with different biological properties including proteinases, proteinase-inhibitor complexes, and lipoproteins (21,22). We, therefore, hypothesized that it could be the key receptor involved in the vSMC PCSK9 uptake. To explore this theory, we blocked LRP-1 using the 39KDa receptor-associated protein (RAP) which is an endoplasmic reticulum-associated chaperone that binds to LRP and other LDL receptor superfamily members with high affinity and blocks ligands from interacting with these receptors (22). The results showed a significant decrease in the vSMC PCSK9 uptake, suggesting that LRP-1, which is structurally similar to the LDL receptor and more strongly expressed in vSMC, could be one of the major routes for the vSMC PCSK9 uptake. Additional studies are needed to confirm this observation, especially since RAP is not specific to LRP-1. Moreover, an investigation of an eventual interaction or crosstalk between PCSK9 and LRP-1 in primary vSMC would be highly important to better understand the molecular mechanisms behind atherosclerosis development.

In conclusion, we revealed the presence of PCSK9 in human aortas at different stages of atherosclerosis and we believed that PCSK9 penetrates through the arterial wall by convection from the circulation in both fatty streak and fibrolipidic lesions. This observation of PCSK9

within the arterial wall and its interaction with scavenger receptors, notably LRP-1, will contribute to a better understanding of the underlying pathological mechanisms. Once the PCSK9 impact on foam vSMC formation will be proved, new indications for PCSK9 inhibitors could be evaluated to prevent vSMC PCSK9 uptake and, consequently, atherosclerosis development.

Acknowledgments

We thank Dr. Samira Bennadda from the Photonic Imaging Platform IMA'CRI at the research center for inflammation (CRI) in Paris for her help in confocal microscopy.

Sources of Funding

This work is supported by grants from the AMGEN competitive grant Program (PCSK9013), the Fédération Française de Cardiologie (FFC-VARRET-Dotation 2021), and INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

Yara Azar is supported by grants from AMGEN funding (PCSK9013). Yara Azar and Yara Abou-Khalil are supported by grants from Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon; Yara Abou-Khalil is supported by a grant from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Technologie (France) and a grant from Nouvelle Société Francophone de l'Athérosclérose (France). Youmna Ghaleb is supported by a grant from Lefoulon-Delalande Foundation and The International Atherosclerosis Society (IAS).

Disclosures

None

References

1. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):154–6.
2. El Khoury P, Elbitar S, Ghaleb Y, Khalil YA, Varret M, Boileau C, et al. PCSK9 Mutations in Familial Hypercholesterolemia: from a Groundbreaking Discovery to Anti-PCSK9 Therapies. *Curr Atheroscler Rep.* 2017 Oct 17;19(12):49.
3. Sabatine MS. PCSK9 inhibitors: clinical evidence and implementation. *Nat Rev Cardiol.* 2019 Mar;16(3):155–65.
4. Stoekenbroek RM, Lambert G, Cariou B, Hovingh GK. Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Dec;15(1):52–62.
5. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, Mezzetti A, Pacia S, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis.* 2012 Feb;220(2):381–6.
6. Ding Z, Liu S, Wang X, Theus S, Deng X, Fan Y, et al. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovasc Res.* 2018 Jul 1;114(8):1145–53.
7. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1). *PLOS ONE.* 2013 May 13;8(5):e64145.
8. Ferri N, Marchianò S, Tibolla G, Baetta R, Dhyani A, Ruscica M, et al. PCSK9 knock-out mice are protected from neointimal formation in response to perivascular carotid collar placement. *Atherosclerosis.* 2016 Oct;253:214–24.
9. Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2019 Dec;16(12):727–44.
10. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 2012 Jul 15;95(2):194–204.
11. El Khoury P, Roussel R, Fumeron F, Abou-Khalil Y, Velho G, Mohammedi K, et al. Plasma proprotein-convertase-subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2018 Apr;20(4):943–53.
12. Galle J, Wanner C. Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1998;108:119–30.
13. Michel J-B, Ho-Tin-Noé B. Another story of Human Atherosclerosis. *Ann Vasc Med Res.* 2017;4(5):1069.

14. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Jul;32(7):1585–95.
15. Boukais K, Borges LF, Venisse L, Touat Z, François D, Arocas V, et al. Clearance of plasmin-PN-1 complexes by vascular smooth muscle cells in human aneurysm of the ascending aorta. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2018 Feb;32:15–25.
16. Caro CG. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Feb;29(2):158–61.
17. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014 Apr 15;129(15):1551–9.
18. Ding Z, Pothineni NVK, Goel A, Lüscher TF, Mehta JL. PCSK9 and inflammation: role of shear stress, pro-inflammatory cytokines, and LOX-1. *Cardiovasc Res.* 2020 Apr 1;116(5):908–15.
19. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, Fan Y, Shahanawaz J, et al. Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovasc Res.* 2015 Sep 1;107(4):556–67.
20. Emonard H, Théret L, Bennisroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol (Paris).* 2014 Apr;62(2):84–90.
21. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RGW, Herz J. LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science.* 2003 Apr 11;300(5617):329–32.
22. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, et al. Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP): EVIDENCE FOR INTEGRATED CO-RECEPTOR FUNCTION BETWEEN LRP AND THE PDGF*. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15499–506.

Legends

Figure 1: Macroscopic aspect of different stage of atheroma in human aorta. (A) healthy aorta, **(B)** fatty streaks and **(C)** fibrolipidic lesion.

Figure 2: Immunohistochemistry staining of PCSK9 in the human aorta on fixed deparaffinized sections from different stages of atheroma: **(A)** healthy aorta (N=3), **(C)** fatty streak (N=5), and **(D)** fibrolipidic lesion (N=3). Positive staining is revealed in brown using diaminobenzidine substrate (DAB), and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. The results were compared to isotype control **(B)**.

Figure 3: Immunofluorescence co-staining of PCSK9 (Red), α -smooth muscle actin (green), and nuclei (blue) in human healthy aorta and intimal proliferation from fatty streak and fibrolipidic lesion. α -SMA: α -smooth muscle actin; FS: fatty streak; FLL: Fibrolipidic lesion.

Figure 4: PCSK9 levels in vascular tissues (mRNA) and PCSK9 levels in conditioned media obtained from the human aorta (Intima and media separately) at different stages of atheroma (HA: healthy aorta, FS: fatty streak; FLL: Fibrolipidic lesion). Results are expressed in Mean value \pm standard deviation ($\mu\text{g/g}$ of the aorta), **(A)** PCSK9 levels in conditioned media obtained from HA (n=19), FS intima (n=19) FS media (n=16), FLL intima (n=23) and FLL media (n=22). **(B)** *PCSK9* mRNA expression in human aortic tissues from HA (n=14), aortas with atheroma (FS and FLL) (n=27), and in cultured human hepatic cell line HuH7. Results are expressed as the relative mRNA expression of *PCSK9* to *HPRT* using the mean quantity method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$.

Figure 5: Immunofluorescence co-staining of PCSK9 (Red), apoB (Green), and nuclei (blue) in the human aorta on fixed deparaffinized sections from a human aorta with a fibrolipidic lesion **(A)**. Isotype control **(D)**.

Figure 6: *LOX-1* (A) and *CD36* (B) mRNA expression in vascular tissues in human aorta (Intima and media separately) at different stages of atheroma (HA: healthy aorta, FS: fatty streak; FLL: Fibrolipidic lesion). Results are expressed as the relative mRNA expression of *LOX-1/CD36* to

HPRT using the Δ CT method. **(C) Immunofluorescence co-staining of LOX-1 (Green), PCSK9 (Red), and nuclei (Blue) in (C.1) healthy human aorta, (C.2 and C.3) aorta with a fibrolipidic lesion; (C.4) Isotype control. (D) Immunofluorescence co-staining of CD36 (Green) (C), PCSK9 (Red), and nuclei (Blue) in (D.1) healthy human aorta, (D.2 and D.3) aorta with a fibrolipidic lesion; (D.4) Isotype control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.**

Figure 7: (A) *LRP-1* mRNA expression in vascular tissues in human aorta (Intima and media separately) at different stages of atheroma (HA: healthy aorta, FS: fatty streak; FLL: Fibrolipidic lesion). Results are expressed as the relative mRNA expression of *LRP-1* to *HPRT* using the Δ CT method **(B) Immunofluorescence staining of LRP-1 (green) in an aorta with a fatty streak lesion.**

Figure 8: (A) Oil Red O staining of vSMC treated, or not, with oxidized LDL. Oil Red O stain is used to identify neutral lipids and fatty acids in tissues. Lipid droplets are stained in red. **(B) Immunoblot of PCSK9 for control and treated smooth muscle cells lysates (n=5).** SMC: Smooth muscle cell; oxLDL: oxidized LDL. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 9: (A) *LRP-1*, *LOX-1*, *CD36*, and *LDLR* of mRNA expression in vSMCs treated with oxidized LDL (oxLDL), PCSK9, or both. Results are expressed as the relative mRNA expression to *HPRT* using the Δ CT method. **(B) Immunoblot of LRP-1 for control and treated smooth muscle cells lysates (n=6).** SMC: Smooth muscle cell; oxLDL: oxidized LDL.

Figure 10: Immunoblot of PCSK9 in vSMC treated with and without PCSK9 and RAP (n=5). SMC: Smooth muscle cell; RAP: receptor-associated protein.

Figure 1



Figure 2

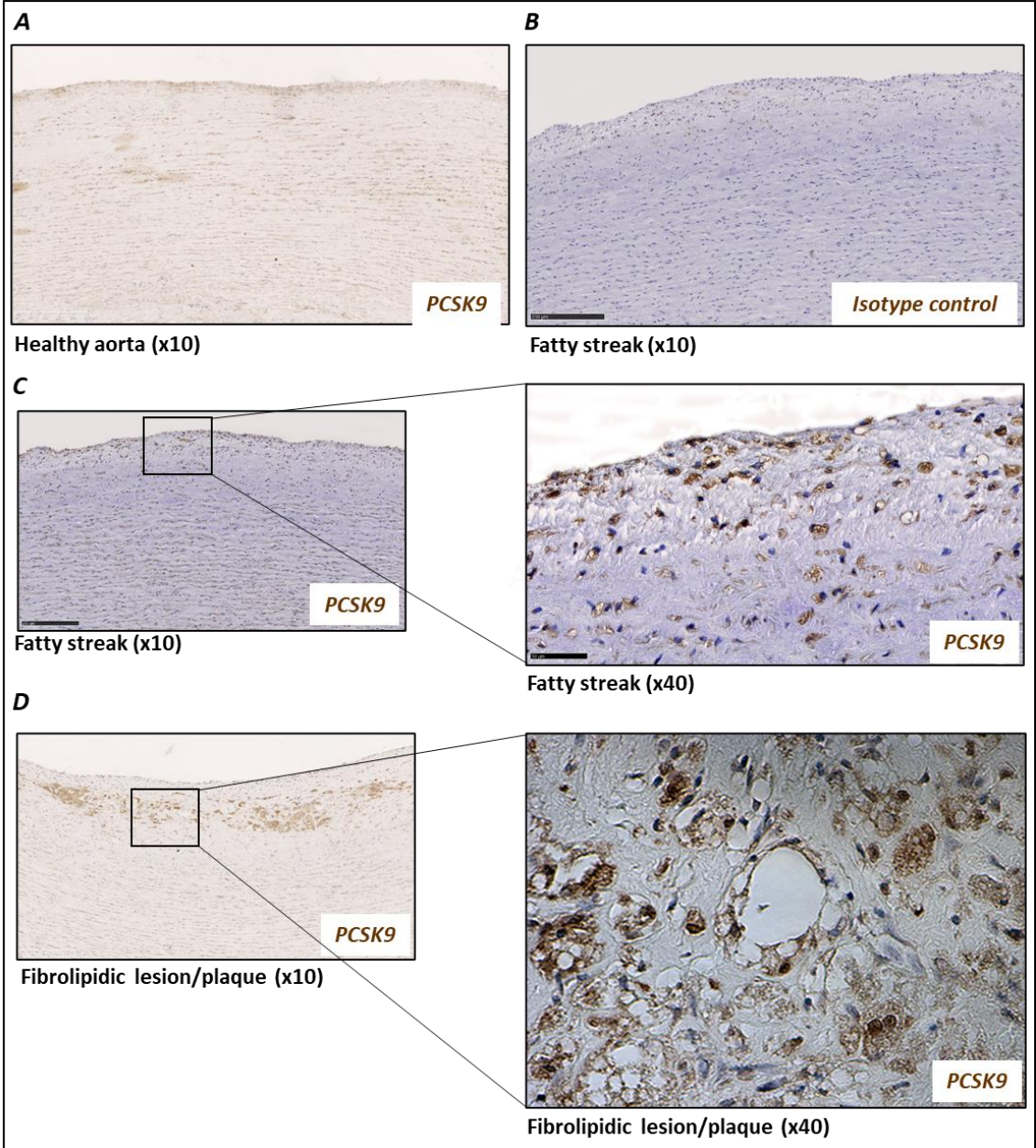


Figure 3

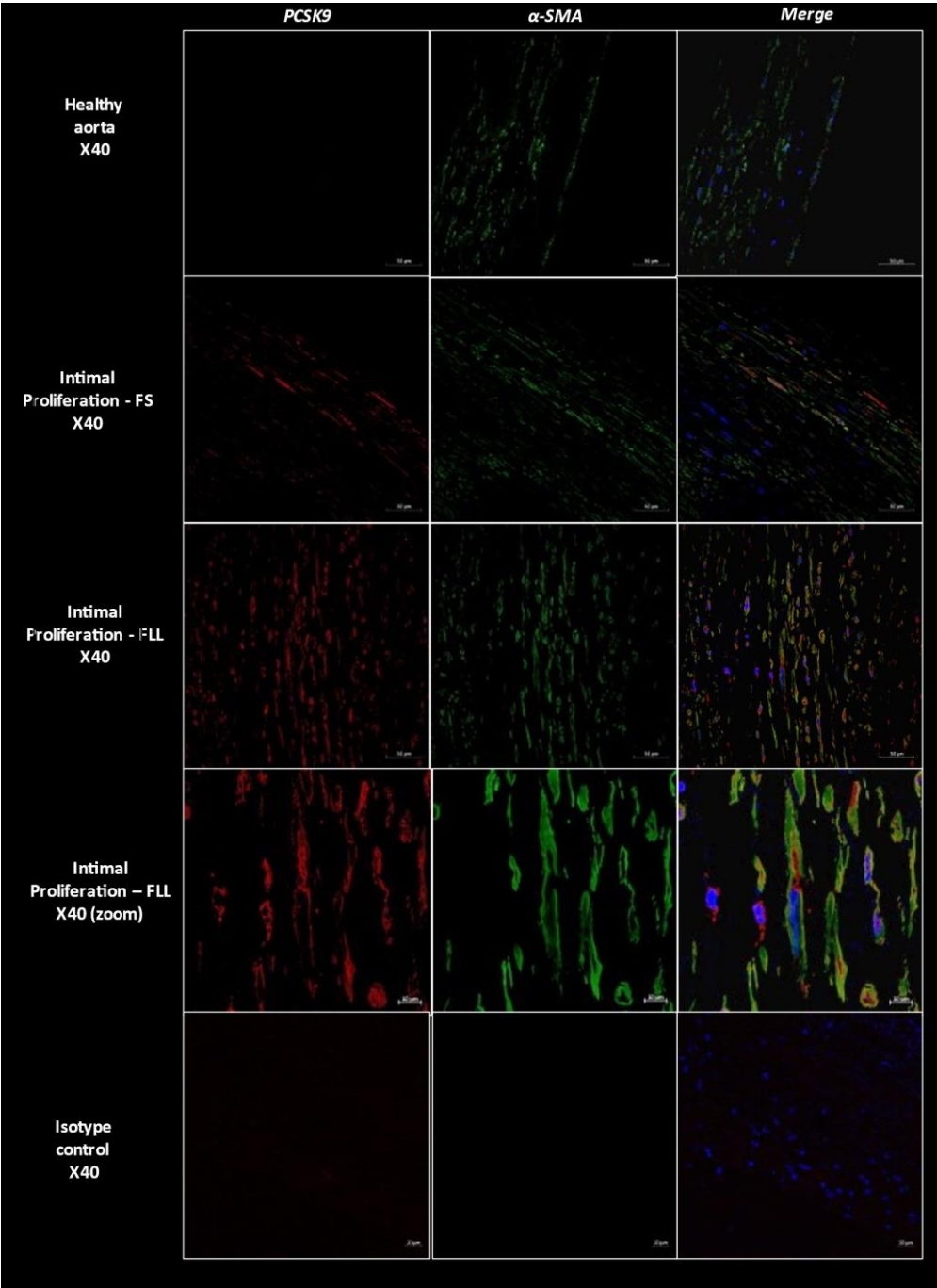


Figure 4

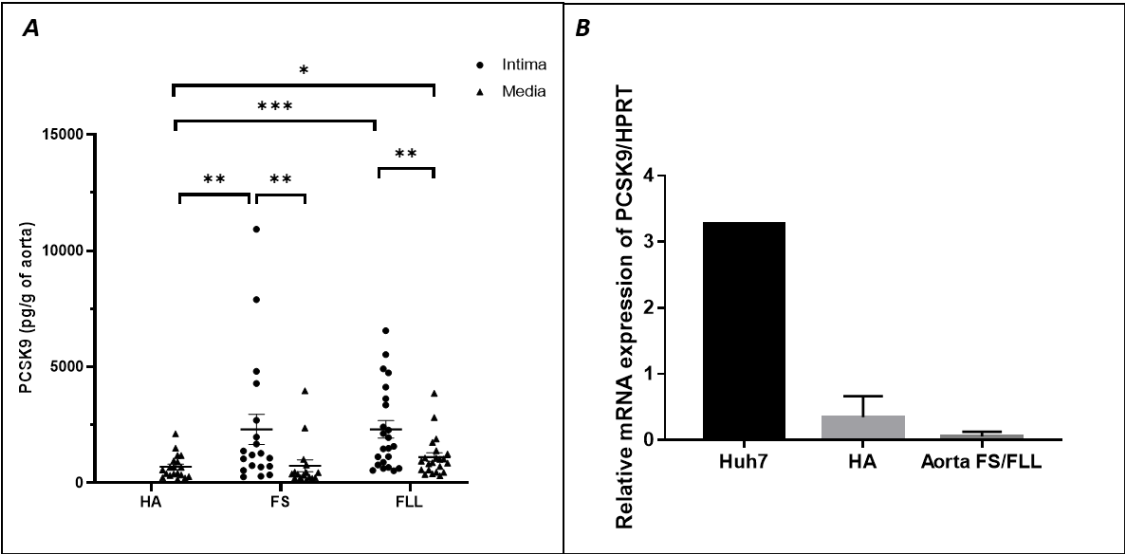


Figure 5

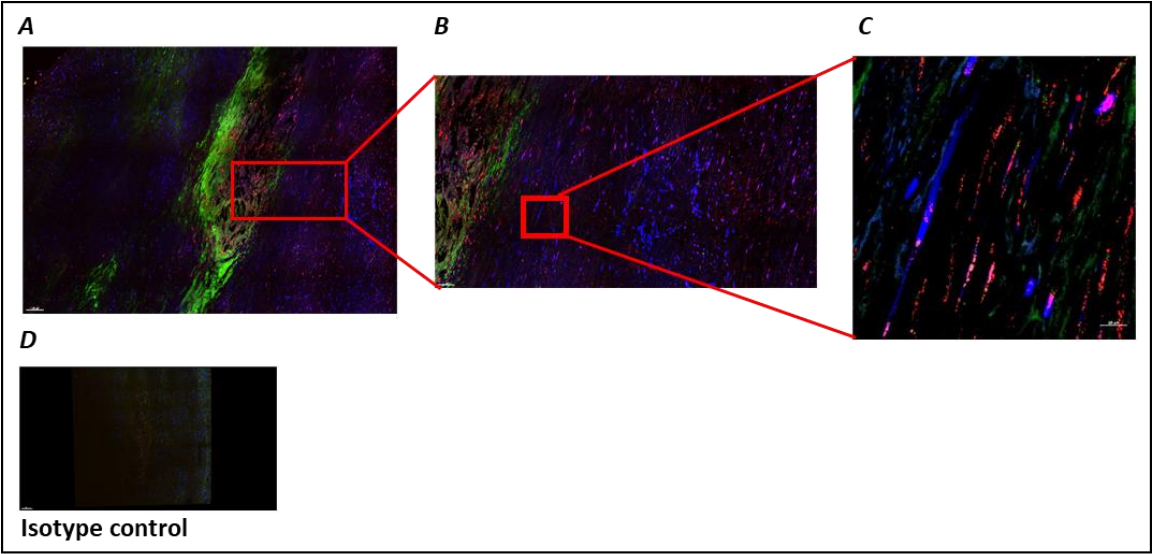


Figure 6

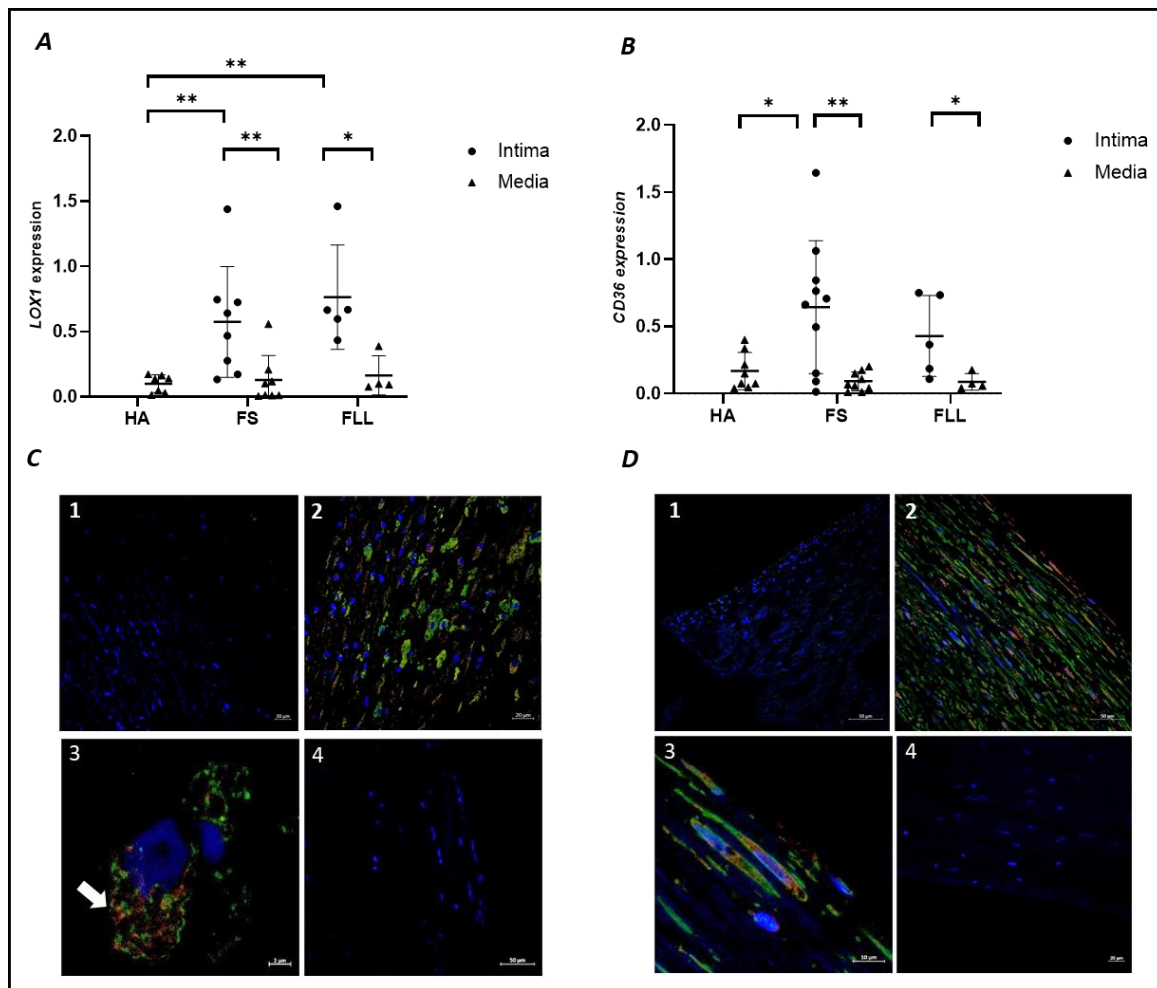


Figure 7

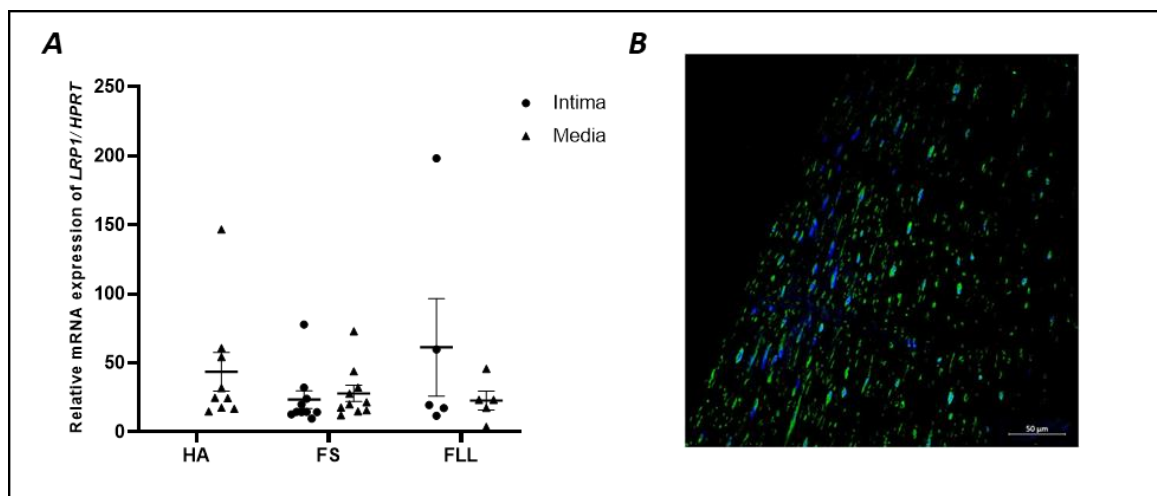


Figure 8

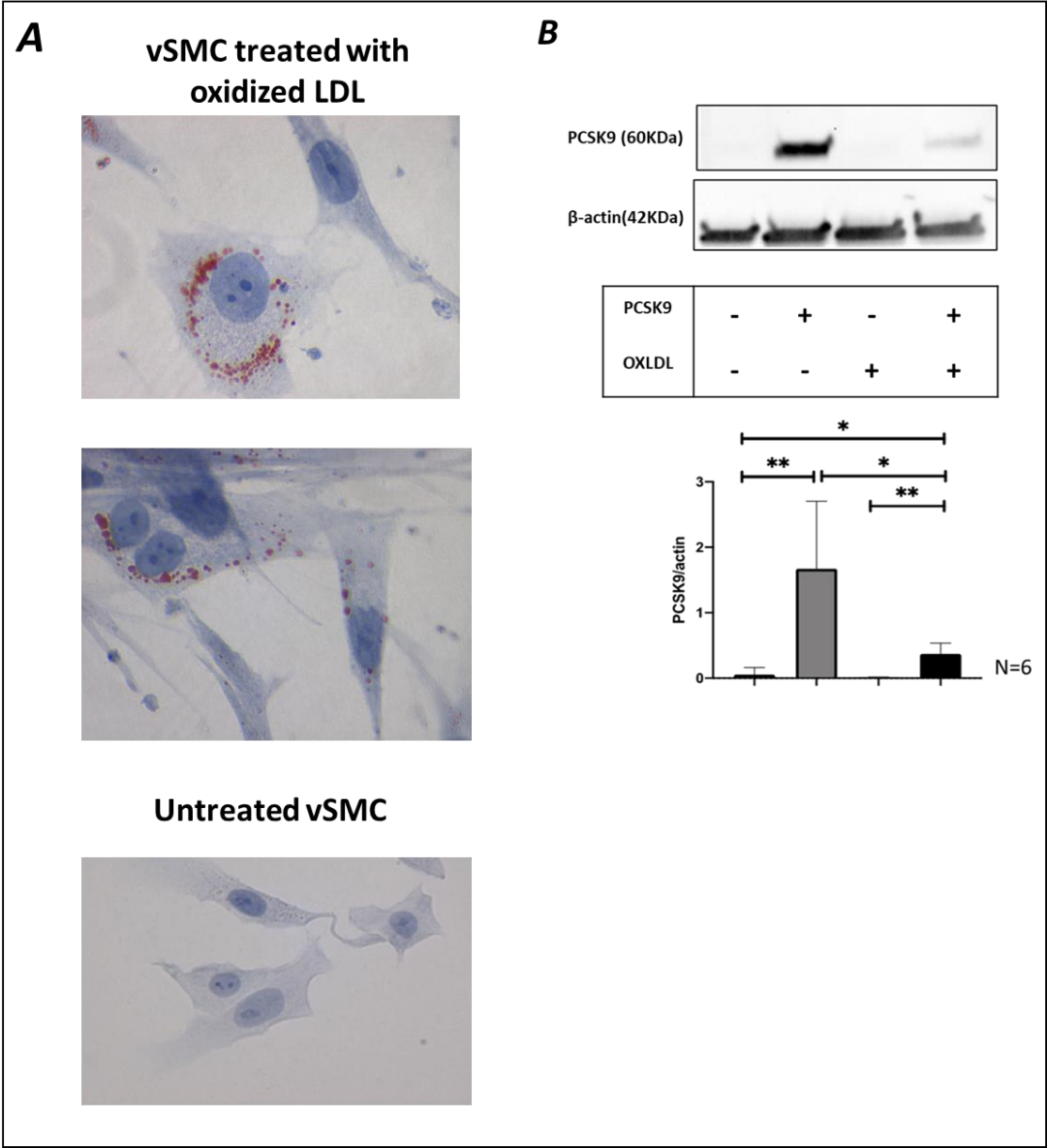


Figure 9

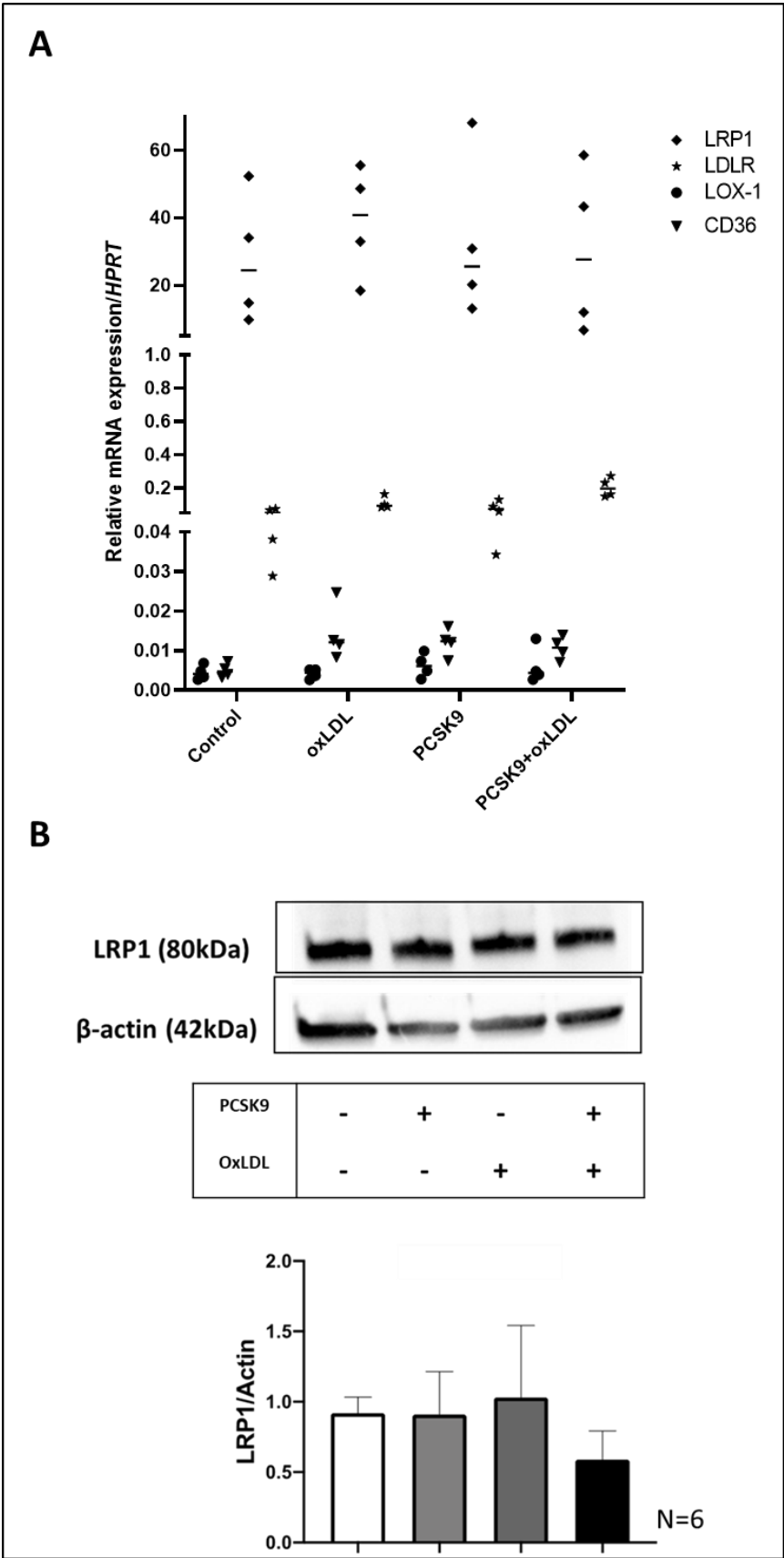
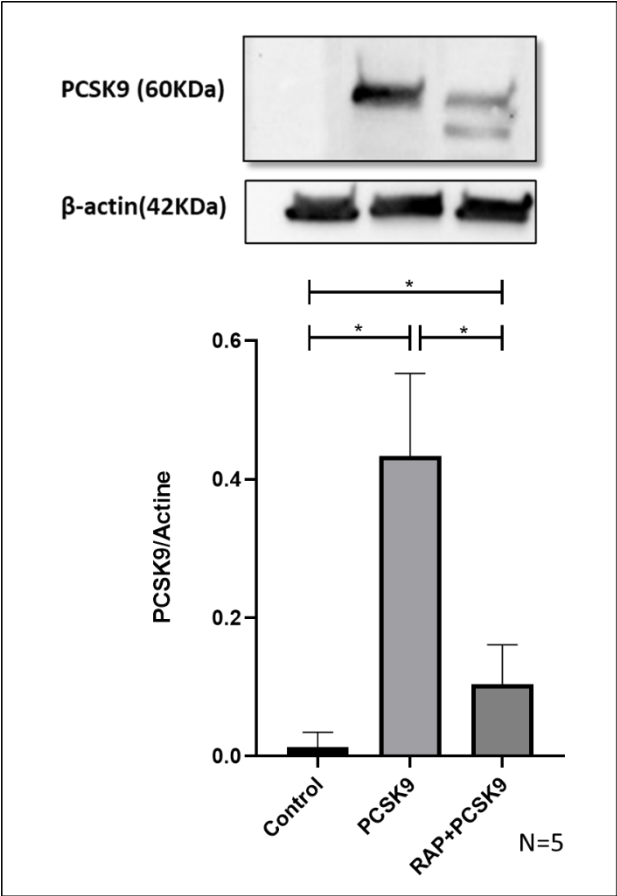


Figure 10



Supplementary Data

Figure S1: Histologic description of human aorta at different stages of atheroma using Masson's trichrome staining applied on fixed deparaffinized sections. Masson's Trichrome staining is used to discriminate collagen fibers from muscular tissues. Nuclei are stained in purple, cytoplasm in red and collagen fibers are stained in light green or anillin blue. **(A)** Healthy aorta, **(B)** Fatty streaks, **(C)** Fibrolipidic lesion.

Figure S2: Immunoblot of PCSK9 in conditioned media obtained from intima (n=3) and media (n=3) of aortas with **(A)** FS: Fatty streak; and **(B)** FLL: Fibrolipidic lesion. The human, full-length, recombinant PCSK9 D374Y expressed in HEK 293 cells was used as a positive control.

Figure S3: Immunofluorescence co-staining of PCSK9 (Red), APOB (Green), and nuclei (blue) in human healthy aorta, intimal proliferation (Fatty Streak), and fibrolipidic lesion.

Figure S1

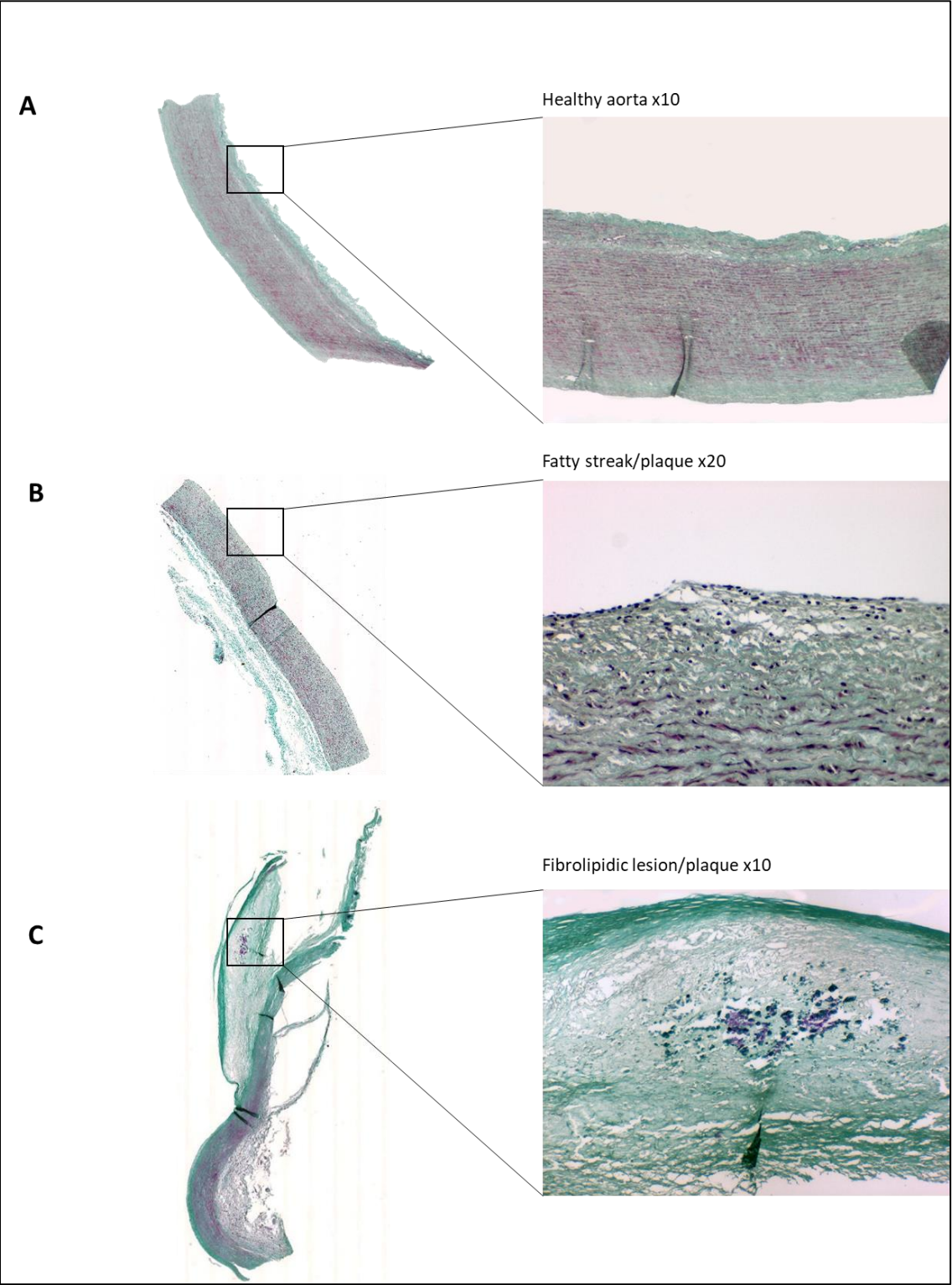


Figure S2

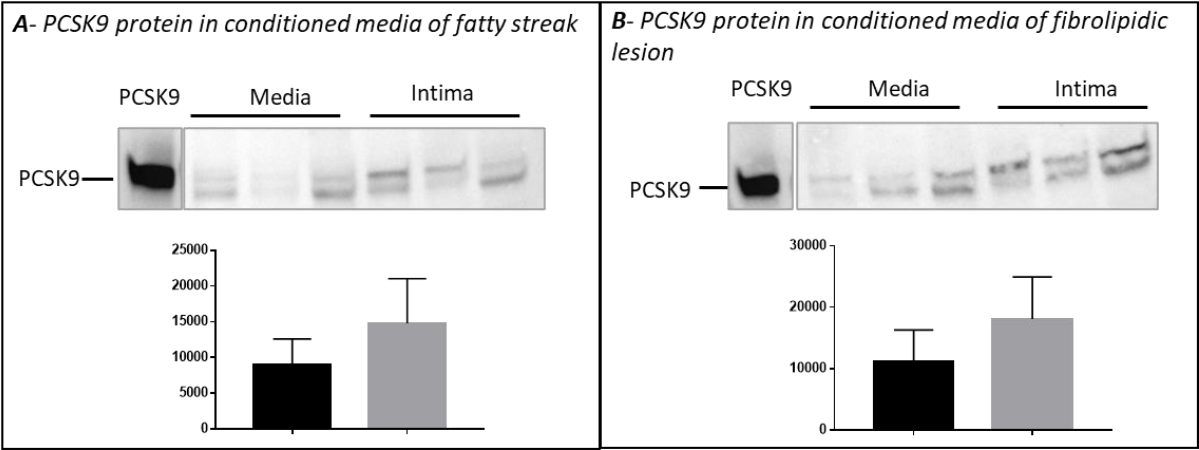
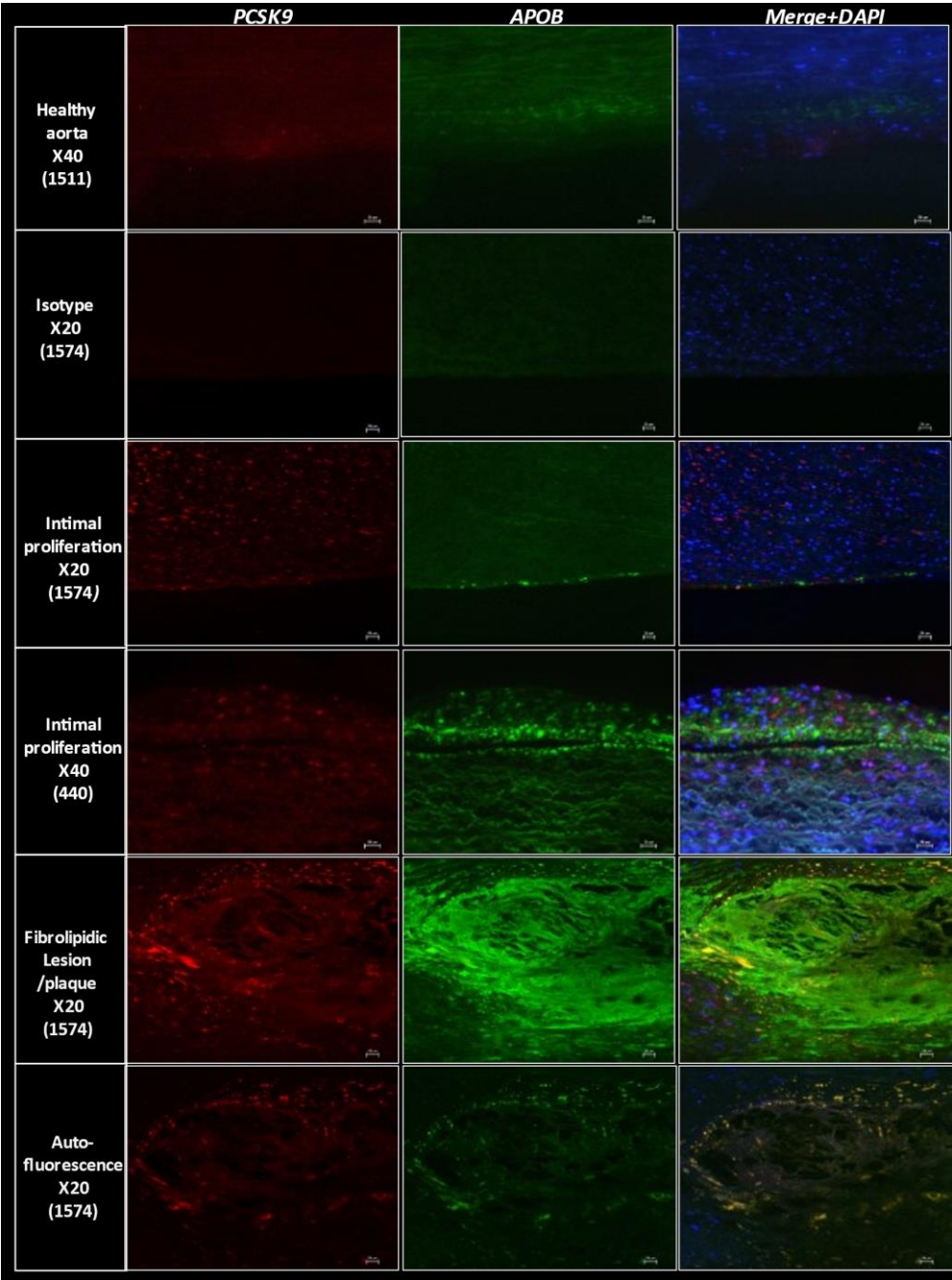


Figure S3



3. Discussion

Ce travail a permis 1) de décrire la localisation de PCSK9 à différents stades de l'athérosclérose, 2) d'étudier la capacité d'endocytose du cholestérol par les CMLv et 3) d'évaluer l'interaction entre PCSK9 et les récepteurs scavengers. Grâce à la bio banque cardiovasculaire mise en place au sein de notre unité, nous avons pu récupérer des aortes humaines issues des patients sains ou qui présentent une athérosclérose à différents stades.

Avant la dissection des aortes qui permet la mise en culture des CMLv de la média, une classification macroscopique en aortes saines ou aortes présentant des stries lipidiques ou des lésions fibrolipidiques est faite. En effet, les aortes saines sont macroscopiquement dépourvues d'athéromes, elles présentent une surface endoluminale lisse et régulière et une intima très fine ce qui rend sa séparation de la média difficile. En revanche, les stries lipidiques se caractérisent sur le plan macroscopique par une accumulation de lipides (stries lipidiques de couleur jaune visibles) dans l'espace sous-endothéliale. À ce stade, la séparation de l'intima de la média est facile. A des stades plus avancés, les lésions fibrolipidiques se caractérisent macroscopiquement, en plus des stries lipidiques jaunâtres, par la présence de bourrelets blancs qui représentent la prolifération intimale des CMLv et également par une surface endoluminale rigide qui est due à la présence de calcifications. A cette étape, l'intima est facilement détachable de la média (**Figure 1 de l'article 3**).

Nous avons décrit la localisation de PCSK9 à différents stades de l'athérosclérose et montré que PCSK9 est très faiblement exprimée dans les aortes saines tandis qu'elle est présente dans l'espace sous-endothéliale des aortes avec des stries lipidiques. A des stades plus avancés, nous avons remarqué une localisation intracellulaire de PCSK9 dans des cellules spumeuses, élément essentiel dans la progression de l'athérosclérose (**Figure 2 de l'article 3**). Ces résultats ont été confirmés par la localisation de PCSK9 dans les CMLv des aortes athéromateuses caractérisées par une prolifération intimale (**Figure 3 de l'article 3**). De plus, le dosage de PCSK9 dans les milieux conditionnés des aortes, a montré que PCSK9 est plus fréquente dans l'intima des aortes athéromateuses que dans la média de ces mêmes aortes ou que dans les aortes saines (**Figure 4A de l'article 3**).

Pour démontrer si la PCSK9 observée dans les CMLv provient du milieu extracellulaire ou si elle est synthétisée *in situ*, nous avons étudié l'expression génique de *PCSK9* dans les aortes saines et athéromateuses et montré que *PCSK9* est très faiblement exprimée quel que soit la nature des aortes (**Figure 4B de l'article 3**). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que PCSK9 présente dans la paroi artérielle est convectée de la circulation. Cependant, nous ne

pouvons pas exclure que d'autres types cellulaires dans les aortes athéromateuses, telles que les cellules endothéliales, sont capables de produire PCSK9. De plus, la présence de PCSK9 peut être due aux fibroblastes qui sont des cellules nutritionnelles et ont donc besoin de cholestérol et de PCSK9 pour réguler le taux d'expression du LDLr.

Afin de caractériser comment la PCSK9 plasmatique pénètre la paroi artérielle, nous avons fait un co-marquage PCSK9 / apoB. En effet, la plaque d'athérome est initiée par la convection des particules LDL de la circulation vers la paroi artérielle où elles sont retenues via l'interaction entre l'apoB des LDL et les glycosaminoglycanes sécrétés par les CMLv (Caro, 2009). Dans ce contexte, nous avons suggéré que PCSK9 pourrait pénétrer la paroi artérielle par interaction avec l'apoB. Cependant, l'immunomarquage ne montre pas de colocalisation de ces deux protéines (**Figure 5 de l'article 3**). En effet, l'apoB est essentiellement présente en extracellulaire au niveau de l'espace sous-endothélial et au sein du noyau lipidique des aortes athéromateuses tandis que PCSK9 a une localisation intracellulaire suggérant ainsi qu'elle est internalisée et catabolisée par les CMLv.

Des études sur des CMLv primaires isolées à partir de la média des aortes, se sont avérées essentielles afin de vérifier l'origine de la PCSK9 détectée dans la paroi artérielle. Les résultats de la mesure de l'expression génique (qPCR) et protéique (western blot) montrent que PCSK9 n'est pas produite par les CMLv même après stimulation par les LDL oxydées afin de reproduire l'environnement de l'athérosclérose. En revanche, nous avons montré que les CMLv étaient capables d'internaliser la PCSK9 mature (bande à 60 KDa) quand celle-ci est ajoutée dans le milieu de culture des cellules (**Figure 8B de l'article 3**). Ces résultats montrent que les CMLv ne produisent pas PCSK9 et que c'est la PCSK9 plasmatique mature qui est internalisée. Nous avons étudié l'expression de *PCSK9* dans des cultures primaires de macrophages humains contrôles ou traités avec des LDL acétylées. Les résultats ont montré que ces cellules expriment faiblement le transcrit *PCSK9* (**Figure 30**), ce qui confirme les résultats obtenus par des études antérieures (Ferri et al., 2012; Maxwell et al., 2005). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la PCSK9 retrouvée dans les aortes athéromateuses provient probablement de la circulation plasmatique.

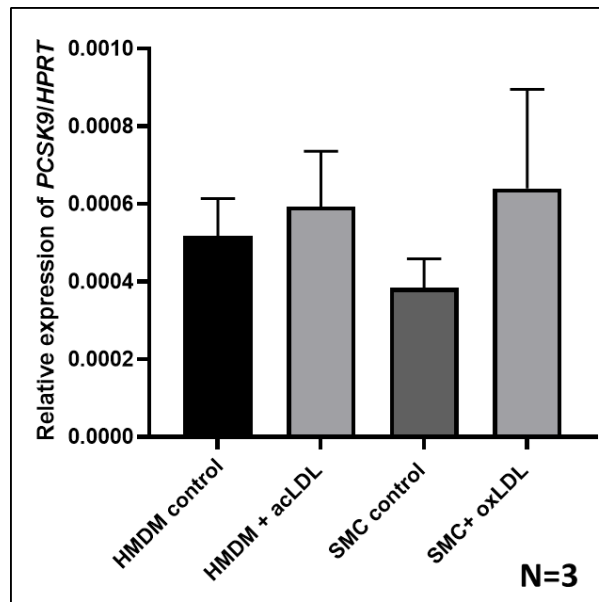


Figure 30 : Expression du gène *PCSK9* dans les macrophages humains contrôles ou traités avec des LDL acétylées et dans les cellules musculaires lisses vasculaires contrôles ou traitées par des LDL oxydées.

HMDM : Human monocyte-derived macrophages ; acLDL : LDL acétylées ; SMC : Smooth muscle cells ; ox LDL : LDL oxydées.

De plus, la diminution de la quantité de PCSK9 dans les lysats de CMLv en présence de LDL oxydées par rapport aux CMLv traitées avec la PCSK9 recombinante seule (**Figure 8B de l'article 3**), pourrait être due à une compétition entre PCSK9 et LDL oxydées pour le même récepteur à la surface des CMLv. Ainsi, plusieurs récepteurs scavengers sont des candidats dans l'internalisation de PCSK9 par les CMLv.

En effet, les LDL retenues à la paroi artérielle échappent aux anti-oxydants, subissent des modifications (oxydation, agrégation...) et sont internalisées par les récepteurs scavengers exprimés par les CMLv, les transformant en des cellules spumeuses, éléments majeurs dans le développement de l'athérosclérose (Allahverdian et al., 2014). Cette internalisation a été validée dans notre étude par la coloration huile rouge qui marque les gouttelettes lipidiques en rouge suite à leur internalisation par les CMLv (**Figure 8A de l'article 3**). De plus, la seule voie impliquée dans l'internalisation cellulaire de PCSK9 identifiée jusqu'à présent est la voie du LDLr. Dans ce contexte, nous avons suggéré que PCSK9 est internalisée par les CMLv à des stades avancés de l'athérosclérose via les récepteurs scavengers. L'étude de l'expression de ces récepteurs dans les tissus aortiques a montré que LOX-1 et CD36 sont exprimés dans

l'intima des aortes athéromateuses suggérant un rôle de ces récepteurs dans la progression de l'athérosclérose. Les immunomarquages ont confirmé ces résultats en montrant une plus forte expression de LOX-1 et CD36 dans l'intima hyperplasique des aortes athéromateuses (**Figure 6A et 6B de l'article 3**). De plus, LOX-1 colocalise avec PCSK9, suggérant un rôle direct entre ces deux protéines. En effet, une étude réalisée par Ding et al. a montré que PCSK9 augmente l'expression du LOX-1 et vice versa sous l'effet du lipopolysaccharide (LPS) (Ding et al., 2015). Nous avons tout d'abord traité nos cellules par des LDL oxydées avec et sans PCSK9 pendant 24 heures. L'expression de LOX-1 était faible dans toutes les conditions. Par la suite, en se basant sur les études de Ding et al. et Hofnagel et al., nous avons traité les CMLv primaires par le TNF- α (10 ng/ml) pendant 8 heures (Hofnagel et al., 2004). Les résultats ont montré que LOX-1 est faiblement exprimé (données non révélées). Ainsi, des études supplémentaires à des concentrations plus élevées et avec d'autres facteurs inflammatoires doivent être réalisées afin de stimuler l'expression du *LOX-1* et d'étudier l'effet que pourrait avoir PCSK9 sur la modulation de cette expression et donc éventuellement sur l'internalisation des LDL oxydées.

D'autre part, nous avons étudié l'expression tissulaire de LRP-1 qui appartient à la famille du récepteur des LDL. Les résultats ont montré que LRP-1 est exprimé 50 fois plus que les autres récepteurs scavengers (LOX-1 et CD36) et cela quel que soit le type de l'aorte étudiée. Ces résultats ont été confirmés sur des CMLv primaires. De plus, l'expression de LRP-1 ne varie pas en présence de la PCSK9 avec ou sans LDL oxydées (**Figure 9B de l'article 3**). LRP-1 est une protéine multifonctionnelle capable de lier plus de 40 ligands avec une grande affinité notamment pour les complexes protéases-antiprotéases et les LDL agrégées. Aussi, LRP-1 est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Emonard et al., 2014). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que LRP-1 peut être le récepteur majeur impliqué dans l'internalisation de PCSK9 par les CMLv. Nous avons ainsi bloqué ce récepteur en utilisant RAP (receptor-associated protein), une protéine chaperonne au niveau du réticulum endoplasmique qui empêche la fixation prématurée des ligands au niveau du LRP-1. Les résultats ont montré une baisse significative dans la quantité de PCSK9 internalisée par les CMLv. Un co-marquage de LRP-1 et PCSK9 par immunofluorescence sur des coupes d'aortes humaines et des CMLv primaires traitées par PCSK9 semble nécessaire pour détecter une éventuelle interaction protéine-protéine. De plus, des études plus poussées comme le knock down de LRP-1 par siRNA ou CRISPR, difficile à réaliser sur des cultures primaires, semblent être nécessaires afin de valider l'implication de ce récepteur dans l'internalisation de PCSK9 par les CMLv.

L'utilisation des CMLv primaires est représentative des mécanismes physiopathologiques *in vivo* contrairement aux lignées cellulaires. Cependant, les cultures primaires sont sensibles aux changements de leur environnement. En effet, les caractéristiques des cellules primaires peuvent changer à chaque passage si les conditions optimales de culture ne sont pas maintenues. Les CMLv à des passages avancés, perdent leur phénotype contractile et acquièrent le phénotype sécrétoire. De plus, elles se caractérisent par une variabilité de leur vitesse de croissance limitant ainsi l'avancement des expérimentations. Afin de limiter ces problèmes et de pouvoir faire des expériences plus avancées comme le knock down des gènes impliqués dans l'internalisation de PCSK9 par siRNA, nous avons reproduit une série d'expérimentations en utilisant des lignées de CMLv isolées à partir des aortes mésentériques humaines et immortalisées par le virus SV40. Des lignées de CMLv à des passages compris entre 10 et 14 ont été utilisées pour faire les études. Le milieu de culture utilisé était le RPMI enrichi par du glutamax, du SVF (20%) et des antibiotiques (1%). Les cellules ont été traitées avec des LDL oxydées à 100 µg/ml avec ou sans PCSK9 humaine recombinante (0.2 µg/ml) afin d'étudier l'expression génique et protéique de PCSK9, et des différents récepteurs scavengers notamment LRP-1, LOX-1, et CD36.

L'expression des gènes *LRP-1*, *LOX-1*, *CD36* et *LDLR* a été étudiée dans les lysats cellulaires des lignées de CMLv et les résultats obtenus sont semblables à ceux obtenus avec les CMLv primaires. Le récepteur LRP-1 est fortement exprimé quels que soit la condition appliquée. Il est intéressant de noter que l'expression basale de PCSK9 est plus élevée par rapport aux cellules primaires, suggérant ainsi que ces cellules sont capables de synthétiser la PCSK9 en endogène (**Figure 31**).

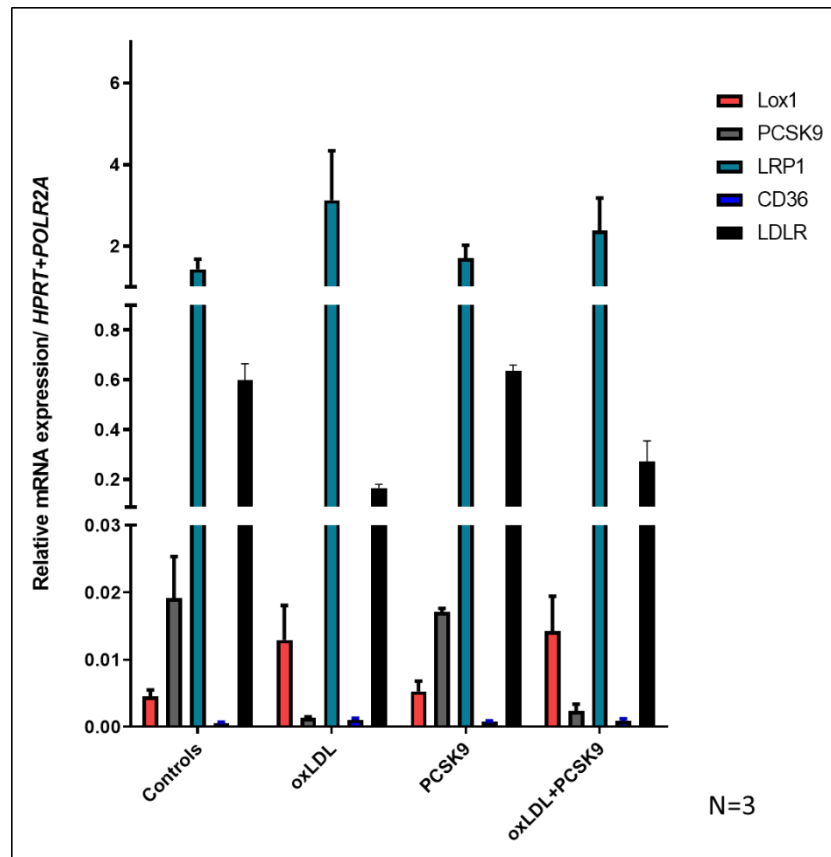


Figure 31 : Expression des gènes *PCSK9*, *LOX-1*, *LRP-1*, *CD36* et *LDLR* dans les lignées de CMLv traitées ou non par des LDL oxydées (oxLDL) et *PCSK9*.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'expression protéique : les lignées de CMLv à l'état basal sont capables de produire la PCSK9 endogène (bande de 75 KDa). En effet, l'immortalisation des cellules est responsable des changements sur le plan génétique et phénotypique et la dédifférentiation de ces cellules les rend loin de la situation *in vivo*, ce qui peut expliquer la synthèse endogène de PCSK9 par ces lignées. Comme dans les CMLv primaires, en présence des LDL oxydées la quantité de PCSK9 internalisée est diminuée (**Figure 32**).

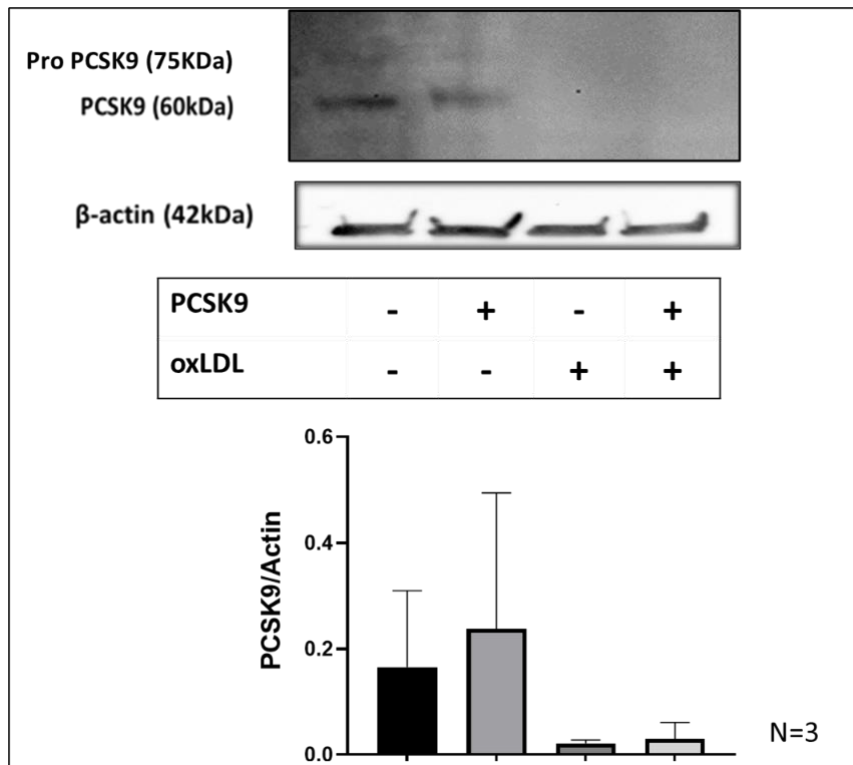


Figure 32 : Etude de l'expression protéique de PCSK9 dans les lignées CML traitées ou non avec des LDL oxydées (oxLDL) et PCSK9.

Afin de comprendre si la PCSK9 et les LDL oxydées entrent en compétition pour le même récepteur, nous avons traité les cellules avec des LDL oxydées marquées au Dil (Dil-ox LDL, thermo scientific, L34358) à raison de 10 μ g/ml et de la PCSK9 recombinante à raison de 2 μ g/ml. Les résultats ont été évalués par cytométrie en flux et ont montré une baisse significative dans l'internalisation des LDL oxydées lorsque les cellules étaient traitées avec de la PCSK9, ce qui suggère que la compétition entre PCSK9 et LDL oxydées est réciproque (**Figure 33**).

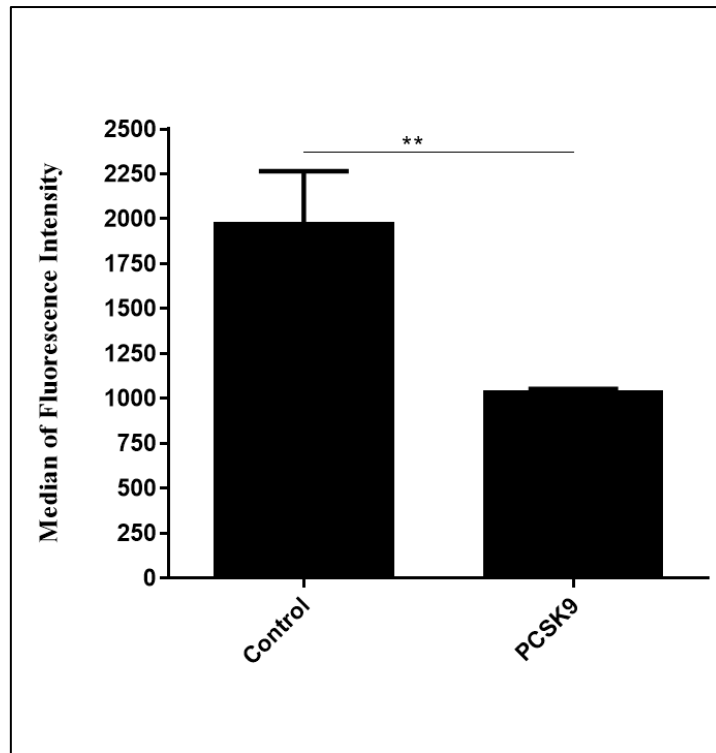


Figure 33 : Internalisation des LDL oxydées par les lignées CMLv contrôles et traitées par PCSK9, évaluée par cytométrie en flux.

N=5. ** (p<0.0022)

L'analyse par western blot de l'expression protéique de LRP-1 et CD36 dans les lysats des lignées de CMLv traitées ou non par la PCSK9 recombinante et des LDL oxydées montrent que les traitements n'ont pas d'effet sur le taux d'expression de ces récepteurs (**Figure 34 A et B**). Etant faiblement exprimé, l'expression protéique de LOX-1 n'as pas pu être démontrée. Ainsi, la stimulation par des facteurs inflammatoires semblent être nécessaires afin de pouvoir étudier l'effet de PCSK9 sur l'expression de LOX-1.

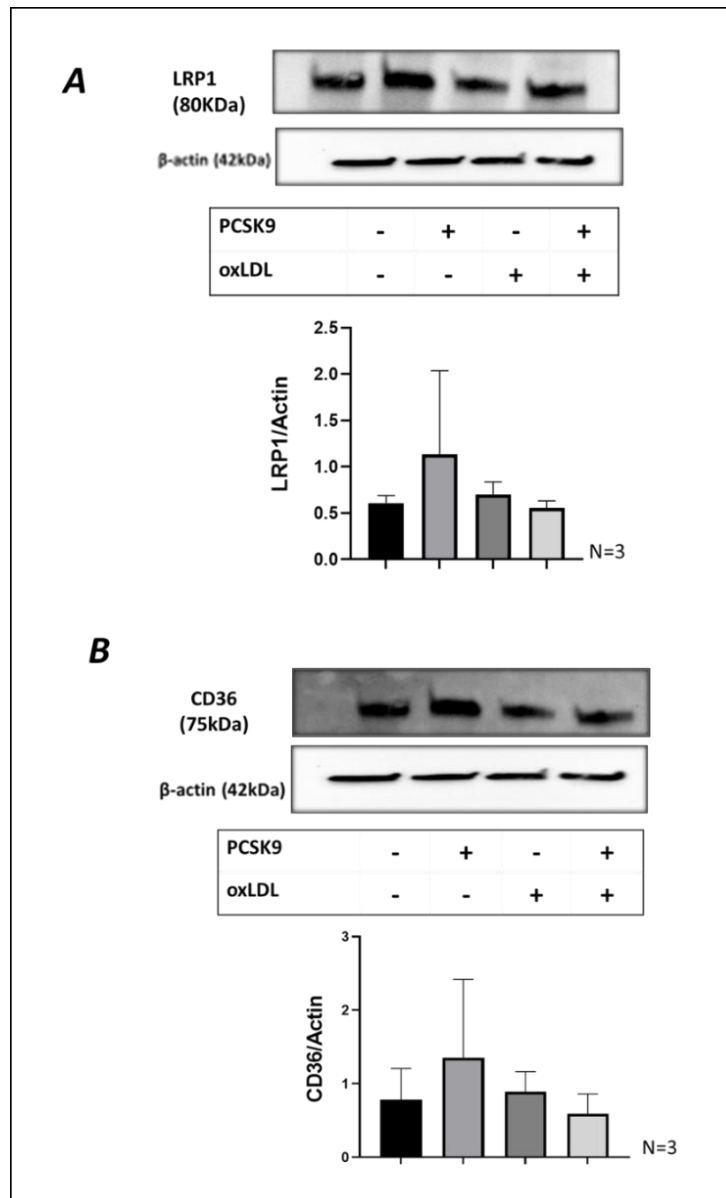


Figure 34 : Etude de l'expression protéique de (A) LRP-1 et (B) CD36 dans les lignées de CMLv traitées ou non avec des LDL oxydées (oxLDL) et PCSK9.

Comme dans les CMLv primaires, LRP-1 est fortement exprimé dans les lignées. Un knock down par un siARN (siLRP-1) est en cours afin d'inhiber l'expression du gène *LRP-1*. Une fois inhibé, le traitement par PCSK9 va nous permettre de valider l'implication de LRP-1 dans l'internalisation de PCSK9 par les CMLv.

Finalement, la révélation du mécanisme par lequel PCSK9 pourrait participer à la formation de CMLv spumeuses, aiderait à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'athérosclérose et ouvrirait la voie à de nouvelles applications des inhibiteurs de PCSK9, au delà de leur rôle dans la réduction des taux plasmatiques de LDL-C.

**DISCUSSION
GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de décès prématurés et d'handicap chez l'homme et leur incidence est en augmentation dans le monde. La pathologie sous-jacente associée à la majorité des MCV est l'athérosclérose qui conduit au développement d'une maladie coronarienne, d'une maladie cérébro-vasculaire, d'une thrombo-embolie veineuse et d'une maladie vasculaire périphérique, provoquant ensuite un infarctus du myocarde, une arythmie cardiaque ou un accident vasculaire cérébral. Un des facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose est l'hypercholestérolémie qui, associée à d'autres dyslipidémies et maladies (hypertension, diabète, obésité) ainsi qu'au mode de vie (tabagisme, sédentarité), représente globalement plus de 90 % des facteurs de risque de MCV dans toutes les études épidémiologiques (Flora & Nayak, 2019).

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes qui touche environ 30 millions de sujet dans le monde et se caractérise par des taux élevés de LDL-C. C'est une maladie qui est largement sous-diagnostiquée avec plus de 90% des pays qui n'ont pas rapporté la prévalence de l'HF dans leur population générale. En se basant sur une méta-analyse récente réalisée sur 11 millions d'individus, la prévalence actuelle de l'HF dans le monde est de 1 sur 313 (Beheshti et al., 2020). Elle est plus fréquente dans certaines régions du monde et ceci est dû à des mutations à effet fondateur : les Canadiens Français (1 sur 270), les Libanais (1 sur 81) et les Afrikaners (1 sur 83) (Beheshti et al., 2020).

La génétique joue un rôle majeur dans le développement des dyslipidémies qui résultent dans la plupart des cas d'une mutation dans un gène codant une protéine clé de l'homéostasie du cholestérol. L'HF à transmission autosomique dominante (ADH) est due à des mutations dans les gènes *LDLR*, *APOB*, et *PCSK9* qui codent respectivement le LDLr (Brown & Goldstein, 1986), son ligand, l'apoB (Innerarity et al., 1990), et la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) (Abifadel et al., 2003). Plus récemment, un 4^{ème} gène, l'*APOE*, a été impliqué dans l'ADH par l'identification de la mutation p.(Leu167del) responsable de l'ADH dans une famille française (Marduel et al., 2013). Il existe également une forme récessive de l'hypercholestérolémie qui est due à des mutations dans le gène *LDLRAP1* (Garcia et al., 2001).

L'identification de *PCSK9* a mis en évidence un nouvel acteur dans l'homéostasie du cholestérol. PCSK9, par interaction directe avec le LDLr, favorise la dégradation de ce dernier en l'acheminant vers le lysosome, empêchant ainsi son recyclage. Au-delà de l'association évidente entre la dégradation du LDLr induite par PCSK9 et l'hypercholestérolémie, des études récentes ont mis en évidence d'autres mécanismes par lesquels PCSK9 peut faciliter le développement de l'athérosclérose, indépendamment de son impact sur les lipides (Shapiro &

Fazio, 2017). Ainsi, dans ce projet, j'ai étudié le rôle de PCSK9 par deux approches différentes : physiopathologique et moléculaire.

1. Hypercholestérolémie familiale

En 2003, notre équipe a mis en évidence une hétérogénéité plus importante de l'HF avec l'exclusion des gènes *LDLR* et *APOB*. En effet, par une approche de clonage positionnel et séquençage de nombreux gènes candidats dans des familles ADH françaises recrutées grâce au réseau national de recherche sur les hypercholestérolémies familiales, Abifadel et al. ont pu identifier les premières mutations hypercholestérolémiantes de *PCSK9* qui sont la p.(Ser127Arg) et la p.(Phe216Leu) retrouvées dans trois grandes familles françaises (Abifadel et al., 2003). Par la suite, une autre mutation gain de fonction, la p.(Asp374Tyr), a été décrite dans une famille de l'Utah (Timms et al., 2004) et plus tard dans des familles Norvégiennes et Anglaises (Leren, 2004; Sun et al., 2005). D'autres mutations gain de fonction ont été identifiées par la suite dans plusieurs petites études réalisées dans divers lieux géographiques. Les mutations de *PCSK9* sont rares et associées à un phénotype sévère (Hopkins et al., 2015). En France et grâce au Registre Français pour l'HF, REFERCHOL, la p.(Ser127Arg) a été retrouvée chez 67% des patients ADH porteurs d'une mutation dans *PCSK9*, ce qui révèle ainsi la présence d'un effet fondateur (Rabès et al., 2018). Dans cette étude, nous étions intéressés à estimer l'âge de l'ancêtre commun porteur de la mutation p.(Ser127Arg) car cela devrait fournir des informations intéressantes et utiles sur son histoire naturelle.

Six familles et 10 proposants non apparentés ADH français ont été recrutés afin de pouvoir dater l'âge de l'ancêtre commun le plus récent porteur de la p.(Ser127Arg) de *PCSK9*. En analysant les résultats du génotypage des microsatellites et des SNPs qui s'étendent sur 19,6 Mb en 1p.32 autour du gène *PCSK9*, nous avons montré que les patients atteints sont tous porteurs d'un haplotype ancestral probable. L'âge de l'ancêtre commun le plus récent a été estimé à 23-26 générations avec un intervalle de confiance de 95% allant de 16 à 38 générations, à l'aide de l'«Estiage Software». En supposant qu'une génération est égale à 25 ans, la mutation aurait donc environ 612 ans, entre 400 et 950 ans avec un intervalle de confiance de 95%.

Dans cette étude, nous avons apporté une preuve moléculaire que la p.(Ser127Arg) est originaire de France. Afin de réduire l'intervalle de confiance, un nombre plus important de porteurs de la mutation p.(Ser127Arg) doit être étudié. Cela permettra de déterminer l'époque

à laquelle vivait l'ancêtre commun. Des études supplémentaires démographiques seront nécessaires afin de mieux comprendre la distribution géographique de la p.(Ser127Arg) et des autres mutations gain de fonction de *PCSK9* qui sont rares et se caractérisent par une localisation géographique bien déterminée (Hopkins et al., 2015).

Finalement, l'étude des haplotypes est un élément essentiel dans de nombreuses analyses de données de génétique moléculaire, par exemple dans la cartographie des maladies, ou la détermination de l'histoire des populations.

En général, la description d'une mutation à effet fondateur aide à définir le spectre de mutations relié à la maladie en cause au sein d'une population ou d'une région bien déterminée. Cela permettra de mettre en place un diagnostic génétique rapide et rentable chez les membres des familles atteintes surtout dans de nombreux pays où le dépistage génétique de l'HF n'est pas facilement accessible, principalement pour des raisons économiques. La présence de plateformes de génotypage basées sur le spectre de mutation dans la population constitue une première approche rentable, en particulier si une mutation à effet fondateur a été décrite.

2. Dosage de PCSK9 dans une cohorte pédiatrique libanaise

Le rôle de PCSK9 dans la régulation des taux de LDL-C a été mis en évidence lorsque des mutations gain de fonction dans *PCSK9* ont été associées à une forte élévation des taux de LDL-C et à des MCV prématurées dans des familles d'origine française (Abifadel et al., 2003). La découverte de mutations perte de fonction dans *PCSK9* qui réduisent le risque de MCV et le taux de LDL-C plasmatique a également suggéré des liens étroits avec la régulation du LDL-C (J. C. Cohen et al., 2006). Des recherches expérimentales ont par la suite montré que PCSK9 régule le métabolisme du cholestérol par le biais de la dégradation du LDLr (Abifadel et al., 2014). Ainsi, les anti-PCSK9 ont été développés et sont capables de réduire les taux du LDL-C avec un effet bénéfique sur l'incidence de MCV.

Les taux plasmatiques de PCSK9 sont influencés par des variants communs et rares de *PCSK9*, le sexe et l'utilisation de médicaments (statines, ezitimibe, fibrates). Plusieurs paramètres démographiques et métaboliques semblent être également en corrélation avec le taux sérique de PCSK9, notamment le LDL-C, les TG, l'apolipoprotéine B, l'insuline, le

glucose, le fibrinogène, la protéine C-réactive, le tabagisme et l'IMC (Leander et al., 2016). Des études réalisées chez les adultes ont montré que les taux circulants de PCSK9 sont corrélés avec les taux du LDL-C, des TG et à la survenue de MCV (Lakoski et al., 2009). Cependant, seule une étude réalisée chez les enfants Français Canadiens a étudié la corrélation entre les taux plasmatiques de PCSK9 et les différents paramètres démographiques et lipidiques (Baass et al., 2009). Ainsi, l'objectif de cette étude était, dans une cohorte de 681 écoliers Libanais, d'étudier l'association entre les taux plasmatiques de PCSK9 et les données démographiques, les paramètres lipidiques ainsi que la ménarche chez les filles et le taux de testostérone chez les garçons. Surtout que les taux de cholestérol chez les enfants peuvent prédire la survenue de MCV à l'âge adulte (Labarthe et al., 2003).

Les résultats dans cette étude ont révélé que chez les garçons et chez les filles, les taux plasmatiques de PCSK9 ont été positivement corrélés avec les taux de LDL-C, de TG et de non-HDL-C. Cette corrélation est due au fait que PCSK9 utilise le LDLr comme voie d'élimination du compartiment plasmatique et induit en même temps sa dégradation. Ainsi PCSK9, le LDLr et le LDL-C sont réciproquement régulés. Il est intéressant de noter que les taux circulants de PCSK9 étaient significativement plus élevés chez des enfants présentant des taux élevés de CT, de LDL-C et de non-HDL-C par rapport aux enfants avec des taux moins élevés ou normaux. Il a été déjà montré, chez les adultes, qu'il existe une corrélation entre les taux plasmatiques de PCSK9 et le LDL-C chez des sujets HF non traités (F. Raal et al., 2013). Il serait ainsi intéressant de collecter des informations sur les antécédents familiaux de maladie coronarienne et d'effectuer des analyses génétiques chez ces différents sous-groupes d'enfants dyslipidémiques afin de confirmer le diagnostic, surtout que les taux de cholestérol sont plus élevés chez les enfants ayant une histoire familiale de MCV et prédisent le risque de survenue de MCV à l'âge adulte. Une fois le diagnostic confirmé, les taux circulants de PCSK9 chez ces enfants pourraient être utilisés comme un marqueur dans la prédiction des atteintes cardiovasculaires à un l'âge adulte.

Les résultats de la présente étude doivent être reproduits dans d'autres groupes d'âge et dans d'autres groupes ethniques afin de comprendre le rôle de PCSK9 dans la progression des atteintes cardiovasculaires et d'élucider les différents facteurs génétiques et endogènes qui influencent le taux circulant de PCSK9 qui présente une variabilité interindividuelle importante pouvant atteindre le facteur 100.

Finalement, nos résultats ne concluent pas que les taux plasmatiques élevés de PCSK9 chez ces enfants dyslipidémiques peuvent prédire la survenue de MCV. Cependant, nos données contribuent à faire progresser l'ensemble des preuves nécessaires pour déterminer si

le taux sérique de PCSK9 est prometteur en tant que facteur de risque de MCV et peut notamment contribuer à l'élargissement de la fenêtre thérapeutique des anti-PCSK9.

3. Rôle de PCSK9 dans le développement de l'athérosclérose

Bien que la majorité des études relatives à PCSK9 sont concentrées sur son expression dans le foie et sur sa fonction locale sur le LDLr, plusieurs études ont révélé que PCSK9 est également exprimée dans d'autres cellules et tissus y compris les composants cellulaires de la paroi vasculaire et notamment les cellules endothéliales et les CMLv (Ferri et al., 2012). Cela soulève la question de savoir si la PCSK9 peut avoir des effets pro-athérogènes en plus de son activité bien connue sur le LDLr. Ainsi, l'objectif de cette étude est de décrire la localisation de PCSK9 à différents stades de l'athérosclérose et d'étudier son effet sur les capacités d'endocytose du cholestérol par les CMLv dans la paroi artérielle.

Cette étude est divisée en deux parties principales : une partie tissulaire et une cellulaire. En résumé, nous avons décrit la présence de PCSK9 au niveau de la paroi artérielle humaine aux différents stades de l'athérosclérose. Des aortes humaines ont été obtenues à partir de cœurs humains explantés. Par immunomarquage, nous avons montré que PCSK9 était présente au niveau de l'espace sous-endothélial des aortes athéromateuses et avait une localisation intracellulaire au sein des CMLv alors qu'elle était absente au niveau des aortes saines. De plus, l'étude de l'expression génique de *PCSK9* a montré qu'elle n'est pas sécrétée *in situ* mais qu'elle est convectée probablement à partir de la circulation sanguine vers la paroi artérielle. Afin d'identifier le mécanisme par lequel PCSK9 pénètre la paroi artérielle, nous avons étudié l'expression des récepteurs scavengers notamment LRP-1, LOX-1 et CD36 dans les tissus aortiques vu que la seule voie identifiée jusqu'à présent par laquelle PCSK9 pénètre dans la cellule implique le LDLr. Nos résultats ont montré que LRP-1 est fortement exprimé dans tous les types d'aortes. En revanche, LOX-1 et CD36 sont faiblement exprimés dans les aortes saines et leur expression augmente significativement dans les aortes athéromateuses.

Par la suite, l'étude cellulaire sur des cultures primaires de CMLv issues de la média d'aortes humaines, a confirmé les résultats tissulaires et a montré que LRP-1 est 50 fois plus exprimé que LOX-1 et CD36. La forte expression de LRP-1 nous a permis de poser l'hypothèse

que c'est le récepteur majeur impliqué dans l'internalisation de PCSK9 dans les CMLv. Ainsi, nous avons bloqué le récepteur LRP-1 en utilisant la RAP, une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique qui se fixe sur les domaines répétés de type complément du LRP-1 empêchant ainsi la fixation prématurée des ligands au récepteur (Prasad et al., 2015). Les résultats ont montré une baisse significative de la quantité de PCSK9 internalisée par les CMLv en présence de RAP, suggérant que LRP-1 participe à l'internalisation de PCSK9. Le fait que RAP n'empêche pas totalement l'internalisation de PCSK9 suggère que PCSK9 pourrait interagir avec une région de LRP-1 distincte des domaines répétés de type complément. En effet, PCSK9 se lie au LDLr en se fixant surtout au niveau du domaine EGF-A. Et, comme LRP-1 et LDLr appartiennent à la même famille et ont tous les deux des domaines EGF-A dont la similarité de séquences est de 48%, cela suggère que PCSK9 pourrait se lier aux domaines EGF-A de LRP-1. Il serait intéressant de valider la présence d'une interaction entre PCSK9 et LRP-1 via des immunomarquages et de vérifier l'implication de ce récepteur dans l'internalisation de PCSK9 en utilisant des siARN (siLRP-1) pour inhiber l'expression totale du gène *LRP-1*. Ces expériences sont en cours sur des lignées de CMLv humaines.

D'autre part, il est important d'étudier l'impact de PCSK9 sur le phénotype des CMLv via l'étude de l'expression des différents marqueurs. En effet, des études ont montré que PCSK9 peut modifier l'homéostasie lipidique dans les macrophages par la régulation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (« ATP-binding cassette »). Les transporteurs ABC sont impliqués dans l'efflux du cholestérol des cellules vers le milieu extracellulaire. Ainsi, l'inhibition de ce processus peut favoriser la formation de cellules spumeuses dans la plaque d'athérosclérose. Le traitement des macrophages avec de la PCSK9 exogène réduit l'efflux de cholestérol par ABCA1 (Adorni et al., 2007, 2017). Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet de PCSK9 sur les transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les CMLv humaines.

L'analyse protéomique pourrait révéler également l'expression différentielle de nombreuses protéines liées à l'activation ou à la migration des CMLv suite au traitement par PCSK9 tel que la perte des marqueurs de contraction comme ACTA2, MYH11, TAGLN et calponin et la surexpression des marqueurs fonctionnels comme KLF4 qui induit la conversion phénotypique des CMLv et favorise l'évolution de la plaque d'athérome. En effet, il a été montré que le knock-out de KLF4, un marqueur spécifique des CMLv, induit une réduction du nombre de cellules dérivées des macrophages, une diminution marquée de la taille des lésions et une augmentation de plusieurs indices de stabilité des plaques notamment une augmentation de l'épaisseur de la chape fibreuse (Shankman et al., 2015). Ainsi, les transitions dépendantes de KLF4 dans le phénotype des CMLv sont essentielles dans la pathogenèse des lésions et il

serait intéressant d'identifier tous les marqueurs qui régulent les transitions phénotypiques des CMLv et la façon par laquelle PCSK9 module leur expression afin de déterminer si les anti-PCSK9 pourraient inhiber leurs effets et augmenter ainsi la stabilité de la plaque.

De plus, la présence de PCSK9 dans les aortes athéromateuses pourrait être due aux concentrations élevées de PCSK9 plasmatique chez les patients présentant déjà un risque cardiovasculaire élevé. Dans notre étude, nous n'avons pas accès au plasma des patients. Cependant, il serait intéressant, dans de prochaines études, de doser les taux circulants de PCSK9 chez ces patients et d'étudier la corrélation avec les différents paramètres lipidiques et les facteurs de risque cardiovasculaire. En effet, Leander et al ont récemment établi un lien entre le risque cardiovasculaire et les concentrations plasmatiques de PCSK9 chez les personnes âgées, même après ajustement pour les facteurs de risque CV connus (Leander et al., 2016). Une méta-analyse récente de 9 études a également trouvé une relation significative entre les taux plasmatiques de PCSK9 et le risque d'événements cardiovasculaire (Vlachopoulos et al., 2016). Ainsi, PCSK9 pourrait être utilisé comme un marqueur dans la prévention des atteintes cardiovasculaires. Un résultat suggéré également par notre étude dans une cohorte pédiatrique Libanaise (chapitre 2).

En ce qui concerne l'expression des récepteurs scavengers, nous avons pu montrer que l'expression basale de LOX-1 et CD36 était élevée au niveau de l'intima des aortes athéromateuses mais faible au niveau cellulaire. La stimulation par des LDL oxydées et par TNF α pour LOX-1, n'a pas eu d'effet sur l'expression de ce gène. Ainsi, l'augmentation de la concentration des facteurs pro-inflammatoires et le temps d'incubation pourraient stimuler l'expression de ces récepteurs et permettrait l'étude par la suite la modulation de leur expression par PCSK9. En revanche, nous avons montré que LRP-1 était bien exprimé dans les aortes et les CMLv. En effet, en plus de sa fixation à plus de 40 ligands, LRP-1 est aussi impliqué dans diverses voies de signalisation. C'est un modulateur essentiel des taux de récepteur PDGF et l'inactivation du LRP-1 chez la souris stimule le récepteur PDGF et induit la prolifération des CMLv favorisant ainsi le développement de la plaque d'athérome (Boucher et al., 2003). Il a été également montré que PCSK9 est capable de dégrader LRP-1 (Canuel et al., 2013). Ainsi, le mécanisme moléculaire impliquant PCSK9 dans la prolifération des CMLv pourrait être lié à la dégradation de LRP-1 par PCSK9. De plus, LRP-1 active la voie Wnt5a via TGF β . Cette voie Wnt5a stimule l'efflux du cholestérol médié par ABCG1 et inhibe SREBP-2 et la biosynthèse du cholestérol. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet que pourrait avoir PCSK9 sur les voies de signalisation PDGFR et Wnt5a dans les CMLv (Asmar et al., 2016).

CONCLUSION

Ce projet a permis d'élucider le rôle de PCSK9 sur les plans moléculaires et physiopathologiques. Sur le plan moléculaire, mon étude s'est focalisée sur la mutation p.(Ser127Arg) au niveau de *PCSK9*. C'est l'une des premières mutations gain de fonction identifiée chez des familles d'origine Française. Les études des différentes mutations en France ont révélé que parmi les sujets ADH porteurs d'une mutation au niveau de *PCSK9*, 67% étaient porteurs de la mutation p.(Ser127Arg), ce qui révèle la présence d'un effet fondateur. Le recrutement des familles ADH françaises nous a permis de dater la mutation en se basant sur l'analyse des haplotypes construits à partir des marqueurs polymorphes. Ce genre d'étude permet de déterminer la prévalence des maladies qui sont localisées dans des zones géographiques bien déterminées, une des caractéristiques des mutations gain de fonction de *PCSK9*.

Sur le plan physiopathologique, le dosage de PCSK9 dans une cohorte d'enfants libanais caractérisée par des sous-groupes d'enfants dyslipidémiques, a montré que les taux circulants de PCSK9 chez ces enfants dyslipidémiques étaient significativement plus élevés par rapport aux enfants normolipidémiques. D'autre part, nous avons montré que la PCSK9 plasmatique pénètre la paroi artérielle par convection radiale et sera retrouvée dans les aortes athéromateuses. Nos résultats ont montré que PCSK9 interagit avec les récepteurs scavengers notamment LRP-1 dont le blocage induit une diminution de l'internalisation de PCSK9 par les CMLv. Ces résultats méritent d'être approfondis afin de dévoiler un rôle pro-athérogène de PCSK9 dans le but de 1) mettre en évidence les avantages d'utiliser les taux plasmatiques de PCSK9 comme marqueur dans la prédiction de la survenue des MCV et 2) de montrer les effets potentiels des inhibiteurs de PCSK9 sur l'athérogenèse et les maladies vasculaires associées au-delà de la réduction du LDL-C.

RÉFÉRENCES

Abifadel, M., Elbitar, S., El Khoury, P., Ghaleb, Y., Chémaly, M., Moussalli, M.-L., Rabès, J.-P., Varret, M., & Boileau, C. (2014). Living the PCSK9 adventure : From the identification of a new gene in familial hypercholesterolemia towards a potential new class of anticholesterol drugs. *Current Atherosclerosis Reports*, *16*(9), 439. <https://doi.org/10.1007/s11883-014-0439-8>

Abifadel, M., Guerin, M., Benjannet, S., Rabès, J.-P., Le Goff, W., Julia, Z., Hamelin, J., Carreau, V., Varret, M., Bruckert, E., Tosolini, L., Meilhac, O., Couvert, P., Bonnefont-Rousselot, D., Chapman, J., Carrié, A., Michel, J.-B., Prat, A., Seidah, N. G., & Boileau, C. (2012). Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, *223*(2), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.006>

Abifadel, M., Rabès, J.-P., Jambart, S., Halaby, G., Gannagé-Yared, M.-H., Sarkis, A., Beaino, G., Varret, M., Salem, N., Corbani, S., Aydnian, H., Junien, C., Munnich, A., & Boileau, C. (2009). The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Lebanon : Spectrum of LDLR mutations and role of PCSK9 as a modifier gene. *Human Mutation*, *30*(7), E682-691. <https://doi.org/10.1002/humu.21002>

Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.-M., Luc, G., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, *34*(2), 154-156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>

Abou Khalil, Y., Marmontel, O., Ferrières, J., Paillard, F., Yelnik, C., Carreau, V., Charrière, S., Bruckert, E., Gallo, A., Giral, P., Philippi, A., Bluteau, O., Boileau, C., Abifadel, M., Di-Filippo, M., Carrié, A., Rabès, J.-P., & Varret, M. (2022). APOE Molecular Spectrum in a French Cohort with Primary Dyslipidemia. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5792. <https://doi.org/10.3390/ijms23105792>

Adorni, M. P., Cipollari, E., Favari, E., Zanotti, I., Zimetti, F., Corsini, A., Ricci, C., Bernini, F., & Ferri, N. (2017). Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis*, *256*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.019>

Adorni, M. P., Zimetti, F., Billheimer, J. T., Wang, N., Rader, D. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *Journal of Lipid Research*, *48*(11), 2453-2462. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700274-JLR200>

Alborn, W. E., Cao, G., Careskey, H. E., Qian, Y.-W., Subramaniam, D. R., Davies, J., Conner, E. M., & Konrad, R. J. (2007). Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clinical Chemistry*, *53*(10), 1814-1819. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.091280>

Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A., & Bochaton-Piallat, M.-L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, *114*(4), 540-550. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy022>

Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T., & Francis, G. A. (2014). Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*, *129*(15), 1551-1559. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015>

Allahverdian, S., & Francis, G. A. (2010). Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *20*(3), 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2010.09.002>

Amgen. (2022). *Repatha : Package leaflet : Information for the use*. <https://www.medicines.org.uk/emc/files/pil.6962.pdf>

Andersen, L. H., Miserez, A. R., Ahmad, Z., & Andersen, R. L. (2016). Familial defective apolipoprotein B-100 : A review. *Journal of Clinical Lipidology*, *10*(6), 1297-1302. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.09.009>

Arama, C., Diarra, I., Kouriba, B., Sirois, F., Fedoryak, O., Thera, M. A., Coulibaly, D., Lyke, K. E., Plowe, C. V., Chrétien, M., Doumbo, O. K., & Mbikay, M. (2018). Malaria severity : Possible influence of the E670G PCSK9 polymorphism: A preliminary case-control study in Malian children. *PLoS One*, *13*(2), e0192850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192850>

Arjmandi-Tash, O., Razavi, S. E., & Zambouri, R. (2011). Possibility of atherosclerosis in an arterial bifurcation model. *BioImpacts: BI*, *1*(4), 225-228. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.032>

Asmar, Z. E., Terrand, J., Jenty, M., Host, L., Mlih, M., Zerr, A., Justiniano, H., Matz, R. L., Boudier, C., Scholler, E., Garnier, J.-M., Bertaccini, D., Thiersé, D., Schaeffer, C., Dorsselaer, A. V., Herz, J., Bruban, V., & Boucher, P. (2016). Convergent Signaling Pathways Controlled by LRP1 (Receptor-related Protein 1) Cytoplasmic and Extracellular Domains Limit Cellular Cholesterol Accumulation *. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(10), 5116-5127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.714485>

Au, A., Griffiths, L. R., Cheng, K.-K., Wee Kooi, C., Irene, L., & Keat Wei, L. (2015). The Influence of OLR1 and PCSK9 Gene Polymorphisms on Ischemic Stroke : Evidence from a Meta-Analysis. *Scientific Reports*, *5*, 18224. <https://doi.org/10.1038/srep18224>

Authors/Task Force Members, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), & ESC National Cardiac Societies. (2019). 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias : Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, *290*, 140-205. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.014>

Awan, Z., Choi, H. Y., Stitzel, N., Ruel, I., Bamimore, M. A., Husa, R., Gagnon, M.-H., Wang, R.-H. L., Peloso, G. M., Hegele, R. A., Seidah, N. G., Kathiresan, S., & Genest, J. (2013). APOE p.Leu167del mutation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, *231*(2), 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.007>

Baass, A., Dubuc, G., Tremblay, M., Delvin, E. E., O'Loughlin, J., Levy, E., Davignon, J., & Lambert, M. (2009). Plasma PCSK9 Is Associated with Age, Sex, and Multiple Metabolic Markers in a Population-Based Sample of Children and Adolescents. *Clinical Chemistry*, *55*(9), 1637-1645. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.126987>

- Bächli, E. B., Schaer, D. J., Walter, R. B., Fehr, J., & Schoedon, G. (2006). Functional expression of the CD163 scavenger receptor on acute myeloid leukemia cells of monocytic lineage. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*(2), 312-318. <https://doi.org/10.1189/jlb.0605309>
- Bäck, M., & Michel, J.-B. (2021). From organic and inorganic phosphates to valvular and vascular calcifications. *Cardiovascular Research*, *117*(9), 2016-2029. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab038>
- Ballantyne, C. M., Bays, H., Catapano, A. L., Goldberg, A., Ray, K. K., & Saseen, J. J. (2021). Role of Bempedoic Acid in Clinical Practice. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *35*(4), 853-864. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07147-5>
- Barale, C., Melchionda, E., Morotti, A., & Russo, I. (2021). PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5880. <https://doi.org/10.3390/ijms22115880>
- Barreto, J., Karathanasis, S. K., Remaley, A., & Sposito, A. C. (2021). Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor: Mechanistic Insight and Potential Clinical Use. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(1), 153-166. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315421>
- Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(12), 727-744. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9>
- Beheshti, S. O., Madsen, C. M., Varbo, A., & Nordestgaard, B. G. (2020). Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *Journal of the American College of Cardiology*, *75*(20), 2553-2566. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.057>
- Béliard-Lasserre, S. (2020). Registre national de l'hypercholestérolémie familiale: Pourquoi et comment? *Médecine des Maladies Métaboliques*, *14*(6), 518-523. <https://doi.org/10.1016/j.mmm.2020.06.015>
- Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2019). The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(1), 9-20. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0052-6>
- Berger, J.-M., Vaillant, N., Le May, C., Calderon, C., Brégeon, J., Prieur, X., Hadchouel, J., Loirand, G., & Cariou, B. (2015). PCSK9-deficiency does not alter blood pressure and sodium balance in mouse models of hypertension. *Atherosclerosis*, *239*(1), 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.012>
- Besseling, J., Kastelein, J. J. P., Defesche, J. C., Hutten, B. A., & Hovingh, G. K. (2015). Association Between Familial Hypercholesterolemia and Prevalence of Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*, *313*(10), 1029-1036. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.1206>
- Biocca, S., Falconi, M., Filesi, I., Baldini, F., Vecchione, L., Mango, R., Romeo, F., Federici, G., Desideri, A., & Novelli, G. (2009). Functional analysis and molecular dynamics simulation of LOX-1 K167N polymorphism reveal alteration of receptor activity. *PloS One*, *4*(2), e4648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004648>

- Borén, J., Ekström, U., Agren, B., Nilsson-Ehle, P., & Innerarity, T. L. (2001). The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9214-9218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008890200>
- Boucher, P., & Gotthardt, M. (2004). LRP and PDGF signaling : A pathway to atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(2), 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2003.12.001>
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.-P., Anderson, R. G. W., & Herz, J. (2003). LRP : Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science*, 300(5617), 329-332. <https://doi.org/10.1126/science.1082095>
- Boucher, P., & Herz, J. (2011). Signaling through LRP1 : Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochemical Pharmacology*, 81(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.09.018>
- Boucher, P., Li, W.-P., Matz, R. L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R. G. W., & Herz, J. (2007). LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: Implications for Marfan syndrome. *PloS One*, 2(5), e448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000448>
- Bourbon, M., Alves, A. C., & Sijbrands, E. J. (2017). Low-density lipoprotein receptor mutational analysis in diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Current Opinion in Lipidology*, 28(2), 120-129. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000404>
- Bown, M. J., Jones, G. T., Harrison, S. C., Wright, B. J., Bumpstead, S., Baas, A. F., Gretarsdottir, S., Badger, S. A., Bradley, D. T., Burnand, K., Child, A. H., Clough, R. E., Cockerill, G., Hafez, H., Scott, D. J. A., Futers, S., Johnson, A., Sohrabi, S., Smith, A., ... Samani, N. J. (2011). Abdominal aortic aneurysm is associated with a variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *American Journal of Human Genetics*, 89(5), 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.002>
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4746), 34-47.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K., & Anderson, R. G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 82(3), 597-613. <https://doi.org/10.1083/jcb.82.3.597>
- Bychkov, I. O., Kamenets, E. A., Filatova, A. Y., Skoblov, M. Y., Mikhaylova, S. V., Strokova, T. V., Gundobina, O. S., & Zakharova, E. Y. (2019). The novel synonymous variant in LIPA gene affects splicing and causes lysosomal acid lipase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 127(3), 212-215. <https://doi.org/10.1016/j.jmgme.2019.06.005>
- Cal, R., Juan-Babot, O., Brossa, V., Roura, S., Gálvez-Montón, C., Portoles, M., Rivera, M., Cinca, J., Badimon, L., & Llorente-Cortés, V. (2012). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients. *Journal of Translational Medicine*, 10, 160. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-160>
- Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., & Leren, T. P. (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1551-1558. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl077>

- Canton, J., Neculai, D., & Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(9), 621-634. <https://doi.org/10.1038/nri3515>
- Canuel, M., Sun, X., Asselin, M.-C., Paramithiotis, E., Prat, A., & Seidah, N. G. (2013). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PloS One*, *8*(5), e64145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064145>
- Cao, Y.-X., Li, S., Liu, H.-H., & Li, J.-J. (2018). Impact of PCSK9 monoclonal antibodies on circulating hs-CRP levels : A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*, *8*(9), e022348. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-022348>
- Cariou, B., Langhi, C., Le Bras, M., Bortolotti, M., Lê, K.-A., Theytaz, F., Le May, C., Guyomarc'h-Delasalle, B., Zaïr, Y., Kreis, R., Boesch, C., Krempf, M., Tappy, L., & Costet, P. (2013). Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutrition & Metabolism*, *10*, 4. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-4>
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, *438*(7070), 932-936. <https://doi.org/10.1038/nature04478>
- Caro, C. g. (2009). Discovery of the Role of Wall Shear in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(2), 158-161. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.166736>
- Cartier, J. L., & Goldberg, A. C. (2016). Familial Hypercholesterolemia : Advances in Recognition and Therapy. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *59*(2), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2016.07.006>
- Casale, J., & Crane, J. S. (2022). Biochemistry, Glycosaminoglycans. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544295/>
- Castellano, J., Aledo, R., Sendra, J., Costales, P., Juan-Babot, O., Badimon, L., & Llorente-Cortés, V. (2011). Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1 α in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(6), 1411-1420. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.225490>
- Cenarro, A., Etxebarria, A., de Castro-Orós, I., Stef, M., Bea, A. M., Palacios, L., Mateo-Gallego, R., Benito-Vicente, A., Ostolaza, H., Tejedor, T., Martín, C., & Civeira, F. (2016). The p.Leu167del Mutation in APOE Gene Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia by Down-regulation of LDL Receptor Expression in Hepatocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(5), 2113-2121. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3874>
- Chan, D. C., Pang, J., McQuillan, B. M., Hung, J., Beilby, J. P., Barrett, P. H. R., & Watts, G. F. (2016). Plasma Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 as a Predictor of Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults. *Heart, Lung & Circulation*, *25*(5), 520-525. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.10.017>
- Chaudhary, R., Garg, J., Shah, N., & Sumner, A. (2017). PCSK9 inhibitors : A new era of lipid lowering therapy. *World Journal of Cardiology*, *9*(2), 76-91. <https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i2.76>

- Chen, J., Mehta, J. L., Haider, N., Zhang, X., Narula, J., & Li, D. (2004). Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circulation Research*, *94*(3), 370-376. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000113782.07824.BE>
- Chen, J., Su, Y., Pi, S., Hu, B., & Mao, L. (2021). The Dual Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*, 682389. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.682389>
- Chen, M., Kakutani, M., Naruko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T., & Sawamura, T. (2001). Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *282*(1), 153-158. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4516>
- Chiu, J.-J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews*, *91*(1), 327-387. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>
- Chora, J. R., Medeiros, A. M., Alves, A. C., & Bourbon, M. (2018). Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: Application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *20*(6), 591-598. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.151>
- Civeira, F. & International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. (2004). Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, *173*(1), 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2003.11.010>
- Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., & Hobbs, H. H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, *354*(12), 1264-1272. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054013>
- Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I. K., Graham, R., Garcia, C. K., & Hobbs, H. H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nature Genetics*, *37*(2), 161-165. <https://doi.org/10.1038/ng1509>
- Courtemanche, H., Bigot, E., Pichelin, M., Guyomarch, B., Boutoleau-Bretonnière, C., Le May, C., Derkinderen, P., & Cariou, B. (2018). PCSK9 Concentrations in Cerebrospinal Fluid Are Not Specifically Increased in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *62*(4), 1519-1525. <https://doi.org/10.3233/JAD-170993>
- Cuchel, M., Bruckert, E., Ginsberg, H. N., Raal, F. J., Santos, R. D., Hegele, R. A., Kuivenhoven, J. A., Nordestgaard, B. G., Descamps, O. S., Steinhagen-Thiessen, E., Tybjærg-Hansen, A., Watts, G. F., Aversa, M., Boileau, C., Borén, J., Catapano, A. L., Defesche, J. C., Hovingh, G. K., Humphries, S. E., ... European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia. (2014). Homozygous familial hypercholesterolaemia: New insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, *35*(32), 2146-2157. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu274>

Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., & Qiu, X. (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(5), 413-419. <https://doi.org/10.1038/nsmb1235>

Cupido, A. J., Reeskamp, L. F., & Kastelein, J. J. P. (2017). Novel lipid modifying drugs to lower LDL cholesterol. *Current Opinion in Lipidology*. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000428>

Cupido, A. J., Tromp, T. R., & Hovingh, G. K. (2021). The clinical applicability of polygenic risk scores for LDL-cholesterol: Considerations, current evidence and future perspectives. *Current Opinion in Lipidology*, *32*(2), 112-116. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000741>

Cuthbert, G. A., Shaik, F., Harrison, M. A., Ponnambalam, S., & Homer-Vanniasinkam, S. (2020). Scavenger Receptors as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Cells*, *9*(11), E2453. <https://doi.org/10.3390/cells9112453>

Da Dalt, L., Ruscica, M., Bonacina, F., Balzarotti, G., Dhyani, A., Di Cairano, E., Baragetti, A., Arnaboldi, L., De Metrio, S., Pellegatta, F., Grigore, L., Botta, M., Macchi, C., Uboldi, P., Perego, C., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2019). PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: The role of the low-density lipoprotein receptor. *European Heart Journal*, *40*(4), 357-368. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy357>

Davignon, J., & Dubuc, G. (2009). Statins and ezetimibe modulate plasma proprotein convertase subtilisin kexin-9 (PCSK9) levels. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, *120*, 163-173.

Defesche, J. C., Gidding, S. S., Harada-Shiba, M., Hegele, R. A., Santos, R. D., & Wierzbicki, A. S. (2017). Familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.93>

Delbosc, S., Haloui, M., Louedec, L., Dupuis, M., Cubizolles, M., Podust, V. N., Fung, E. T., Michel, J.-B., & Meilhac, O. (2008). Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *14*(7-8), 383-394. <https://doi.org/10.2119/2008-00030.Delbosc>

Demers, A., Samami, S., Lauzier, B., Des Rosiers, C., Ngo Sock, E. T., Ong, H., & Mayer, G. (2015). PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(12), 2517-2525. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306032>

Dewpura, T., Raymond, A., Hamelin, J., Seidah, N. G., Mbikay, M., Chrétien, M., & Mayne, J. (2008). PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *The FEBS Journal*, *275*(13), 3480-3493. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06495.x>

- Ding, Z., Liu, S., Wang, X., Deng, X., Fan, Y., Shahanawaz, J., Shmookler Reis, R. J., Varughese, K. I., Sawamura, T., & Mehta, J. L. (2015). Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovascular Research*, *107*(4), 556-567. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv178>
- Ding, Z., Liu, S., Wang, X., Mathur, P., Dai, Y., Theus, S., Deng, X., Fan, Y., & Mehta, J. L. (2016). Cross-Talk Between PCSK9 and Damaged mtDNA in Vascular Smooth Muscle Cells : Role in Apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *25*(18), 997-1008. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6631>
- Ding, Z., Liu, S., Wang, X., Theus, S., Deng, X., Fan, Y., Zhou, S., & Mehta, J. L. (2018). PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovascular Research*, *114*(8), 1145-1153. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy079>
- Ding, Z., Wang, X., Liu, S., Shahanawaz, J., Theus, S., Fan, Y., Deng, X., Zhou, S., & Mehta, J. L. (2018). PCSK9 expression in the ischaemic heart and its relationship to infarct size, cardiac function, and development of autophagy. *Cardiovascular Research*, *114*(13), 1738-1751. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy128>
- Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., & Prat, A. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(8), 1454-1459. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000134621.14315.43>
- Dubuc, G., Tremblay, M., Paré, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., & Davignon, J. (2010). A new method for measurement of total plasma PCSK9: Clinical applications. *Journal of Lipid Research*, *51*(1), 140-149. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900273-JLR200>
- El Khoury, P., Elbitar, S., Ghaleb, Y., Khalil, Y. A., Varret, M., Boileau, C., & Abifadel, M. (2017). PCSK9 Mutations in Familial Hypercholesterolemia: From a Groundbreaking Discovery to Anti-PCSK9 Therapies. *Current Atherosclerosis Reports*, *19*(12), 49. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0684-8>
- El Khoury, P., Roussel, R., Fumeron, F., Abou-Khalil, Y., Velho, G., Mohammedi, K., Jacob, M.-P., Steg, P. G., Potier, L., & Ghaleb, Y. (2018). Plasma proprotein-convertase-subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *20*(4), 943-953.
- Elbitar, S., Susan-Resiga, D., Ghaleb, Y., El Khoury, P., Peloso, G., Stitzel, N., Rabès, J.-P., Carreau, V., Hamelin, J., Ben-Djouidi-Ouadda, A., Bruckert, E., Boileau, C., Seidah, N. G., Varret, M., & Abifadel, M. (2018). New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Scientific Reports*, *8*(1), 1943. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20281-9>
- Emonard, H., Théret, L., Bennisroune, A. H., & Dedieu, S. (2014). Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathologie-Biologie*, *62*(2), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.02.002>

- Fahed, A. C., Khalaf, R., Salloum, R., Andary, R. R., Safa, R., El-Rassy, I., Moubarak, E., Azar, S. T., Bitar, F. F., & Nemer, G. (2016). Variable expressivity and co-occurrence of LDLR and LDLRAP1 mutations in familial hypercholesterolemia: Failure of the dominant and recessive dichotomy. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4(3), 283-291. <https://doi.org/10.1002/mgg3.203>
- Falk, E., Nakano, M., Bentzon, J. F., Finn, A. V., & Virmani, R. (2013). Update on acute coronary syndromes: The pathologists' view. *European Heart Journal*, 34(10), 719-728. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs411>
- Feingold, K. R., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Patzek, S. M., & Grunfeld, C. (2008). Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(2), 341-344. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.023>
- Fellin, R., Arca, M., Zuliani, G., Calandra, S., & Bertolini, S. (2015). The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene*, 555(1), 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.020>
- Ferri, N., Marchianò, S., Tibolla, G., Baetta, R., Dhyani, A., Ruscica, M., Uboldi, P., Catapano, A. L., & Corsini, A. (2016). PCSK9 knock-out mice are protected from neointimal formation in response to perivascular carotid collar placement. *Atherosclerosis*, 253, 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.910>
- Ferri, N., Tibolla, G., Pirillo, A., Cipollone, F., Mezzetti, A., Pacia, S., Corsini, A., & Catapano, A. L. (2012). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*, 220(2), 381-386. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.026>
- Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B. R., Strahs, A., Clausen, V., Wijngaard, P., Horton, J. D., Taubel, J., Brooks, A., Fernando, C., Kauffman, R. S., Kallend, D., Vaishnav, A., & Simon, A. (2017). A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *The New England Journal of Medicine*, 376(1), 41-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609243>
- Flora, G. D., & Nayak, M. K. (2019). A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current Pharmaceutical Design*, 25(38), 4063-4084. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190925163827>
- Futema, M., Plagnol, V., Li, K., Whittall, R. A., Neil, H. A. W., Seed, M., Simon Broome Consortium, Bertolini, S., Calandra, S., Descamps, O. S., Graham, C. A., Hegele, R. A., Karpe, F., Durst, R., Leitersdorf, E., Lench, N., Nair, D. R., Soran, H., Van Bockxmeer, F. M., ... Humphries, S. E. (2014). Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *Journal of Medical Genetics*, 51(8), 537-544. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102405>

Futema, M., Shah, S., Cooper, J. A., Li, K., Whittall, R. A., Sharifi, M., Goldberg, O., Drogari, E., Mollaki, V., Wiegman, A., Defesche, J., D'Agostino, M. N., D'Angelo, A., Rubba, P., Fortunato, G., Waluś-Miarka, M., Hegele, R. A., Aderayo Bamimore, M., Durst, R., ... Humphries, S. E. (2015). Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clinical Chemistry*, *61*(1), 231-238. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.231365>

Gagnon, A., Ooi, T. C., Cousins, M., Favreau, C., Henry, K., Landry, A., & Sorisky, A. (2016). The anti-adipogenic effect of peripheral blood mononuclear cells is absent with PCSK9 loss-of-function variants. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *24*(11), 2384-2391. <https://doi.org/10.1002/oby.21656>

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Alonso-Estrada, R., Aguilo-Arce, J., Ostolaza, H., Palacios, L., & Martin, C. (2020). Mutation type classification and pathogenicity assignment of sixteen missense variants located in the EGF-precursor homology domain of the LDLR. *Scientific Reports*, *10*(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58734-9>

Garcia, C. K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science (New York, N.Y.)*, *292*(5520), 1394-1398. <https://doi.org/10.1126/science.1060458>

Garçon, D., Moreau, F., Ayer, A., Dijk, W., Prieur, X., Arnaud, L., Roubtsova, A., Seidah, N., Prat, A., Cariou, B., & Le May, C. (2020). Circulating Rather Than Intestinal PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) Regulates Postprandial Lipemia in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *40*(9), 2084-2094. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314194>

Garuti, R., Jones, C., Li, W.-P., Michaely, P., Herz, J., Gerard, R. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2005). The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(49), 40996-41004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509394200>

Gencer, B., Montecucco, F., Nanchen, D., Carbone, F., Klingenberg, R., Vuilleumier, N., Aghlmandi, S., Heg, D., Räber, L., Auer, R., Jüni, P., Windecker, S., Lüscher, T. F., Matter, C. M., Rodondi, N., & Mach, F. (2016). Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, *37*(6), 546-553. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv637>

Georges, N., Simon, A., Naim, B., Georges, N., Georges, A. F., & Tanios, A. (2019). Universal screening program for lipid disorders in 2-10 years old Lebanese children : A new approach. *International Journal of Pediatrics & Adolescent Medicine*, *6*(3), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2019.05.003>

Ghaleb, Y., Elbitar, S., Khoury, P. E., Rabes, J.-P., Boileau, C., Abifadel, M., & Varret, M. (2017). Usefulness of the genetic risk score to identify phenocopies in families with autosomal dominant hypercholesterolemia? *Atherosclerosis*, *263*, e83. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.269>

Ghaleb, Y., Elbitar, S., Philippi, A., El Khoury, P., Azar, Y., Andrianirina, M., Loste, A., Abou-Khalil, Y., Nicolas, G., Le Borgne, M., Moulin, P., Di-Filippo, M., Charrière, S., Farnier, M., Yelnick, C., Carreau, V., Ferrières, J., Lecerf, J.-M., Derksen, A., ... Varret, M. (2022). Whole Exome/Genome Sequencing Joint Analysis of a Family with Oligogenic Familial Hypercholesterolemia. *Metabolites*, 12(3), 262. <https://doi.org/10.3390/metabo12030262>

Giugliano, R. P., Mach, F., Zavitz, K., Kurtz, C., Im, K., Kanevsky, E., Schneider, J., Wang, H., Keech, A., Pedersen, T. R., Sabatine, M. S., Sever, P. S., Robinson, J. G., Honarpour, N., Wasserman, S. M., Ott, B. R., & EBBINGHAUS Investigators. (2017). Cognitive Function in a Randomized Trial of Evolocumab. *The New England Journal of Medicine*, 377(7), 633-643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701131>

Giunzioni, I., Tavori, H., Covarrubias, R., Major, A. S., Ding, L., Zhang, Y., DeVay, R. M., Hong, L., Fan, D., Predazzi, I. M., Rashid, S., Linton, M. F., & Fazio, S. (2016). Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion. *The Journal of Pathology*, 238(1), 52-62. <https://doi.org/10.1002/path.4630>

Go, G.-W., & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(1), 19-28.

Goldberg, T. E., Huey, E. D., & Devanand, D. P. (2020). Association of APOE e2 genotype with Alzheimer's and non-Alzheimer's neurodegenerative pathologies. *Nature Communications*, 11(1), 4727. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18198-x>

Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), 431-438. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179564>

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333-337. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333>

Gomez, D., & Owens, G. K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 95(2), 156-164. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs115>

Grune, J., Meyborg, H., Bezhaeva, T., Kappert, K., Hillmeister, P., Kintscher, U., Pieske, B., & Stawowy, P. (2017). PCSK9 regulates the chemokine receptor CCR2 on monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485(2), 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.085>

Guedeney, P., Giustino, G., Sorrentino, S., Claessen, B. E., Camaj, A., Kalkman, D. N., Vogel, B., Sartori, S., De Rosa, S., Baber, U., Indolfi, C., Montalescot, G., Dangas, G. D., Rosenson, R. S., Pocock, S. J., & Mehran, R. (2019). Efficacy and safety of alirocumab and evolocumab: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Heart Journal*, ehz430. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz430>

Guo, L., Zheng, Z., Ai, J., Huang, B., & Li, X.-A. (2012). Comment on « Class B scavenger receptor types I and II and CD36 targeting improves sepsis survival and acute outcomes in mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(2), 501; author reply 502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1290035>

Guo, Q., Feng, X., & Zhou, Y. (2020). PCSK9 Variants in Familial Hypercholesterolemia : A Comprehensive Synopsis. *Frontiers in Genetics*, *11*, 1020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.01020>

Gustafsen, C., Olsen, D., Vilstrup, J., Lund, S., Reinhardt, A., Wellner, N., Larsen, T., Andersen, C. B. F., Weyer, K., Li, J., Seeberger, P. H., Thirup, S., Madsen, P., & Glerup, S. (2017). Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor. *Nature Communications*, *8*, 503. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00568-7>

Haas, M. E., Levenson, A. E., Sun, X., Liao, W.-H., Rutkowski, J. M., de Ferranti, S. D., Schumacher, V. A., Scherer, P. E., Salant, D. J., & Biddinger, S. B. (2016). The Role of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 in Nephrotic Syndrome-Associated Hypercholesterolemia. *Circulation*, *134*(1), 61-72. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020912>

Halper, J., & Kjaer, M. (2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix : Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *802*, 31-47. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_3

Haney, E. M., Huffman, L. H., Bougatsos, C., Freeman, M., Steiner, R. D., & Nelson, H. D. (2007). Screening and treatment for lipid disorders in children and adolescents : Systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Pediatrics*, *120*(1), e189-214. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1801>

Harvey, P. D., Sabbagh, M. N., Harrison, J. E., Ginsberg, H. N., Chapman, M. J., Manvelian, G., Moryusef, A., Mandel, J., & Farnier, M. (2018). No evidence of neurocognitive adverse events associated with alirocumab treatment in 3340 patients from 14 randomized Phase 2 and 3 controlled trials : A meta-analysis of individual patient data. *European Heart Journal*, *39*(5), 374-381. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx661>

Hegele, R. A. (2009). Plasma lipoproteins : Genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(2), 109-121. <https://doi.org/10.1038/nrg2481>

Hinagata, J., Kakutani, M., Fujii, T., Naruko, T., Inoue, N., Fujita, Y., Mehta, J. L., Ueda, M., & Sawamura, T. (2006). Oxidized LDL receptor LOX-1 is involved in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury in a rat model. *Cardiovascular Research*, *69*(1), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.08.013>

Hindawi. (s. d.). *Association of the rs562556 PCSK9 Gene Polymorphism with Reduced Mortality in Severe Malaria among Malian Children*. Consulté 15 septembre 2022, à l'adresse <https://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2020/9340480/>

Hobbs, H. H., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, *1*(6), 445-466. <https://doi.org/10.1002/humu.1380010602>

Hofnagel, O., Luechtenborg, B., Stolle, K., Lorkowski, S., Eschert, H., Plenz, G., & Robenek, H. (2004). Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(10), 1789-1795. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000140061.89096.2b>

- Hooper, A. J., van Bockxmeer, F. M., & Burnett, J. R. (2005). Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 42(5-6), 515-545. <https://doi.org/10.1080/10408360500295113>
- Hoosdally, S. J., Andress, E. J., Wooding, C., Martin, C. A., & Linton, K. J. (2009). The Human Scavenger Receptor CD36 : Glycosylation status and its role in trafficking and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16277-16288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007849>
- Hopkins, P. N., Defesche, J., Fouchier, S. W., Bruckert, E., Luc, G., Cariou, B., Sjouke, B., Leren, T. P., Harada-Shiba, M., Mabuchi, H., Rabès, J.-P., Carrié, A., van Heyningen, C., Carreau, V., Farnier, M., Teoh, Y. P., Bourbon, M., Kawashiri, M.-A., Nohara, A., ... Swergold, G. D. (2015). Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and Its Specific Treatment With Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 8(6), 823-831. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001129>
- Ho-Tin-Noé, B., & Michel, J.-B. (2011). Initiation of angiogenesis in atherosclerosis : Smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 21(7), 183-187. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.05.007>
- Huijgen, R., Blom, D. J., Hartgers, M. L., Chemello, K., Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Behardien, Z., Blackhurst, D. M., Brice, B. C., Defesche, J. C., de Jong, A. G., Jooste, R. J., Solomon, G. A. E., Wolmarans, K. H., Hovingh, G. K., Martin, C., Lambert, G., & Marais, A. D. (2021). Novel PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) Variants in Patients With Familial Hypercholesterolemia From Cape Town. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(2), 934-943. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314482>
- Huijgen, R., Fouchier, S. W., Denoun, M., Hutten, B. A., Vissers, M. N., Lambert, G., & Kastelein, J. J. P. (2012). Plasma levels of PCSK9 and phenotypic variability in familial hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, 53(5), 979-983. <https://doi.org/10.1194/jlr.P023994>
- Humphries, S. E., Neely, R. D. G., Whittall, R. A., Troutt, J. S., Konrad, R. J., Scartezini, M., Li, K. W., Cooper, J. A., Acharya, J., & Neil, A. (2009). Healthy individuals carrying the PCSK9 p.R46L variant and familial hypercholesterolemia patients carrying PCSK9 p.D374Y exhibit lower plasma concentrations of PCSK9. *Clinical Chemistry*, 55(12), 2153-2161. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.129759>
- Hunt, S. C., Hopkins, P. N., Bulka, K., McDermott, M. T., Thorne, T. L., Wardell, B. B., Bowen, B. R., Ballinger, D. G., Skolnick, M. H., & Samuels, M. E. (2000). Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(4), 1089-1093.
- Hussain, M. M., Strickland, D. K., & Bakillah, A. (1999). The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annual Review of Nutrition*, 19, 141-172. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.141>
- Iacocca, M. A., & Hegele, R. A. (2018). Role of DNA copy number variation in dyslipidemias. *Current Opinion in Lipidology*, 29(2), 125-132. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000483>

- Innerarity, T. L., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Krauss, R. M., Vega, G. L., Grundy, S. M., Friedl, W., Davignon, J., & McCarthy, B. J. (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: A mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, *31*(8), 1337-1349.
- Jacob, M.-P. (2006). Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *médecine/sciences*, *22*(3), 273-278. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223273>
- Jana, S., Hu, M., Shen, M., & Kassiri, Z. (2019). Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Experimental & Molecular Medicine*, *51*(12), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0286-3>
- Jebari-Benslaiman, S., Galicia-García, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J. R., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Benito-Vicente, A., & Martín, C. (2022). Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6), 3346. <https://doi.org/10.3390/ijms23063346>
- Jeon, H., & Blacklow, S. C. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 535-562. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133354>
- Jin, P., & Cong, S. (2019). LOX-1 and atherosclerotic-related diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *491*, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.006>
- Kanekiyo, T., & Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *6*, 93. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00093>
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., & Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, *99*(24), 3110-3117. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.24.3110>
- Katzmann, J. L., Cupido, A. J., & Laufs, U. (2022). Gene Therapy Targeting PCSK9. *Metabolites*, *12*(1), 70. <https://doi.org/10.3390/metabo12010070>
- Kaya, E., Kayıkçıoğlu, M., Tetik Vardarlı, A., Eroğlu, Z., Payzın, S., & Can, L. (2017). PCSK 9 gain-of-function mutations (R496W and D374Y) and clinical cardiovascular characteristics in a cohort of Turkish patients with familial hypercholesterolemia. *Anatolian Journal of Cardiology*, *18*(4), 266-272. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2017.7654>
- Khachadurian, A. K. (1964). THE INHERITANCE OF ESSENTIAL FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. *The American Journal of Medicine*, *37*, 402-407. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(64\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(64)90196-2)
- Khachadurian, A. K., & Uthman, S. M. (1973). Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutrition and Metabolism*, *15*(1), 132-140.

- Khalil, Y. A., Rabès, J.-P., Boileau, C., & Varret, M. (2021). APOE gene variants in primary dyslipidemia. *Atherosclerosis*, *328*, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.007>
- Kobiyama, K., & Ley, K. (2018). Atherosclerosis : A Chronic Inflammatory Disease with an Autoimmune Component. *Circulation research*, *123*(10), 1118-1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816>
- Koopal, C., Marais, A. D., Westerink, J., & Visseren, F. L. J. (2017). Autosomal dominant familial dysbetalipoproteinemia : A pathophysiological framework and practical approach to diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Lipidology*, *11*(1), 12-23.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.10.001>
- Krysa, J. A., Ooi, T. C., Proctor, S. D., & Vine, D. F. (2017). Nutritional and Lipid Modulation of PCSK9 : Effects on Cardiometabolic Risk Factors. *The Journal of Nutrition*, *147*(4), 473-481. <https://doi.org/10.3945/jn.116.235069>
- Kume, N., Murase, T., Moriwaki, H., Aoyama, T., Sawamura, T., Masaki, T., & Kita, T. (1998). Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circulation Research*, *83*(3), 322-327. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.322>
- Labarthe, D. R., Dai, S., & Fulton, J. E. (2003). Cholesterol screening in children : Insights from Project HeartBeat! and NHANES III. *Progress in Pediatric Cardiology*, *17*(2), 169-178. [https://doi.org/10.1016/S1058-9813\(03\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S1058-9813(03)00054-7)
- Labonté, P., Begley, S., Guévin, C., Asselin, M.-C., Nassoury, N., Mayer, G., Prat, A., & Seidah, N. G. (2009). PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *50*(1), 17-24. <https://doi.org/10.1002/hep.22911>
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., & Michel, J.-B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology : A cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular Research*, *95*(2), 194-204. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs135>
- Lakoski, S. G., Lagace, T. A., Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2009). Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(7), 2537-2543. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0141>
- LaMarre, J., Wolf, B. B., Kittler, E. L., Quesenberry, P. J., & Gonias, S. L. (1993). Regulation of macrophage alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *The Journal of Clinical Investigation*, *91*(3), 1219-1224. <https://doi.org/10.1172/JCI116283>
- Lansberg, P. J., Tuzgöl, S., van de Ree, M. A., Defesche, J. C., & Kastelein, J. J. (2000). [Higher prevalence of familial hypercholesterolemia than expected in adult patients of four family practices in Netherlands]. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, *144*(30), 1437-1440.

Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., Hussain, M. M., Collet, X., Cariou, B., & Costet, P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1484-1493. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300263>

Le May, C., Kourimate, S., Langhi, C., Chétiveaux, M., Jarry, A., Comera, C., Collet, X., Kuipers, F., Krempf, M., Cariou, B., & Costet, P. (2009). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 684-690. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181586>

Le Refuge huguenot. (s. d.). *Musée protestant*. Consulté 15 septembre 2022, à l'adresse <https://museeprotestant.org/notice/le-refuge-huguenot/>

Leander, K., Mälarstig, A., Van't Hooft, F. M., Hyde, C., Hellénus, M.-L., Troutt, J. S., Konrad, R. J., Öhrvik, J., Hamsten, A., & de Faire, U. (2016). Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation*, 133(13), 1230-1239. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018531>

Lehrman, M. A., Schneider, W. J., Brown, M. S., Davis, C. G., Elhammer, A., Russell, D. W., & Goldstein, J. L. (1987). The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(1), 401-410.

Lepreux, S., Guyot, C., Billet, F., Combe, C., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., & Desmoulière, A. (2013). Smoothelin, a new marker to determine the origin of liver fibrogenic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(48), 9343-9350. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i48.9343>

Leren, T. P. (2004). Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clinical Genetics*, 65(5), 419-422. <https://doi.org/10.1111/j.0009-9163.2004.0238.x>

Leren, T. P., & Bogsrud, M. P. (2021). Molecular genetic testing for autosomal dominant hypercholesterolemia in 29,449 Norwegian index patients and 14,230 relatives during the years 1993-2020. *Atherosclerosis*, 322, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.02.022>

Li, D., Williams, V., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Romeo, F., & Mehta, J. L. (2003). Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(6), 1048-1055. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)02966-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)02966-2)

Li, H., Dong, B., Park, S. W., Lee, H.-S., Chen, W., & Liu, J. (2009). Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28885-28895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052407>

- Li, S., Guo, Y.-L., Xu, R.-X., Zhang, Y., Zhu, C.-G., Sun, J., Qing, P., Wu, N.-Q., Jiang, L.-X., & Li, J.-J. (2014). Association of plasma PCSK9 levels with white blood cell count and its subsets in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, *234*(2), 441-445. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.001>
- Li, S., Zhu, C.-G., Guo, Y.-L., Xu, R.-X., Zhang, Y., Sun, J., & Li, J.-J. (2015). The relationship between the plasma PCSK9 levels and platelet indices in patients with stable coronary artery disease. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *22*(1), 76-84. <https://doi.org/10.5551/jat.25841>
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
- Liu, M., Wu, G., Baysarowich, J., Kavana, M., Addona, G. H., Bierilo, K. K., Mudgett, J. S., Pavlovic, G., Sitlani, A., Renger, J. J., Hubbard, B. K., Fisher, T. S., & Zerbinatti, C. V. (2010). PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *Journal of Lipid Research*, *51*(9), 2611-2618. <https://doi.org/10.1194/jlr.M006635>
- Llorente-Cortés, V., & Badimon, L. (2005). LDL receptor-related protein and the vascular wall : Implications for atherothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(3), 497-504. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000154280.62072.fd>
- Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Camino-López, S., Costales, P., & Badimon, L. (2006). Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(1), 117-123. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193618.32611.8b>
- Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Sánchez, S., Rodríguez, C., & Badimon, L. (2002). Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells : Possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation*, *106*(24), 3104-3110. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000041434.28573.0b>
- Los, B., Borges, J. B., Oliveira, V. F., Freitas, R. C., Dagli-Hernandez, C., Bortolin, R. H., Gonçalves, R. M., Faludi, A. A., Rodrigues, A. C., Bastos, G. M., Jannes, C. E., Pereira, A. C., Hirata, R. D., & Hirata, M. H. (2021). Functional analysis of PCSK9 3'UTR variants and mRNA-miRNA interactions in patients with familial hypercholesterolemia. *Epigenomics*, *13*(10), 779-791. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0462>
- Mahley, R. W., & Bersot, T. P. (2006). Drug Therapy for Hypercholesterolemia and Dyslipidemia. In *GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS* (11^e éd.). McGraw-Hill.
- Majesky, M. W., Dong, X. R., Hoglund, V., Mahoney, W. M., & Daum, G. (2011). The adventitia : A dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(7), 1530-1539. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221549>

Marais, A. D. (2004). Familial hypercholesterolaemia. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 25(1), 49-68.

Marais, A. D. (2019). Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*, 51(2), 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.002>

Marduel, M., Ouguerram, K., Serre, V., Bonnefont-Rousselot, D., Marques-Pinheiro, A., Erik Berge, K., Devillers, M., Luc, G., Lecerf, J.-M., Tosolini, L., Erlich, D., Peloso, G. M., Stitzel, N., Nitchké, P., Jaïs, J.-P., French Research Network on ADH, Abifadel, M., Kathiresan, S., Leren, T. P., ... Varret, M. (2013). Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Human Mutation*, 34(1), 83-87. <https://doi.org/10.1002/humu.22215>

Martin, W. R., Lightstone, F. C., & Cheng, F. (2020). In Silico Insights into Protein-protein Interaction Disruptive Mutations in the PCSK9-LDLR complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), E1550. <https://doi.org/10.3390/ijms21051550>

Matsushita, N., Kashiwagi, M., Wait, R., Nagayoshi, R., Nakamura, M., Matsuda, T., Hogger, P., Guyre, P. M., Nagase, H., & Matsuyama, T. (2002). Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clinical and Experimental Immunology*, 130(1), 156-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01963.x>

Maxwell, K. N., Fisher, E. A., & Breslow, J. L. (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 2069-2074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409736102>

Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., & Breslow, J. L. (2003). Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *Journal of Lipid Research*, 44(11), 2109-2119. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300203-JLR200>

May, P., Reddy, Y. K., & Herz, J. (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18736-18743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201979200>

May, P., Woldt, E., Matz, R. L., & Boucher, P. (2007). The LDL receptor-related protein (LRP) family : An old family of proteins with new physiological functions. *Annals of Medicine*, 39(3), 219-228. <https://doi.org/10.1080/07853890701214881>

Mayne, J., Raymond, A., Chaplin, A., Cousins, M., Kaefer, N., Gyamera-Acheampong, C., Seidah, N. G., Mbikay, M., Chrétien, M., & Ooi, T. C. (2007). Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(2), 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.029>

Mbikay, M., Mayne, J., Seidah, N. G., & Chrétien, M. (2007). Of PCSK9, cholesterol homeostasis and parasitic infections : Possible survival benefits of loss-of-function PCSK9 genetic polymorphisms. *Medical Hypotheses*, 69(5), 1010-1017. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.03.018>

- Mbikay, M., Sirois, F., Mayne, J., Wang, G.-S., Chen, A., Dewpura, T., Prat, A., Seidah, N. G., Chretien, M., & Scott, F. W. (2010). PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Letters*, *584*(4), 701-706. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.018>
- McCarthy, J. J., Parker, A., Salem, R., Moliterno, D. J., Wang, Q., Plow, E. F., Rao, S., Shen, G., Rogers, W. J., Newby, L. K., Cannata, R., Glatt, K., Topol, E. J., & GeneQuest Investigators. (2004). Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: Cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes. *Journal of Medical Genetics*, *41*(5), 334-341. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.016584>
- Mefford, M. T., Rosenson, R. S., Cushman, M., Farkouh, M. E., McClure, L. A., Wadley, V. G., Irvin, M. R., Bittner, V., Safford, M. M., Somaratne, R., Monda, K. L., Muntner, P., & Levitan, E. B. (2018). PCSK9 Variants, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Neurocognitive Impairment: Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study (REGARDS). *Circulation*, *137*(12), 1260-1269. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029785>
- Mehta, J. L., Chen, J., Hermonat, P. L., Romeo, F., & Novelli, G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovascular Research*, *69*(1), 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.006>
- Mehta, J. L., Sanada, N., Hu, C. P., Chen, J., Dandapat, A., Sugawara, F., Satoh, H., Inoue, K., Kawase, Y., Jishage, K., Suzuki, H., Takeya, M., Schnackenberg, L., Beger, R., Hermonat, P. L., Thomas, M., & Sawamura, T. (2007). Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circulation Research*, *100*(11), 1634-1642. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149724>
- Michel, J., & Ho-Tin-Noé, B. (2017). *Another story of Human Atherosclerosis*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Another-story-of-Human-Atherosclerosis-Michel-Ho-Tin-No%C3%A9/d67b5cbe040323f898ddd33f44c9addb69a3b47c>
- Michel, J.-B. (2020). Phylogenic Determinants of Cardiovascular Frailty, Focus on Hemodynamics and Arterial Smooth Muscle Cells. *Physiological Reviews*, *100*(4), 1779-1837. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2019>
- Michel, J.-B., Martin-Ventura, J. L., Nicoletti, A., & Ho-Tin-Noé, B. (2014). Pathology of human plaque vulnerability: Mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages. *Atherosclerosis*, *234*(2), 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.020>
- Michel, J.-B., Thauvat, O., Houard, X., Meilhac, O., Caligiuri, G., & Nicoletti, A. (2007). Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(6), 1259-1268. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.137851>
- Mineo, C. (2020). Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, *116*(7), 1254-1274. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz338>

- Miserez, A. R., & Muller, P. Y. (2000). Familial defective apolipoprotein B-100 : A mutation emerged in the mesolithic ancestors of Celtic peoples? *Atherosclerosis*, *148*(2), 433-436. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(99\)00470-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00470-0)
- Moore, K. J., & Freeman, M. W. (2006). Scavenger Receptors in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(8), 1702-1711. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43>
- Moorjani, S., Roy, M., Gagné, C., Davignon, J., Brun, D., Toussaint, M., Lambert, M., Campeau, L., Blaichman, S., & Lupien, P. (1989). Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, *9*(2), 211-216. <https://doi.org/10.1161/01.atv.9.2.211>
- Morbiducci, U., Kok, A. M., Kwak, B. R., Stone, P. H., Steinman, D. A., & Wentzel, J. J. (2016). Atherosclerosis at arterial bifurcations : Evidence for the role of haemodynamics and geometry. *Thrombosis and Haemostasis*, *115*(3), 484-492. <https://doi.org/10.1160/TH15-07-0597>
- Muratoglu, S. C., Belgrave, S., Hampton, B., Migliorini, M., Coksaygan, T., Chen, L., Mikhailenko, I., & Strickland, D. K. (2013). LRP1 protects the vasculature by regulating levels of connective tissue growth factor and HtrA1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(9), 2137-2146. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301893>
- Musunuru, K., Chadwick, A. C., Mizoguchi, T., Garcia, S. P., DeNizio, J. E., Reiss, C. W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., Amaonye, M., Beach, A., Berth, K., Biswas, S., Braun, M. C., Chen, H.-M., Colace, T. V., Ganey, J. D., Gangopadhyay, S. A., ... Kathiresan, S. (2021). In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature*, *593*(7859), 429-434. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>
- Myant, N. B., Forbes, S. A., Day, I. N., & Gallagher, J. (1997). Estimation of the age of the ancestral arginine3500→glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics*, *45*(1), 78-87. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4898>
- Nagai, M., Hirayama, K., Ebihara, I., Higuchi, T., Shimohata, H., & Kobayashi, M. (2016). Serum levels of the soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 in MPO-ANCA-associated renal vasculitis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, *45*(5), 397-403. <https://doi.org/10.3109/03009742.2015.1127410>
- Nagase, M., Hirose, S., Sawamura, T., Masaki, T., & Fujita, T. (1997). Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *237*(3), 496-498. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7176>
- Nakashima, Y., Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T. N., & Sueishi, K. (2007). Early human atherosclerosis : Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(5), 1159-1165. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.134080>

- Nguyen, T. T., Kruckeberg, K. E., O'Brien, J. F., Ji, Z. S., Karnes, P. S., Crotty, T. B., Hay, I. D., Mahley, R. W., & O'Brien, T. (2000). Familial splenomegaly: Macrophage hypercatabolism of lipoproteins associated with apolipoprotein E mutation [apolipoprotein E (delta149 Leu)]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(11), 4354-4358. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6981>
- Nishikido, T., & Ray, K. K. (2018). Inclisiran for the treatment of dyslipidemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(3), 287-294. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1442435>
- Nordestgaard, B. G., & Benn, M. (2017). Genetic testing for familial hypercholesterolaemia is essential in individuals with high LDL cholesterol : Who does it in the world? *European Heart Journal*, 38(20), 1580-1583. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx136>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., Wiklund, O., Hegele, R. A., Raal, F. J., Defesche, J. C., Wiegman, A., Santos, R. D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Averna, M., Borén, J., ... European Atherosclerosis Society Consensus Panel. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population : Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, 34(45), 3478-3490a. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx273>
- O'Connell, E. M., & Lohoff, F. W. (2020). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) in the Brain and Relevance for Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 609. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00609>
- Olofsson, S.-O., & Borén, J. (2005). Apolipoprotein B : A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 258(5), 395-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x>
- Ooi, T. C., Krysa, J. A., Chaker, S., Abujrad, H., Mayne, J., Henry, K., Cousins, M., Raymond, A., Favreau, C., Taljaard, M., Chrétien, M., Mbikay, M., Proctor, S. D., & Vine, D. F. (2017). The Effect of PCSK9 Loss-of-Function Variants on the Postprandial Lipid and ApoB-Lipoprotein Response. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(9), 3452-3460. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00684>
- Otsuka, F., Finn, A. V., Yazdani, S. K., Nakano, M., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2012). The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nature Reviews. Cardiology*, 9(8), 439-453. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.64>
- Ouguerram, K., Chetiveaux, M., Zair, Y., Costet, P., Abifadel, M., Varret, M., Boileau, C., Magot, T., & Krempf, M. (2004). Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1448-1453. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133684.77013.88>
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 75(3), 487-517. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.487>

- Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews*, 84(3), 767-801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>
- Palee, S., McSweeney, C. M., Maneechote, C., Moisescu, D. M., Jaiwongkam, T., Kerdphoo, S., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2019). PCSK9 inhibitor improves cardiac function and reduces infarct size in rats with ischaemia/reperfusion injury: Benefits beyond lipid-lowering effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(11), 7310-7319. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14586>
- Pandit, S., Wisniewski, D., Santoro, J. C., Ha, S., Ramakrishnan, V., Cubbon, R. M., Cummings, R. T., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Sitlani, A., & Fisher, T. S. (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, 49(6), 1333-1343. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800049-JLR200>
- Park, K.-H., & Park, W. J. (2015). Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *Journal of Korean Medical Science*, 30(9), 1213-1225. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.9.1213>
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, e99. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.38>
- Pasterkamp, G., den Ruijter, H. M., & Libby, P. (2017). Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. *Nature Reviews. Cardiology*, 14(1), 21-29. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.166>
- Persson, L., Gälman, C., Angelin, B., & Rudling, M. (2009). Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology*, 150(3), 1140-1146. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1281>
- Persson, L., Henriksson, P., Westerlund, E., Hovatta, O., Angelin, B., & Rudling, M. (2012). Endogenous Estrogens Lower Plasma PCSK9 and LDL Cholesterol But Not Lp(a) or Bile Acid Synthesis in Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(3), 810-814. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.242461>
- Poirier, S., Prat, A., Marcinkiewicz, E., Paquin, J., Chitramuthu, B. P., Baranowski, D., Cadieux, B., Bennett, H. P. J., & Seidah, N. G. (2006). Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 838-850. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03928.x>
- Potere, N., Del Buono, M. G., Mauro, A. G., Abbate, A., & Toldo, S. (2019). Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 in Cardiac Inflammation and Infarct Healing. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2019.00051>
- Pothineni, N. V. K., Karathanasis, S. K., Ding, Z., Arulandu, A., Varughese, K. I., & Mehta, J. L. (2017). LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(22), 2759-2768. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.010>

Pourchasse, P. (2010). Les huguenots et l'élite négociante scandinave au XVIIIe siècle. *Histoire, économie & société*, 29e année(1), 81-92. <https://doi.org/10.3917/hes.101.0081>

Prasad, J. M., Migliorini, M., Galisteo, R., & Strickland, D. K. (2015). Generation of a Potent Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) Antagonist by Engineering a Stable Form of the Receptor-associated Protein (RAP) D3 Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17262-17268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660084>

Predazzi, I. M., Norata, G. D., Vecchione, L., Garlaschelli, K., Amati, F., Grigore, L., Cutuli, L., Pirillo, A., Tramontana, S., Romeo, F., Novelli, G., & Catapano, A. L. (2012). Association between OLR1 K167N SNP and intima media thickness of the common carotid artery in the general population. *PLoS One*, 7(2), e31086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031086>

Qi, Z., Hu, L., Zhang, J., Yang, W., Liu, X., Jia, D., Yao, Z., Chang, L., Pan, G., Zhong, H., Luo, X., Yao, K., Sun, A., Qian, J., Ding, Z., & Ge, J. (2021). PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9) Enhances Platelet Activation, Thrombosis, and Myocardial Infarct Expansion by Binding to Platelet CD36. *Circulation*, 143(1), 45-61. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046290>

Quinn, K. A., Grimsley, P. G., Dai, Y. P., Tapner, M., Chesterman, C. N., & Owensby, D. A. (1997). Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23946-23951. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23946>

Raal, F. J., Honarpour, N., Blom, D. J., Hovingh, G. K., Xu, F., Scott, R., Wasserman, S. M., Stein, E. A., & TESLA Investigators. (2015). Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, 385(9965), 341-350. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61374-X)

Raal, F. J., Kallend, D., Ray, K. K., Turner, T., Koenig, W., Wright, R. S., Wijngaard, P. L. J., Curcio, D., Jaros, M. J., Leiter, L. A., Kastelein, J. J. P., & ORION-9 Investigators. (2020). Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, 382(16), 1520-1530. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913805>

Raal, F., Panz, V., Immelman, A., & Pilcher, G. (2013). Elevated PCSK9 levels in untreated patients with heterozygous or homozygous familial hypercholesterolemia and the response to high-dose statin therapy. *Journal of the American Heart Association*, 2(2), e000028. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.000028>

Rabès, J.-P., Béliard, S., & Carrié, A. (2018). Familial hypercholesterolemia : Experience from France. *Current Opinion in Lipidology*, 29(2), 65-71. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000496>

Rač, M. E., Safranow, K., & Poncyljusz, W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 13(5-6), 288-296. <https://doi.org/10.2119/2006-00088.Rač>

Raines, E. W. (2000). The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: Relationships to vascular disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(3), 173-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00155.x>

- Ramanathan, A., Gusarova, V., Stahl, N., Gurnett-Bander, A., & Kyratsous, C. A. (2016). Alirocumab, a Therapeutic Human Antibody to PCSK9, Does Not Affect CD81 Levels or Hepatitis C Virus Entry and Replication into Hepatocytes. *PloS One*, *11*(4), e0154498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154498>
- Ramel, D., Gayral, S., Sarthou, M.-K., Augé, N., Nègre-Salvayre, A., & Laffargue, M. (2019). Immune and Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis : How to Target a Breaking Bad Dialogue? *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1276. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01276>
- Rashid, S., Tavori, H., Brown, P. E., Linton, M. F., He, J., Giunzioni, I., & Fazio, S. (2014). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms. *Circulation*, *130*(5), 431-441. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006720>
- Research, C. for D. E. and. (2021). FDA approves add-on therapy to lower cholesterol among certain high-risk adults. *FDA*. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-add-therapy-lower-cholesterol-among-certain-high-risk-adults>
- Ricci, C., Ruscica, M., Camera, M., Rossetti, L., Macchi, C., Colciago, A., Zanotti, I., Lupo, M. G., Adorni, M. P., Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Corsini, A., & Ferri, N. (2018). PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Scientific Reports*, *8*(1), 2267. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20425-x>
- Roslan, Z., Muhamad, M., Selvaratnam, L., & Ab-Rahim, S. (2019). The Roles of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins 5, 6, and 8 in Cancer : A Review. *Journal of Oncology*, *2019*, 4536302. <https://doi.org/10.1155/2019/4536302>
- Saavedra, Y. G. L., Zhang, J., & Seidah, N. G. (2013). PCSK9 prosegment chimera as novel inhibitors of LDLR degradation. *PloS One*, *8*(8), e72113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072113>
- Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott, S. D., Murphy, S. A., Kuder, J. F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S. M., Sever, P. S., Pedersen, T. R., & FOURIER Steering Committee and Investigators. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, *376*(18), 1713-1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615664>
- sanofi-aventis groupe. (s. d.). *Praluent—SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS*. EMA Europe. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/praluent-epar-product-information_en.pdf
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., & Masaki, T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, *386*(6620), 73-77. <https://doi.org/10.1038/386073a0>
- Scaldeferri, F., Pizzoferrato, M., Ponziani, F. R., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2013). Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Internal and Emergency Medicine*, *8*(3), 205-210. <https://doi.org/10.1007/s11739-011-0653-0>

Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J., & Lutgens, E. (2016). Atherosclerosis : The interplay between lipids and immune cells. *Current Opinion in Lipidology*, 27(3), 209-215. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000302>

Schlüter, K.-D., Wolf, A., & Schreckenber, R. (2020). Coming Back to Physiology : Extra Hepatic Functions of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Frontiers in Physiology*, 11, 598649. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.598649>

Schlüter, K.-D., Wolf, A., Weber, M., Schreckenber, R., & Schulz, R. (2017). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way. *Basic Research in Cardiology*, 112(6), 63. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0650-1>

Seftel, H. C., Baker, S. G., Jenkins, T., & Mendelsohn, D. (1989). Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews. *American Journal of Medical Genetics*, 34(4), 545-547. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320340418>

Seidah, N. G. (2021). The PCSK9 discovery, an inactive protease with varied functions in hypercholesterolemia, viral infections, and cancer. *Journal of Lipid Research*, 62, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100130>

Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., & Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 928-933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>

Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., Swiatlowska, P., Newman, A. A. C., Greene, E. S., Straub, A. C., Isakson, B., Randolph, G. J., & Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature Medicine*, 21(6), 628-637. <https://doi.org/10.1038/nm.3866>

Shapiro, M. D., & Fazio, S. (2017). PCSK9 and Atherosclerosis—Lipids and Beyond. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 24(5), 462-472. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17003>

Sharotri, V., Collier, D. M., Olson, D. R., Zhou, R., & Snyder, P. M. (2012). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19266-19274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363382>

Shen, H., Damcott, C. M., Rampersaud, E., Pollin, T. I., Horenstein, R. B., McArdle, P. F., Peyser, P. A., Bielak, L. F., Post, W. S., Chang, Y.-P. C., Ryan, K. A., Miller, M., Rumberger, J. A., Sheedy, P. F., Shelton, J., O'Connell, J. R., Shuldiner, A. R., & Mitchell, B. D. (2010). Familial Defective Apolipoprotein B-100 and Increased Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Calcification in the Old Order Amish. *Archives of internal medicine*, 170(20), 1850-1855. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.384>

Singh, T. D., Park, S.-Y., Bae, J., Yun, Y., Bae, Y.-C., Park, R.-W., & Kim, I.-S. (2010). MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid- β . *FEBS Letters*, 584(18), 3936-3942. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.050>

- Sjouke, B., Defesche, J. C., Hartgers, M. L., Wiegman, A., Roeters van Lennep, J. E., Kastelein, J. J., & Hovingh, G. K. (2016). Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. *Journal of Clinical Lipidology*, *10*(6), 1462-1469. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.09.003>
- Sjouke, B., Defesche, J. C., Randamie, J. S. E. de, Wiegman, A., Fouchier, S. W., & Hovingh, G. K. (2016). Sequencing for LIPA mutations in patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, *251*, 263-265. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.008>
- Solanas-Barca, M., de Castro-Orós, I., Mateo-Gallego, R., Cofán, M., Plana, N., Puzo, J., Burillo, E., Martín-Fuentes, P., Ros, E., Masana, L., Pocoví, M., Civeira, F., & Cenarro, A. (2012). Apolipoprotein E gene mutations in subjects with mixed hyperlipidemia and a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, *222*(2), 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.011>
- Son, N.-H., Basu, D., Samovski, D., Pietka, T. A., Peche, V. S., Willecke, F., Fang, X., Yu, S.-Q., Scerbo, D., Chang, H. R., Sun, F., Bagdasarov, S., Drosatos, K., Yeh, S. T., Mullick, A. E., Shoghi, K. I., Gumaste, N., Kim, K., Huggins, L.-A., ... Goldberg, I. J. (2018). Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(10), 4329-4342. <https://doi.org/10.1172/JCI99315>
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *15*(9), 1512-1531. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.9.1512>
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., Riddle, S. R., & Frid, M. G. (2013). The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology*, *75*, 23-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>
- Stoekenbroek, R. M., Lambert, G., Cariou, B., & Hovingh, G. K. (2018). Inhibiting PCSK9—Biology beyond LDL control. *Nature Reviews. Endocrinology*, *15*(1), 52-62. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0110-5>
- Sturm, A. C., Knowles, J. W., Gidding, S. S., Ahmad, Z. S., Ahmed, C. D., Ballantyne, C. M., Baum, S. J., Bourbon, M., Carrié, A., Cuchel, M., de Ferranti, S. D., Defesche, J. C., Freiburger, T., Hershberger, R. E., Hovingh, G. K., Karayan, L., Kastelein, J. J. P., Kindt, I., Lane, S. R., ... Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. (2018). Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, *72*(6), 662-680. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- Sun, X.-M., Eden, E. R., Tosi, I., Neuwirth, C. K., Wile, D., Naoumova, R. P., & Soutar, A. K. (2005). Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Human Molecular Genetics*, *14*(9), 1161-1169. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi128>

- Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications. *Circulation*, *116*(16), 1832-1844. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890>
- Tada, H., Kawashiri, M.-A., Nomura, A., Teramoto, R., Hosomichi, K., Nohara, A., Inazu, A., Mabuchi, H., Tajima, A., & Yamagishi, M. (2018). Oligogenic familial hypercholesterolemia, LDL cholesterol, and coronary artery disease. *Journal of Clinical Lipidology*, *12*(6), 1436-1444. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.08.006>
- Talmud, P. J., Shah, S., Whittall, R., Futema, M., Howard, P., Cooper, J. A., Harrison, S. C., Li, K., Drenos, F., Karpe, F., Neil, H. A. W., Descamps, O. S., Langenberg, C., Lench, N., Kivimaki, M., Whittaker, J., Hingorani, A. D., Kumari, M., & Humphries, S. E. (2013). Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: A case-control study. *Lancet (London, England)*, *381*(9874), 1293-1301. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62127-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62127-8)
- Tang, Z., Jiang, L., Peng, J., Ren, Z., Wei, D., Wu, C., Pan, L., Jiang, Z., & Liu, L. (2012). PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF- κ B activation in THP-1-derived macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, *30*(4), 931-938. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1072>
- Tatsuguchi, M., Furutani, M., Hinagata, J., Tanaka, T., Furutani, Y., Imamura, S., Kawana, M., Masaki, T., Kasanuki, H., Sawamura, T., & Matsuoka, R. (2003). Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *303*(1), 247-250. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00326-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00326-7)
- Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A. C., Stylianou, I. M., Koseki, M., Pirruccello, J. P., Ripatti, S., Chasman, D. I., Willer, C. J., Johansen, C. T., Fouchier, S. W., Isaacs, A., Peloso, G. M., Barbalic, M., Ricketts, S. L., Bis, J. C., Aulchenko, Y. S., Thorleifsson, G., ... Kathiresan, S. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, *466*(7307), 707-713. <https://doi.org/10.1038/nature09270>
- Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., & Shattuck, D. M. (2004). A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Human Genetics*, *114*(4), 349-353. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-1071-9>
- Toft-Nielsen, F., Emanuelsson, F., & Benn, M. (2022). Familial Hypercholesterolemia Prevalence Among Ethnicities-Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Genetics*, *13*, 840797. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.840797>
- Trabetti, E., Biscuola, M., Cavallari, U., Malerba, G., Girelli, D., Olivieri, O., Martinelli, N., Corrocher, R., & Pignatti, P. F. (2006). On the association of the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction or coronary artery disease. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *14*(1), 127-130. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201513>
- Troutt, J. S., Alborn, W. E., Cao, G., & Konrad, R. J. (2010). Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels. *Journal of Lipid Research*, *51*(2), 345-351. <https://doi.org/10.1194/jlr.M000620>

Tsai, C.-W., North, K. E., Tin, A., Haack, K., Franceschini, N., Saroja Voruganti, V., Laston, S., Zhang, Y., Best, L. G., MacCluer, J. W., Beaty, T. H., Navas-Acien, A., Kao, W. H. L., & Howard, B. V. (2015). Both rare and common variants in PCSK9 influence plasma low-density lipoprotein cholesterol level in American Indians. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(2), E345-349. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3340>

Umans-Eckenhausen, M. A., Defesche, J. C., Sijbrands, E. J., Scheerder, R. L., & Kastelein, J. J. (2001). Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Lancet (London, England)*, *357*(9251), 165-168. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03587-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03587-X)

van der Veen, J. N., van Dijk, T. H., Vrans, C. L. J., van Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., Tietge, U. J. F., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2009). Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-intestinal Excretion of Plasma Cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19211-19219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014860>

Varret, M., Rabès, J. P., Saint-Jore, B., Cenarro, A., Marinoni, J. C., Civeira, F., Devillers, M., Krempf, M., Coulon, M., Thiart, R., Kotze, M. J., Schmidt, H., Buzzi, J. C., Kostner, G. M., Bertolini, S., Pocovi, M., Rosa, A., Farnier, M., Martinez, M., ... Boileau, C. (1999). A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *American Journal of Human Genetics*, *64*(5), 1378-1387. <https://doi.org/10.1086/302370>

Vega, G. L., & Grundy, S. M. (1986). In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *The Journal of Clinical Investigation*, *78*(5), 1410-1414. <https://doi.org/10.1172/JCI112729>

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., & Schwartz, S. M. (2000). Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*(5), 1262-1275. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1262>

Vlachopoulos, C., Terentes-Printzios, D., Georgiopoulos, G., Skoumas, I., Koutagiar, I., Ioakeimidis, N., Stefanadis, C., & Tousoulis, D. (2016). Prediction of cardiovascular events with levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, *252*, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.922>

Vrablík, M., Ceska, R., & Horínek, A. (2001). Major apolipoprotein B-100 mutations in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Physiological Research*, *50*(4), 337-343.

Vrablik, M., Tichý, L., Freiberger, T., Blaha, V., Satny, M., & Hubacek, J. A. (2020). Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. *Frontiers in Genetics*, *11*, 574474. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.574474>

Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E., & Xu, Q. (2015). Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*, *593*(14), 3013-3030. <https://doi.org/10.1113/JP270033>

Wang, H., Hong, C. E., Lewis, J. P., Zhu, Y., Wang, X., Chu, X., Backman, J., Hu, Z., Yang, P., Still, C. D., Gerhard, G. S., & Fu, M. (2016). Effect of Two Lipoprotein (a)-Associated Genetic Variants on Plasminogen Levels and Fibrinolysis. *G3 (Bethesda, Md.)*, *6*(11), 3525-3532. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034702>

- Wardell, M. R., Rall, S. C., Schaefer, E. J., Kane, J. P., & Weisgraber, K. H. (1991). Two apolipoprotein E5 variants illustrate the importance of the position of additional positive charge on receptor-binding activity. *Journal of Lipid Research*, *32*(3), 521-528.
- Warden, B. A., Fazio, S., & Shapiro, M. D. (2020). The PCSK9 revolution : Current status, controversies, and future directions. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *30*(3), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.05.007>
- Wasteson, P., Johansson, B. R., Jukkola, T., Breuer, S., Akyürek, L. M., Partanen, J., & Lindahl, P. (2008). Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. *Development (Cambridge, England)*, *135*(10), 1823-1832. <https://doi.org/10.1242/dev.020958>
- Watts, G. F., Gidding, S. S., Mata, P., Pang, J., Sullivan, D. R., Yamashita, S., Raal, F. J., Santos, R. D., & Ray, K. K. (2020). Familial hypercholesterolaemia : Evolving knowledge for designing adaptive models of care. *Nature Reviews. Cardiology*, *17*(6), 360-377. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0325-8>
- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, *27*(4), 201-206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Webber, L. S., Srinivasan, S. R., Wattigney, W. A., & Berenson, G. S. (1991). Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood. The Bogalusa Heart Study. *American Journal of Epidemiology*, *133*(9), 884-899. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115968>
- Welty, F. K., Lichtenstein, A. H., Barrett, P. H., Dolnikowski, G. G., & Schaefer, E. J. (1999). Human apolipoprotein (Apo) B-48 and ApoB-100 kinetics with stable isotopes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *19*(12), 2966-2974. <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.12.2966>
- Whitfield, A. J., Barrett, P. H. R., van Bockxmeer, F. M., & Burnett, J. R. (2004). Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clinical Chemistry*, *50*(10), 1725-1732. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.038026>
- WHO | *Cardiovascular diseases (CVDs)*. (s. d.). World Health Organization. Consulté 7 mars 2017, à l'adresse <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- Wilkinson, K., & El Khoury, J. (2012). Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2012*, 489456. <https://doi.org/10.1155/2012/489456>
- Wilund, K. R., Yi, M., Campagna, F., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Ho, Y.-K., Garcia, J. V., Hobbs, H. H., & Cohen, J. C. (2002). Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Human Molecular Genetics*, *11*(24), 3019-3030.
- Wintjens, R., Bozon, D., Belabbas, K., MBou, F., Girardet, J.-P., Tounian, P., Jolly, M., Boccara, F., Cohen, A., Karsenty, A., Dubern, B., Carel, J.-C., Azar-Kolakez, A., Feillet, F., Labarthe, F., Gorsky, A.-M. C., Horovitz, A., Tamarindi, C., Kieffer, P., ... Dufernez, F. (2016). Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France [S]. *Journal of Lipid Research*, *57*(3), 482-491. <https://doi.org/10.1194/jlr.P055699>

Wu, D., Zhou, Y., Pan, Y., Li, C., Wang, Y., Chen, F., Chen, X., Yang, S., Zhou, Z., Liao, Y., & Qiu, Z. (2020). Vaccine Against PCSK9 Improved Renal Fibrosis by Regulating Fatty Acid β -Oxidation. *Journal of the American Heart Association*, 9(1), e014358. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014358>

Xia, X., Peng, Z., Gu, H., Wang, M., Wang, G., & Zhang, D. (2021). Regulation of PCSK9 Expression and Function: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 764038. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.764038>

Xie, W., Liu, J., Wang, W., Wang, M., Qi, Y., Zhao, F., Sun, J., Liu, J., Li, Y., & Zhao, D. (2016). Association between plasma PCSK9 levels and 10-year progression of carotid atherosclerosis beyond LDL-C: A cohort study. *International Journal of Cardiology*, 215, 293-298. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.103>

Yahagi, K., Kolodgie, F. D., Otsuka, F., Finn, A. V., Davis, H. R., Joner, M., & Virmani, R. (2016). Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nature Reviews. Cardiology*, 13(2), 79-98. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.164>

Yamamoto, N., Ikeda, H., Tandon, N. N., Herman, J., Tomiyama, Y., Mitani, T., Sekiguchi, S., Lipsky, R., Kralisz, U., & Jamieson, G. A. (1990). A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood*, 76(9), 1698-1703.

Yue, H., Febbraio, M., Klenotic, P. A., Kennedy, D. J., Wu, Y., Chen, S., Gohara, A. F., Li, O., Belcher, A., Kuang, B., McIntyre, T. M., Silverstein, R. L., & Li, W. (2019). CD36 Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Development of Neointimal Hyperplasia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(2), 263-275. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312186>

Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., Seidah, N. G., & Prat, A. (2008). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(2), 646-654. <https://doi.org/10.1002/hep.22354>

Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S. B., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*, 4(2), 178-201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>

Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T. A., Kinch, L., Grishin, N. V., Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2006). Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *American Journal of Human Genetics*, 79(3), 514-523. <https://doi.org/10.1086/507488>

Zimetti, F., Caffarra, P., Ronda, N., Favari, E., Adorni, M. P., Zanotti, I., Bernini, F., Barocco, F., Spallazzi, M., Galimberti, D., Ricci, C., Ruscica, M., Corsini, A., & Ferri, N. (2017). Increased PCSK9 Cerebrospinal Fluid Concentrations in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 55(1), 315-320. <https://doi.org/10.3233/JAD-160411>

ANNEXES

Article 4

Low circulating PCSK9 levels in LPL homozygous children with chylomicronemia syndrome in a Syrian refugee family in Lebanon

Carine Ayoub, **Yara Azar**, Dina Maddah, Youmna Ghaleb, Sandy Elbitar, Yara Abou-Khalil, Selim Jambart, Mathilde Varret, Catherine Boileau, Petra El Khoury and Marianne Abifadel

Front Genet. 2022 Aug 19; 13: 961028. doi: 10.3389/fgene.2022.961028.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Alberico Luigi Catapano,
University of Milan, Italy

REVIEWED BY
Mariko Harada-Shiba,
Osaka Medical and Pharmaceutical
University, Japan
Wenxin Song,
David Geffen School of Medicine, UCLA,
United States

*CORRESPONDENCE
Marianne Abifadel,
marianne.abifadel@usj.edu.lb

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Genetics of
Common and Rare Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

RECEIVED 03 June 2022
ACCEPTED 26 July 2022
PUBLISHED 19 August 2022

CITATION
Ayoub C, Azar Y, Maddah D, Ghaleb Y,
Elbitar S, Abou-Khalil Y, Jambart S,
Varret M, Boileau C, El Khoury P and
Abifadel M (2022), Low circulating
PCSK9 levels in LPL homozygous
children with chylomicronemia
syndrome in a syrian refugee family
in Lebanon.
Front. Genet. 13:961028.
doi: 10.3389/fgene.2022.961028

COPYRIGHT
© 2022 Ayoub, Azar, Maddah, Ghaleb,
Elbitar, Abou-Khalil, Jambart, Varret,
Boileau, El Khoury and Abifadel. This is
an open-access article distributed
under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Low circulating PCSK9 levels in LPL homozygous children with chylomicronemia syndrome in a syrian refugee family in Lebanon

Carine Ayoub¹, Yara Azar^{1,2}, Dina Maddah³, Youmna Ghaleb^{1,2},
Sandy Elbitar^{1,2}, Yara Abou-Khalil^{1,2}, Selim Jambart³,
Mathilde Varret², Catherine Boileau^{2,4}, Petra El Khoury^{1,2} and
Marianne Abifadel^{1,2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie- Santé, Saint Joseph University of Beirut, Beirut, Lebanon, ²Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), INSERM, Paris Cité University and Sorbonne Paris Nord University, Paris, France, ³Faculty of Medicine, Saint Joseph University of Beirut, Beirut, Lebanon, ⁴Genetic Department, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

Familial chylomicronemia syndrome is a rare autosomal recessive disorder of lipoprotein metabolism characterized by the presence of chylomicrons in fasting plasma and an important increase in plasma triglycerides (TG) levels that can exceed 22.58 mmol/l. The disease is associated with recurrent episodes of abdominal pain and pancreatitis, eruptive cutaneous xanthomatosis, lipemia retinalis, and hepatosplenomegaly. A consanguineous Syrian family who migrated to Lebanon was referred to our laboratory after perceiving familial chylomicronemia syndrome in two children. The *LPL* and *PCSK9* genes were sequenced and plasma PCSK9 levels were measured. Sanger sequencing of the *LPL* gene revealed the presence of the p.(Val227Phe) pathogenic variant in exon 5 at the homozygous state in the two affected children, and at the heterozygous state in the other recruited family members. Interestingly, PCSK9 levels in homozygous carriers of the p.(Val227Phe) were ≈50% lower than those in heterozygous carriers of the variant (p -value = 0.13) and ranged between the 5th and the 7.5th percentile of PCSK9 levels in a sample of Lebanese children of approximately the same age group. Moreover, this is the first reported case of individuals carrying simultaneously an *LPL* pathogenic variant and *PCSK9* variants, the L10 and L11 leucine insertion, which can lower and raise low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels respectively. TG levels fluctuated concomitantly between the two children, were especially high following the migration from a country to another, and were reduced under a low-fat diet. This case is crucial to raise public awareness on the risks of consanguineous marriages to decrease the emergence of inherited autosomal recessive diseases. It also highlights the importance of the early diagnosis and management of these diseases to prevent serious complications, such as recurrent pancreatitis in the case of familial hyperchylomicronemia.

KEYWORDS

chylomicronemia syndrome, type 1 hyperlipoproteinemia, LPL gene, triglycerides, Lebanon, Syria, PCSK9 levels

Introduction

Genetic rare diseases usually require special care that could be challenging and hardly achievable, especially in war crises or migration situations. This is the case of type I hyperlipoproteinemia (T1HLP).

T1HLP (OMIM 238600), also known as familial hyperchylomicronemia, familial lipoprotein lipase deficiency (Pingitore et al., 2016), or familial chylomicronemia syndrome (FCS) (Caddeo et al., 2018), is a rare autosomal recessive disorder of lipoprotein metabolism characterized by the presence of chylomicrons in fasting plasma and an important increase in plasma triglycerides (TG) levels that can exceed 2,000 mg/dl (22.58 mmol/l) (Burnett et al., 1993). This condition is associated with recurrent episodes of abdominal pain and pancreatitis, eruptive cutaneous xanthomatosis, lipemia retinalis, and hepatosplenomegaly (Brunzell and Deeb, 2019). Recurrent episodes of pancreatitis in these patients can affect the functions of the pancreas and can, in severe cases, lead to a multi-organ failure and an increase in morbidity and mortality (Regmi and Rehman, 2021). The prevalence of the disease in the general population is estimated to be one to two per million (Abifadel et al., 2004; Rodrigues et al., 2016), however, it is higher in some isolated ethnic groups (i.e., French Canadians, Afrikaner) (Gagné et al., 1989; Henderson et al., 1992; Foubert et al., 1996; Pingitore et al., 2016), and in populations with a high incidence of consanguinity. T1HLP is caused in most cases by loss-of-function variants in the lipoprotein lipase (*LPL*) gene (Langlois et al., 1989; Caddeo et al., 2018). The latter encodes a secreted protein that plays a crucial role in lipid metabolism and homeostasis through the hydrolysis of TG transported by TG-rich lipoproteins [very low-density lipoproteins (VLDL) and chylomicrons] to decrease plasma TG and generate free fatty acids that are either stored in the adipose tissue or oxidized by the muscles (Wion et al., 1987; Pingitore et al., 2016; Rodrigues et al., 2016). In rarer cases, T1HLP is caused by variants in the apolipoprotein C2 (*APOC2*) (Catapano and Capurso, 1986; Cox et al., 1988; Zanelli et al., 1994) and apolipoprotein A5 (*APOA5*) (Pennacchio and Rubin, 2003; Priore Oliva et al., 2005) genes encoding respectively ApoC2 and ApoA5 which are LPL activators, the glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (*GPIHBP1*) gene which encodes a protein that plays a role in the transport and binding of LPL to the endothelial cell wall and its entry into the capillaries (Beigneux et al., 2009; Davies et al., 2010; Song et al., 2022), and in the lipase maturation factor 1 (*LMF1*) gene encoding an endoplasmic reticulum membrane protein, that plays a role in the posttranslational folding, assembly and stabilization of active homodimerized LPL (Péterfy et al., 2007; Péterfy, 2012).

An early diagnosis of the disease is important in order to instore as early as possible a very low-fat diet consisting of reducing the

dietary fat to ≤ 20 g/day or 15% of the total daily energy intake to prevent abdominal pain and recurrent pancreatitis. The goal is to maintain plasma TG levels below 1,000 mg/dl (11.29 mmol/l). It is noted that recurrent abdominal pain is prevented when TG levels are maintained below 2,000 mg/dl (22.58 mmol/l) (Burnett et al., 1993). However, the compliance to the diet is usually poor (Caddeo et al., 2018), and its control is difficult, especially among migrants or low-income populations.

Interestingly, patients with chylomicronemia syndrome generally present low low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels besides high TG levels (Fojo and Brewer, 1992; Hegele, 2013; Blom et al., 2018; O'Dea et al., 2019). More recently, *PCSK9* has been identified as a major protagonist in lipid metabolism and familial hypercholesterolemia (FH) (Abifadel et al., 2003). Many studies have reported a potential correlation between plasma *PCSK9* levels and LDL-C, but also TG, VLDL-C, and intermediate-density lipoprotein cholesterol (IDL-C). Investigations linking these actors of the lipid pathway are being conducted (Lakoski et al., 2009; Druce et al., 2015; Norata et al., 2016; Baragetti et al., 2018; Warden et al., 2020).

In this article, we report the case of a consanguineous family of Syrian refugees in Lebanon with two children suffering from familial hyperchylomicronemia. To our knowledge, this is the first study to measure circulating *PCSK9* levels in familial hyperchylomicronemia and to identify individuals carrying simultaneously variants in the *LPL* and the *PCSK9* genes.

Materials and methods

Study participants

A Syrian family who migrated to Lebanon was referred to our laboratory upon perceiving familial hyperchylomicronemia in two children. The parents and four of their children were recruited. We collected the clinical history and anthropometric data for the recruited members. The parents signed the informed consent to participate with their children in our study. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hôtel Dieu de France Hospital and the Saint Joseph University of Beirut.

Laboratory and biochemical tests

Blood samples were obtained after overnight fasting, plasma, and serum were prepared and stocked at -80°C . Lipid measurements were determined on a COBAS INTEGRA[®]

analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Non-HDL-C was calculated by subtracting HDL-C from total cholesterol (TC).

DNA analysis and variant detection

Genomic DNAs of all the participants were extracted from peripheral blood leukocytes using the illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit according to the manufacturer's instructions. The exons and the flanking exon-intron boundaries of the *LPL* and *PCSK9* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced using the Sanger method. PCR conditions and primers' sequences are available upon request. For DNA sequence assembly and variant detection, the CodonCode Aligner® Software was used.

In silico analysis of the variant

The Genome Aggregation Database (gnomAD; <http://gnomad.broadinstitute.org/>) was used for frequency determination of the variant. The Polymorphism Phenotyping version 2 (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN; <http://provean.jcvi.org/index.php>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), and the Combined Annotation Dependent Depletion score (CADD score; <https://cadd.gs.washington.edu/snv>) were used to predict the pathogenicity of the variant.

PCSK9 measurements

We measured PCSK9 levels in the plasma of the recruited members using a commercial ELISA kit (Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 DuoSet catalog no. DY3888; R&D Systems, Minneapolis, MN, United States) and the Bio-Plex Pro assay technology (Luminex Corporation, Austin, TX, United States) as previously described (El Khoury et al., 2018).

Statistical analysis

The variables were analyzed using the GraphPad Prism version 9. Results for quantitative variables were expressed as median with its interquartile ranges (first quartile and third quartile). Spearman correlation was performed to measure the strength and direction of the linear relationship between PCSK9 and other quantitative variables. The Mann–Whitney U test was used to compare PCSK9 values between homozygous and heterozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant in the *LPL* gene.

Results

Clinical characteristics and biochemical analysis

In the recruited family, the parents were first-degree cousins and two of their six children suffered from familial hyperchylomicronemia confirmed by lipoprotein electrophoresis and later by genetic sequencing (Figure 1).

The proband (III.6) was a girl aged 6 years at the time of recruitment. She presented high TG levels (7.51 mmol/l) and low LDL-C and HDL-C levels (0.38 and 0.33 mmol/l respectively). At the age of 9 years, she was underweight with a BMI of 16.5 kg/m². She suffered from recurrent abdominal pain, vomiting, and diarrhea almost every week, and the echography showed that she presented splenomegaly. Infectious gastrointestinal causes were ruled out. She suffered as well from chronic anemia. Thalassemia was excluded by the normal results of hemoglobin electrophoresis. Mediterranean fever was suspected and the *MEFV* gene (NM_000243), responsible for the disease was studied by Sanger sequencing. Analysis of the exons and the flanking intronic regions did not reveal the presence of any pathogenic variant. However, this study does not preclude large deletions. Recently, she had an outbreak of the disease with TG levels reaching 54.33 mmol/l and they were rapidly reduced to 4.29 mmol/l following a very strict low-fat diet.

Her brother (III.5), aged 7 years at the time of recruitment, had TG levels fluctuating between 33.22 mmol/l for the highest value and 3.175 mmol/l for the lowest. At recruitment, he presented high TG levels (4.99 mmol/l) and low LDL-C and HDL-C levels (0.51 and 0.36 mmol/l respectively). At the age of 10 years, he was also underweight with a BMI of 14.6 kg/m². Clinically, he presented cutaneous xanthomatosis on his elbows and asthenia. He was diagnosed with splenomegaly consecutive to echography. He presented hemoglobin levels that fluctuated between normal and low. The normal results of hemoglobin electrophoresis allowed to rule out thalassemia. Recently, he presented moderately high levels of TG.

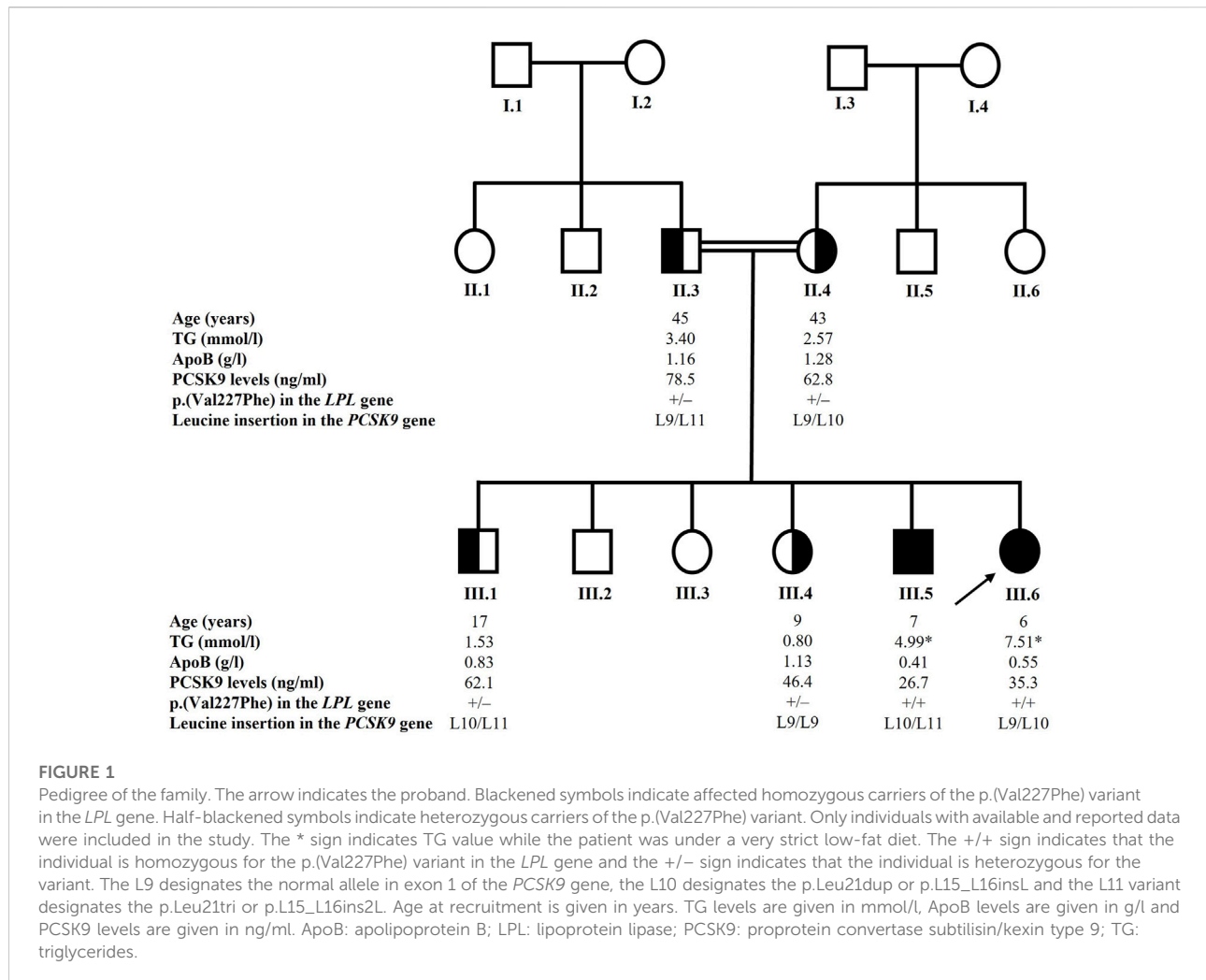
Curiously, TG levels fluctuated concomitantly between the two children and were especially high following the migration from a country to another. For example, the TG levels were the highest upon the arrival of the family to Lebanon, and then they were gradually reduced.

Both children were under fenofibrate but in a discontinuous way, omega 3, vitamin D, folic acid, iron, and a low-fat diet.

Two of their siblings (III.1 and III.4) presented normal TG and TC levels (Table 1). Their parents (II.3 and II.4) presented moderate hypertriglyceridemia according to the 2018 ACC/AHA classification (Table 1) (Grundy et al., 2019). The father aged 45 years was obese.

PCSK9 measurements

Patients with T1HLP generally present low LDL-C levels and HDL-C levels besides high TG levels (Fojo and Brewer,



1992; Hegele, 2013; Blom et al., 2018; O’Dea et al., 2019). Moreover, many studies have reported a potential correlation between plasma PCSK9 levels and LDL-C, but also triglycerides-rich lipoproteins and investigations linking these actors are being conducted (Lakoski et al., 2009; Druce et al., 2015; Norata et al., 2016; Baragetti et al., 2018; Warden et al., 2020). For these reasons, we measured plasma PCSK9 levels in the recruited members of the family. The results are presented in Table 1 and Figure 2. Homozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant (III.5 and III.6) presented a $\approx 50\%$ decrease in PCSK9 levels compared to heterozygous carriers (II.3, II.4, III.1, and III.4) [median with its interquartile ranges (first quartile–third quartile) of 31.00 (26.70–35.30) ng/ml versus 62.45 (50.33–74.58) ng/ml, respectively] without being significant (p -value = 0.13). Moreover, using Spearman correlation PCSK9 levels were positively correlated with age, ApoB levels and with BMI in all family members ($r = 0.94$, p -value = 0.017; $r = 0.89$, p -value = 0.033 and $r = 0.94$, p -value = 0.017, respectively).

Genetic analysis

We sequenced all the exons and the flanking exon-intron boundaries of the *LPL* gene knowing that most cases of T1HLP are caused by loss-of-function variations in it. Sequencing of this gene revealed the presence of the c.679G > T variation in exon 5 (NM_000237.3) at the homozygous state in both affected children (III.5 and III.6) (Figure 1). This nucleotide change causes a valine to phenylalanine substitution at position 227 of the amino acid chain [p.(Val227Phe)]. The parents (II.3 and II.4) and the two recruited siblings (III.1 and III.4) were heterozygous for the p.(Val227Phe) variation (Figure 1).

In silico analysis revealed that the amino acid valine at position 227 is well conserved among species. The variation is not present in the gnomAD database and was predicted to be disease-causing on Mutation Taster (Grantham Matrix score of 50), deleterious on PROVEAN (with a score of -4.549), with probably damaging consequences on the functionality of the protein according to Polyphen-2 (score of 0.960, sensitivity: 0.63;

TABLE 1 Lipid measurements and characteristics of the recruited members.

Subject	Age	Gender	BMI at recruitment	TC	TG	LDL-C	HDL-C	Non-HDL-C	ApoB	Plasma PCSK9 levels	p.(Val227Phe) variant in the LPL gene	Leucine insertion in the PCSK9 gene
			(kg/m ²)									
II.3	45	M	33.4	4.42	3.40	2.07	0.67	3.75	1.16	78.5	+/-	L9/L11
II.4	43	F	25.4	4.92	2.57	2.69	0.93	3.99	1.28	62.8	+/-	L9/L10
III.1	17	M	24.5	3.00	1.53	1.57	0.62	2.38	0.83	62.1	+/-	L10/L11
III.4	9	F	14.8	4.32	0.80	2.69	0.93	3.39	1.13	46.4	+/-	L9/L9
III.5	7	M	13.9	5.46	4.99*	0.51	0.36	5.10	0.41	26.7	+/+	L10/L11
III.6 [¥]	6	F	15.7	5.54	7.51*	0.38	0.33	5.21	0.55	35.3	+/+	L9/L10

[¥]sign indicates the proband.

*sign indicates TG value while the patient was under a very strict low-fat diet.

The +/- sign indicates that the individual is heterozygous for the p.(Val227Phe) variant in the LPL gene and the +/- sign indicates that the individual is heterozygous for the variant. The L10 designates the p.Leu21dup or p.L15_L16insL in the PCSK9 gene and the L11 variant designates the p.Leu21tri or p.L15_L16ins2L.

Age at recruitment is given in years. BMI, is given in kg/m². TC, TG, LDL-C, HDL-C, and non-HDL-C levels are given in mmol/l, ApoB levels are given in g/l and PCSK9 levels are given in ng/ml.

ApoB, apolipoprotein B; F, female; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LPL, lipoprotein lipase; M, male; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Non-HDL-C, non high-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides.

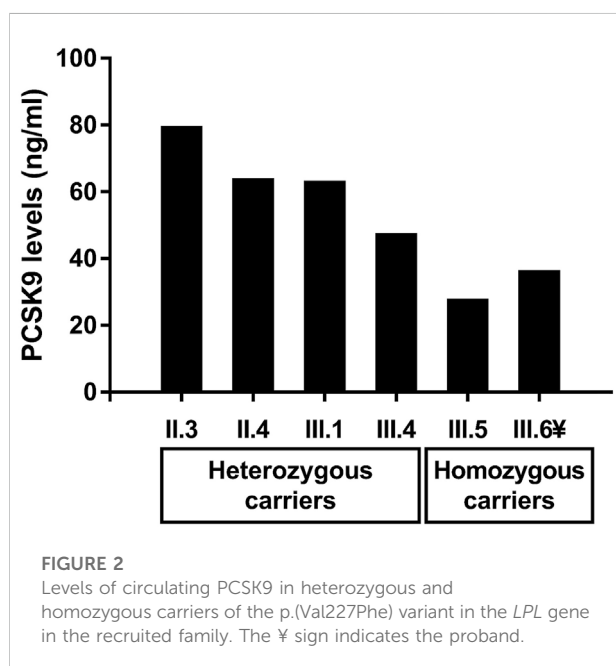


FIGURE 2

Levels of circulating PCSK9 in heterozygous and homozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant in the LPL gene in the recruited family. The ¥ sign indicates the proband.

specificity: 0.92), and presented a CADD score of 25.8 suggesting that this variant is predicted to be among the top 1% of the most deleterious variants in the human genome.

Interestingly, another LPL variant in the same codon (p.Val227Ala) was also reported to be responsible for T1HLP (Maruyama et al., 2004; Caddeo et al., 2018).

We also sequenced the PCSK9 gene to investigate the presence of an eventual variant that might explain the low levels of PCSK9 observed in some individuals of the family.

The sequencing revealed the presence of two types of variations in exon 1 of the PCSK9 gene: the leucine insertion L10 also designated p.Leu21dup or p.L15_L16insL and the leucine insertion L11 also designated p.Leu21tri or p.L15_L16ins2L (Abifadel et al., 2008). The father (II.3) was heterozygous for the L11 variation while the mother (II.4) and one of the affected children (III.6) were heterozygous for the L10 variation. One child (III.4) carried the normal L9 alleles, and two children (III.1 and III.5) were compound heterozygotes for the L10 and L11 alleles. The results are presented in Figure 1.

Discussion

The p.(Val227Phe) pathogenic variant has been recently reported by Caddeo et al. (2018) in a University Hospital in Gothenburg (Sweden) at the homozygous state in a proband aged 29 years who presented a mean TG level of 18.7 ± 3.2 mmol/l and recurrent pancreatitis episodes. His brother also carried the pathogenic variant. They have likely migrated from the Middle East to Sweden where the center received migrants from Syria and Iran (Caddeo et al., 2018). Functional studies demonstrated the pathogenicity of the p.(Val227Phe) loss-of-function variant. These studies suggested that this variant affects protein production and secretion, but not its degradation. Results showed that the transfection of the HEK 293T/17 cells with the p.(Val227Phe) variant caused a reduction in protein synthesis by 35%–40% and a decrease by at least 80% in the secretion of the LPL in the media of these cells compared to the wild type LPL. Moreover, LPL enzymatic assay showed that LPL activity was absent in the media of the cells transfected with the

variant. It is noteworthy that there was no difference in the intracellular degradation rate between the wild type and the mutant *LPL* transfected cells (Caddeo et al., 2018).

We identified the p.(Val227Phe) variant in the *LPL* gene causing T1HLP in a consanguineous Syrian family who migrated to Lebanon. Indeed, this is the first study to measure PCSK9 levels in T1HLP. In this family, homozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant presented lower levels of PCSK9 than heterozygous carriers [median (first quartile–third quartile) of 31.00 (26.70–35.30) ng/ml versus 62.45 (50.33–74.58) ng/ml, respectively]. PCSK9 levels were positively correlated with age, ApoB levels and with BMI in all family members (p -values = 0.017, 0.033, and 0.017 respectively). Compared to a cohort of 279 Lebanese children of approximately the same age group (8–11 years) in whom PCSK9 levels were measured using the same method [median (first-third quartile) of 64.30 (46.95–93.38) ng/ml] (Azar et al., 2022), the two homozygous children (III.5 and III.6) presented PCSK9 levels that were approximately between the fifth (30.40 ng/ml) and the 7.5th percentile (33.25 ng/ml) of PCSK9 levels in the group, while their heterozygous sibling (III.4) presented PCSK9 levels (46.40 ng/ml) that were approximately within the 25th percentile (46.95 ng/ml). The sibling (III.1) presented PCSK9 levels of 62.1 ng/ml, which is normal compared to a group of 159 Lebanese adolescents aged 15–18 years [median (first-third quartile) of 60.55 (44.51–93.96) ng/ml] (Azar et al., 2022). The presence of loss-of-function variants in the *PCSK9* gene has been studied by sequencing the whole gene. Interestingly, this is the first report of a family with an *LPL* pathogenic variant also carrying variants in *PCSK9*, more precisely two types of leucine insertion variants in the exon 1 of the *PCSK9* gene (Table 1). These polymorphisms occur in the signal peptide region of the PCSK9 protein and are characterized by the insertion of one or two leucines into a stretch of nine leucines (Chen et al., 2005; Yue et al., 2006; Abifadel et al., 2008). They might lead to a structural change in the signal peptide causing an impairment in its cleavage and processing in the endoplasmic reticulum (Yue et al., 2006; Pisciotta et al., 2012; Benito-Vicente et al., 2022). In a study conducted on 1,745 apparently healthy individuals, plasma PCSK9 levels were significantly lower in individuals carrying a leucine insertion in exon 1 of the *PCSK9* gene (Awan et al., 2013). Moreover, the insertion of two leucines in the signal peptide has been reported in a family with familial combined hyperlipidemia and two patients with FH (Abifadel et al., 2008) and *in vitro* studies have shown that it causes a reduction in the secretion of the mature form of PCSK9 compared to the wild type PCSK9 (Benito-Vicente et al., 2022). However, these variations might not alone explain the very low levels of PCSK9 observed in homozygous carriers of the *LPL* variant in our study.

Moreover, homozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant in this family presented low levels of LDL-C and HDL-C. This

was also observed in the study conducted by Caddeo et al. (2018), as well as in patients suffering from T1HLP described in the literature (O'Dea et al., 2019; Susheela et al., 2021). The low levels of LDL-C in our studied family cannot be explained by the presence of the leucine insertions in the signal peptide of PCSK9. On one hand, the leucine insertion L10 also designated p.Leu21dup or p.L15_L16insL is a common variation associated with lower levels of LDL-C in populations with normal to low LDL-C levels, but also in patients suffering from FH carrying the same p.(Cys681X) mutation in the LDL receptor (*LDLR*) gene (Abifadel et al., 2009). On the other hand, the leucine insertion L11 also designated p.Leu21tri or p.L15_L16ins2L is a rare variant that has been associated with familial combined hyperlipidemia and was found at a low frequency in subjects presenting LDL-C levels of 2.96–4.90 mmol/L and coronary lesions in the American population (Chen et al., 2005; Abifadel et al., 2008; Benito-Vicente et al., 2022). In fact, low levels of LDL-C and HDL-C in T1HLP may be explained by the disruption in the activity of the LPL (Hegele et al., 2018). Variations in LPL activity in humans result in changes in lipoproteins metabolism (Goldberg et al., 1990). Indeed, low or absent activity of LPL results in an impairment in the conversion of TG-rich particles to their remnant lipoproteins, including chylomicron remnants, VLDL, VLDL remnants, intermediate density lipoprotein and LDL. The subsequent decrease in the available cholesterol from VLDL, LDL, and peripheral tissues causes a decrease in HDL-C levels (Hegele et al., 2018). Other studies attribute the low levels of LDL-C and HDL-C to an increase in their catabolism, besides the decrease in their synthesis (Fojo and Brewer, 1992). Interestingly, the low levels of LDL-C might explain the observed low levels of plasma PCSK9. In fact, many studies have shown a positive correlation between circulating plasma PCSK9 and LDL-C (Shapiro et al., 2019). It is suggested that this correlation is due to the fact that PCSK9 acts as an important regulator of LDL metabolism through targeting the LDLR for lysosomal degradation, but also due to a direct interaction between PCSK9 and LDL (Abifadel et al., 2010; Tavori et al., 2015). Further studies of PCSK9 levels in patients with hyperchylomicronemia would be interesting in order to verify if all homozygous patients with T1HLP have low PCSK9 levels, or if it is specific to the patients in the studied family, and to decipher the causes of this decrease, as well as the mechanism, the role of PCSK9, and its correlation with ApoB levels (Ayoub et al., 2021).

It is noteworthy that anemia has been described as a clinical sign of T1HLP that occurs in some cases (Rahalkar and Hegele, 2008; Brahm and Hegele, 2013). In a case series of infants with T1HLP, 7 out of 16 infants presented normocytic anemia which cause was unknown, and both males and females were affected (Feoli-Fonseca et al., 1998). In another study conducted to determine the phenotype-genotype relationships between different subgroups of T1HLP, all the female participants ($n = 7$) suffered from anemia (Chokshi et al., 2014).

TABLE 2 Summary of the described variations in the *LPL* gene in the Middle East and the Mediterranean regions.

Region	Amino acid variation in the <i>LPL</i> gene according to the article	Case presentation	References
Lebanon, 2004	Homozygous for the p.(Asp174Val)/p.(Asp201Val) variant (according to the original/present nomenclature)	A 34-year-old male with TG levels of 34.3 mmol/l lowered to 6.37 mmol/l under medication and a low-fat diet. A 7-year-old boy with a TG peak of 30.45 mmol/l during an episode of pancreatitis and recurrent abdominal pain since 3 years old	Abifadel et al. (2004)
Greece, 2004	Compound heterozygous for the p.(Gly188Glu) and p.(Met301Arg) variants (according to the original nomenclature)	A 32-day-old girl with TG levels of 169.3 mmol/l at the time of admission to the hospital and rapidly lowered to 11.2 mmol/l 10 days after the administration of medium-chain triglycerides enriched milk	Kavazarakis et al. (2004)
Middle East, 2013	Homozygous for the p.(Arg270His) variant (according to the present nomenclature)	A 2-month-old Arab infant with a TG peak of 276.6 mmol/l rapidly lowered to 4.93 mmol/l at the time of discharge from the hospital after the administration of a medium-chain triglycerides-rich diet.	Hegele et al. (2018)
Morocco, 2015	Homozygous for the p.(Ser286Arg) variant (according to the present nomenclature)	A 19-year-old girl with TG levels of 199 mmol/l lowered to 14.15 mmol/l 2 months after the administration of an appropriate diet, a maximal dose of fenofibrate and simvastatin along with heparin and insulin	Bouabdellah et al. (2015)
Middle East, 2016	(p.Gly256Thrfs*26) (according to the present nomenclature) (p.Met404Arg) (according to the present nomenclature)	A 19-year-old female with TG levels of 60.7 ± 7 mmol/l and a 32-year-old male with TG levels of 31.7 ± 7.8 mmol/l A 28-year-old male with TG levels of 45 ± 26.9 mmol/l	Pingitore et al. (2016)
Some of them from the Middle East, 2017	Compound heterozygous for the p.(Trp113Arg), the p.(Gly215Glu), and the p.(Met404Arg) variants (according to the present nomenclature) Heterozygous for the p.(Ser220Arg) variant (according to the present nomenclature) Homozygous for the p.(Val227Phe) variant (according to the present nomenclature)	A 49-year-old female with TG levels of 39.7 ± 13.6 mmol/l A 69-year-old male with TG levels of 19.6 ± 9.4 mmol/l A 29-year-old male with TG levels of 18.7 ± 3.2 mmol/l	Caddeo et al. (2018) Caddeo et al. (2018) Caddeo et al. (2018)

The original nomenclature considers the amino acid numbering of the mature protein [without the signal peptide of 27 amino acids (Deeb and Peng, 1989)], while the present international nomenclature considers the initiator methionine as the first amino acid of the *LPL* (NP_000228.1).

Although the parents (II.3 and II.4) were heterozygous carriers of the p.(Val227Phe) variant, they presented moderately high levels of TG. The phenotypic expression of heterozygous *LPL* deficiency is not clinically and biochemically well described yet. It has been reported that heterozygous carriers of one defective allele in the *LPL* gene do not present chylomicronemia nor other manifestations of the disease. They may present normal or moderately increased fasting TG levels, especially when fed a high-calorie, high-fat diet (Miesenböck et al., 1993; Hölzl et al., 2000; Abifadel et al., 2004). The presence of precipitating factors such as age, obesity, pregnancy, hyperinsulinemia, and lipid-raising drugs would contribute to the phenotypic expression of heterozygous *LPL* deficiency (Wilson et al., 1990; Abifadel et al., 2004).

The identification of heterozygous carriers of an *LPL* mutation is of major importance, especially in countries with a high frequency of consanguineous marriages (Abifadel et al., 2004). It is also necessary for the prevention of precipitating factors knowing that the lipoprotein phenotype in heterozygous carriers of a defective *LPL* allele has been considered atherogenic

(Reymer et al., 1995; Bijvoet et al., 1996; Wittrup et al., 1997; Hölzl et al., 2000).

The high prevalence of consanguineous marriages in Middle Eastern countries increases the risk of autosomal recessive genetic diseases (Al-Herz and Al-Mousa, 2013) such as hyperchylomicronemia.

A study conducted to determine the prevalence of consanguineous marriages in Syria showed that the overall frequency was 30.3% in urban areas and 39.8% in rural ones, with an overall rate of 35.4%. In some provinces, the frequency could reach 67.5%. Among this type of marriage, first cousins' marriages were the most common with a rate of 20.9% (Othman and Saadat, 2009). It is noteworthy that the natality rate increases in refugees' camps or migrant populations, as well as the risk of consanguineous marriages.

To date, more than 200 pathogenic variants in the *LPL* gene have been reported to cause T1HLP (Caddeo et al., 2018). However, rare cases have been described in the Middle East and the Mediterranean regions. A summary of the described mutations in this region is presented in Table 2.

Conclusion

This is the first study to measure plasma PCSK9 levels in T1HLP. We found that homozygous affected patients presented low levels of PCSK9 compared to heterozygous non-affected members of the family and to children from the same age group. Further studies of PCSK9 levels in patients with hyperchylomicronemia would be interesting in order to verify if all homozygous patients with T1HLP have low PCSK9 levels. This would help decipher the causes of this decrease, as well as the mechanism and the role of PCSK9 in this disease. It might also be interesting to elucidate pathways linking PCSK9 to apolipoprotein B or eventually to triglycerides-rich lipoproteins metabolism.

The identification of the same mutation in the *LPL* gene in two distinct families with T1HLP originated most probably from the same region in Syria and that migrated to either Lebanon or Sweden, should lead us to search for this mutation as the first cause of hyperchylomicronemia in patients originated from Syria. A founder effect could be hypothesized but needs further investigation and cases to be confirmed.

Public awareness and education concerning the medical risks of consanguineous marriages are important and should be included in the international effort and politics that provide care, birth control, and genetic counseling when needed. They might help in decreasing the emergence of inherited autosomal recessive diseases.

Finally, handling a metabolic disease that needs specific care and compliance to a drastic regimen or treatment to prevent some fatal complications is not easy, especially in a crisis. The main solution is to prevent the emergence of these diseases by raising awareness of the risks of consanguineous marriages.

It is more and more urgent to address genetic lipid disorders and more generally genetic diseases that need special treatment, diagnosis, management, and prevention especially in refugee populations or in war or economic crisis countries.

Data availability statement

The datasets for this article are not publicly available due to concerns regarding participant/patient anonymity. Requests to access the datasets should be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the ethics committee of the Hôtel Dieu de France Hospital and the Saint Joseph University of Beirut. Written

informed consent to participate in this study was provided by the participants or by the participants' legal guardian/next of kin for children.

Author contributions

Conceptualization: MA, PE, and SJ; methodology: CA, YA, YA-K, YG, SE, PE, and MA; investigation: DM; writing—original draft preparation: CA, YA, YA-K, YG, SE, PE, and MA; writing—review and editing: CA, PE, SE, YG, YA, YA-K, MV, CB, and MA; supervision: MA and PE; funding acquisition: MA, MV, and CB. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Program franco-libanais CEDRE. This work was also supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Carine Ayoub and Yara Azar are supported by grants from Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon; Carine Ayoub is granted by "Bourses de Séjour Scientifiques de Haut Niveau (SSHN-2022)" from l'Ambassade de France/Institut français du Liban. Youmna Ghaleb was supported by a grant by the International Atherosclerosis Society (IAS).

Acknowledgments

We thank all the family members for participating in this study.

Conflict of interest

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

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Abifadel, M., Bernier, L., Dubuc, G., Nuel, G., Rabès, J.-P., Bonneau, J., et al. (2008). A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidaemia. *J. Med. Genet.* 45, 780–786. doi:10.1136/jmg.2008.059980
- Abifadel, M., Jambart, S., Allard, D., Rabès, J.-P., Varret, M., Derré, A., et al. (2004). Identification of the first Lebanese mutation in the LPL gene and description of a rapid detection method. *Clin. Genet.* 65, 158–161. doi:10.1111/j.0009-9163.2004.00205.x
- Abifadel, M., Pakradouni, J., Collin, M., Samson-Bouma, M.-E., Varret, M., Rabès, J.-P., et al. (2010). Strategies for proprotein convertase subtilisin kexin 9 modulation: a perspective on recent patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* 20, 1547–1571. doi:10.1517/13543776.2010.518615
- Abifadel, M., Rabès, J.-P., Jambart, S., Halaby, G., Gannagé-Yared, M.-H., Sarkis, A., et al. (2009). The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Lebanon: spectrum of LDLR mutations and role of PCSK9 as a modifier gene. *Hum. Mutat.* 30, E682–E691. doi:10.1002/humu.21002
- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34, 154–156. doi:10.1038/ng1161
- Al-Herz, W., and Al-Mousa, H. (2013). Combined immunodeficiency: the Middle East experience. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 658–660. doi:10.1016/j.jaci.2012.11.033
- Awan, Z., Delvin, E. E., Levy, E., Genest, J., Davignon, J., Seidah, N. G., et al. (2013). Regional distribution and metabolic effect of PCSK9 insLEU and R46L gene mutations and apoE genotype. *Can. J. Cardiol.* 29, 927–933. doi:10.1016/j.cjca.2013.03.004
- Ayoub, C., Azar, Y., Abou-Khalil, Y., Ghaleb, Y., Elbitar, S., Halaby, G., et al. (2021). Identification of a variant in APOB gene as a major cause of hypobetalipoproteinemia in Lebanese families. *Metabolites* 11, 564. doi:10.3390/metabo11090564
- Azar, Y., Gannagé-Yared, M.-H., Naous, E., Ayoub, C., Abou Khalil, Y., Chahine, E., et al. (2022). Circulating PCSK9 linked to dyslipidemia in Lebanese schoolchildren. *Metabolites* 12, 504. doi:10.3390/metabo12060504
- Baragetti, A., Grejtakova, D., Casula, M., Olmastroni, E., Jotti, G. S., Norata, G. D., et al. (2018). Proprotein Convertase Subtilisin-Kexin type-9 (PCSK9) and triglyceride-rich lipoprotein metabolism: facts and gaps. *Pharmacol. Res.* 130, 1–11. doi:10.1016/j.phrs.2018.01.025
- Beigneux, A. P., Franssen, R., Bensadoun, A., Gin, P., Melford, K., Peter, J., et al. (2009). Chylomicronemia with a mutant GPIIb/IIIa (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 956–962. doi:10.1161/ATVBAHA.109.186577
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Larrea-Sebal, A., Palacios, L., Cenarro, A., Calle, X., et al. (2022). Leu22_Leu23 duplication at the signal peptide of PCSK9 promotes intracellular degradation of LDLR and autosomal dominant hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 42, e203–e216. doi:10.1161/ATVBAHA.122.315499
- Bijvoet, S., Gagné, S. E., Moorjani, S., Gagné, C., Henderson, H. E., Fruchart, J. C., et al. (1996). Alterations in plasma lipoproteins and apolipoproteins before the age of 40 in heterozygotes for lipoprotein lipase deficiency. *J. Lipid Res.* 37, 640–650. doi:10.1016/S0022-2275(20)37605-7
- Blom, D. J., O'Dea, L., Digenio, A., Alexander, V. J., Karwowska-Prokopczuk, E., Williams, K. R., et al. (2018). Characterizing familial chylomicronemia syndrome: baseline data of the APPROACH study. *J. Clin. Lipidol.* 12, 1234–1243. e5. doi:10.1016/j.jacl.2018.05.013
- Bouabdellah, M., Iraqi, H., Benlian, P., Berqia, I., Benchekroun, L., Chraïbi, A., et al. (2015). Familial hypertriglyceridemia: biochemical, clinical and molecular study in a Moroccan family. *Ann. Biol. Clin.* 73, 474–484. doi:10.1684/abc.2015.1058
- Brahm, A., and Hegele, R. A. (2013). Hypertriglyceridemia. *Nutrients* 5, 981–1001. doi:10.3390/nu5030981
- Brunzell, J. D., and Deeb, S. S. (2019). “Familial lipoprotein lipase deficiency, apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency,” in *The online metabolic and molecular bases of inherited disease*. Editors D. L. Valle, S. Antonarakis, A. Ballabio, A. L. Beaudet, and G. A. Mitchell (New York, NY: McGraw-Hill Education). Available at: <https://www.ombid.mhmedical.com/content.aspx?aid=1181449576> (Accessed June 3, 2022).
- Burnett, J. R., Hooper, A. J., and Hegele, R. A. (1993). “Familial lipoprotein lipase deficiency,” in *GeneReviews*®. M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, and K. Stephens. Editors (Seattle (WA): University of Washington, Seattle). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/> (Accessed September 18, 2019).
- Caddeo, A., Mancina, R. M., Pirazzi, C., Russo, C., Sasidharan, K., Sandstedt, J., et al. (2018). Molecular analysis of three known and one novel LPL variants in patients with type I hyperlipoproteinemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 28, 158–164. doi:10.1016/j.numecd.2017.11.003
- Catapano, A. L., and Capurso, A. (1986). “Apolipoprotein C-II deficiency,” in *Human apolipoprotein mutants: impact on atherosclerosis and longevity NATO ASI series*. Editors C. R. Sirtori, A. V. Nichols, and G. Franceschini (Boston, MA: Springer US), 187–195. doi:10.1007/978-1-4615-9474-1_22
- Chen, S. N., Ballantyne, C. M., Gotto, A. M., Tan, Y., Willerson, J. T., and Marian, A. J. (2005). A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1611–1619. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.051
- Chokshi, N., Blumenschein, S. D., Ahmad, Z., and Garg, A. (2014). Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Lipidol.* 8, 287–295. doi:10.1016/j.jacl.2014.02.006
- Cox, D. W., Wills, D. E., Quan, F., and Ray, P. N. (1988). A deletion of one nucleotide results in functional deficiency of apolipoprotein CII (apo CII Toronto). *J. Med. Genet.* 25, 649–652. doi:10.1136/jmg.25.10.649
- Davies, B. S. J., Beigneux, A. P., Barnes, R. H., Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M. M., et al. (2010). GPIIb/IIIa is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* 12, 42–52. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.016
- Deeb, S. S., and Peng, R. L. (1989). Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 28, 4131–4135. doi:10.1021/bi00436a001
- Druce, I., Abujrad, H., and Ooi, T. C. (2015). PCSK9 and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *J. Biomed. Res.* 29, 429–436. doi:10.7555/JBR.29.20150052
- El Khoury, P., Roussel, R., Fumeron, F., Abou-Khalil, Y., Velho, G., Mohammedi, K., et al. (2018). Plasma proprotein-convertase-subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 943–953. doi:10.1111/dom.13181
- Feoli-Fonseca, J. C., Lévy, E., Godard, M., and Lambert, M. (1998). Familial lipoprotein lipase deficiency in infancy: clinical, biochemical, and molecular study. *J. Pediatr.* 133, 417–423. doi:10.1016/S0022-3476(98)70280-X
- Fojo, S. S., and Brewer, H. B. (1992). Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J. Intern. Med.* 231, 669–677. doi:10.1111/j.1365-2796.1992.tb01256.x
- Foubert, L., Benlian, P., and Turpin, G. (1996). Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme in lipoprotein metabolism. *Presse Med.* 25, 207–210.
- Gagné, C., Brun, L. D., Julien, P., Moorjani, S., and Lupien, P. J. (1989). Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of a French Canadian population. *CMAJ* 140, 405–411.
- Goldberg, I. J., Blaner, W. S., Vanni, T. M., Moukides, M., and Ramakrishnan, R. (1990). Role of lipoprotein lipase in the regulation of high density lipoprotein apolipoprotein metabolism. Studies in normal and lipoprotein lipase-inhibited monkeys. *J. Clin. Invest.* 86, 463–473. doi:10.1172/JCI114732
- Grundy, S. M., Stone, N. J., Bailey, A. L., Beam, C., Birtcher, K. K., Blumenthal, R. S., et al. (2019). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines. *Circulation* 139, e1082–e1143. doi:10.1161/CIR.0000000000000625
- Hegele, R. A., Berberich, A. J., Ban, M. R., Wang, J., Digenio, A., Alexander, V. J., et al. (2018). Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J. Clin. Lipidol.* 12, 920–927. e4. doi:10.1016/j.jacl.2018.03.093
- Hegele, R. A. (2013). “Chapter 96 - lipoprotein and lipid metabolism,” in *Emery and rimoin's principles and practice of medical genetics*. Editors D. Rimoin, R. Pyeritz, and B. Korf. Sixth Edition (Oxford: Academic Press), 1–33. doi:10.1016/B978-0-12-383834-6.00100-2
- Henderson, H. E., Hassan, F., Berger, G. M., and Hayden, M. R. (1992). The lipoprotein lipase gly188----glu mutation in South Africans of Indian descent: evidence suggesting common origins and an increased frequency. *J. Med. Genet.* 29, 119–122. doi:10.1136/jmg.29.2.119
- Hözl, B., Kraft, H. G., Wiebusch, H., Sandhofer, A., Patsch, J., Sandhofer, F., et al. (2000). Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker D1S104 on chromosome 1q21-q23. *J. Lipid Res.* 41, 734–741. doi:10.1016/s0022-2275(20)32382-8
- Kavazarakis, E., Stabouli, S., Gourgiotis, D., Roumeliotou, K., Traeger-Synodinos, J., Bossios, A., et al. (2004). Severe hypertriglyceridaemia in a Greek infant: a clinical,

- biochemical and genetic study. *Eur. J. Pediatr.* 163, 462–466. doi:10.1007/s00431-004-1474-1
- Lakoski, S. G., Lagace, T. A., Cohen, J. C., Horton, J. D., and Hobbs, H. H. (2009). Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2537–2543. doi:10.1210/jc.2009-0141
- Langlois, S., Deeb, S., Brunzell, J. D., Kastelein, J. J., and Hayden, M. R. (1989). A major insertion accounts for a significant proportion of mutations underlying human lipoprotein lipase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 948–952. doi:10.1073/pnas.86.3.948
- Maruyama, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., Bujo, H., Takahashi, K., Saito, Y., et al. (2004). Mutations in Japanese subjects with primary hyperlipidemia—results from the research committee of the ministry of health and welfare of Japan since 1996—. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 131–145. doi:10.5551/jat.11.131
- Miesenböck, G., Hölzl, B., Föger, B., Brandstätter, E., Paulweber, B., Sandhofer, F., et al. (1993). Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J. Clin. Invest.* 91, 448–455. doi:10.1172/JCI116222
- Norata, G. D., Tavori, H., Pirillo, A., Fazio, S., and Catapano, A. L. (2016). Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc. Res.* 112, 429–442. doi:10.1093/cvr/cvw194
- O'Dea, L. S. L., MacDougall, J., Alexander, V. J., Digenio, A., Hubbard, B., Arca, M., et al. (2019). Differentiating familial chylomicronemia syndrome from multifactorial severe hypertriglyceridemia by clinical profiles. *J. Endocr. Soc.* 3, 2397–2410. doi:10.1210/je.2019-00214
- Othman, H., and Saadat, M. (2009). Prevalence of consanguineous marriages in Syria. *J. Biosoc. Sci.* 41, 685–692. doi:10.1017/S0021932009003411
- Pennacchio, L. A., and Rubin, E. M. (2003). Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 529–534. doi:10.1161/01.ATV.0000054194.78240.45
- Péterfy, M., Ben-Zeev, O., Mao, H. Z., Weissglas-Volkov, D., Aouizerat, B. E., Pullinger, C. R., et al. (2007). Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat. Genet.* 39, 1483–1487. doi:10.1038/ng.2007.24
- Péterfy, M. (2012). Lipase maturation factor 1: A lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 790–794. doi:10.1016/j.bbali.2011.10.006
- Pingitore, P., Lepore, S. M., Pirazzi, C., Mancina, R. M., Motta, B. M., Valenti, L., et al. (2016). Identification and characterization of two novel mutations in the LPL gene causing type I hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Lipidol.* 10, 816–823. doi:10.1016/j.jacl.2016.02.015
- Pisciotta, L., Sallo, R., Rabacchi, C., Wunsch, A., Calandra, S., and Bertolini, S. (2012). Leucine 10 allelic variant in signal peptide of PCSK9 increases the LDL cholesterol-lowering effect of statins in patients with familial hypercholesterolaemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22, 831–835. doi:10.1016/j.numecd.2011.04.003
- Priore Oliva, C., Pisciotta, L., Li Volti, G., Sambataro, M. P., Cantafora, A., Bellocchio, A., et al. (2005). Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 411–417. doi:10.1161/01.ATV.0000153087.36428.dd
- Rahalkar, A. R., and Hegele, R. A. (2008). Monogenic pediatric dyslipidemias: classification, genetics and clinical spectrum. *Mol. Genet. Metab.* 93, 282–294. doi:10.1016/j.ymgme.2007.10.007
- Regmi, M., and Rehman, A. (2021). Familial hyperchylomicronemia syndrome. StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551655/> (Accessed June 1, 2022).
- Reymer, P. W., Gagné, E., Groenemeyer, B. E., Zhang, H., Forsyth, I., Jansen, H., et al. (1995). A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nat. Genet.* 10, 28–34. doi:10.1038/ng0595-28
- Rodrigues, R., Artieda, M., Tejedor, D., Martínez, A., Konstantinova, P., Petry, H., et al. (2016). Pathogenic classification of LPL gene variants reported to be associated with LPL deficiency. *J. Clin. Lipidol.* 10, 394–409. doi:10.1016/j.jacl.2015.12.015
- Shapiro, M. D., Minnier, J., Tavori, H., Kassahun, H., Flower, A., Somaratne, R., et al. (2019). Relationship between low-density lipoprotein cholesterol and lipoprotein(a) lowering in response to PCSK9 inhibition with evolucumab. *J. Am. Heart Assoc.* 8, e010932. doi:10.1161/JAHA.118.010932
- Song, W., Beigneux, A. P., Winther, A.-M. L., Kristensen, K. K., Grønnemose, A. L., Yang, Y., et al. (2022). Electrostatic sheathing of lipoprotein lipase is essential for its movement across capillary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 132, e157500. doi:10.1172/JCI157500
- Susheela, A. T., Vadakapet, P., Pillai, L., and Thampi, S. (2021). Familial chylomicronemia syndrome: a case report. *J. Med. Case Rep.* 15, 5. doi:10.1186/s13256-020-02609-0
- Tavori, H., Rashid, S., and Fazio, S. (2015). On the function and homeostasis of PCSK9: reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. *Atherosclerosis* 238, 264–270. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.017
- Warden, B. A., Fazio, S., and Shapiro, M. D. (2020). The PCSK9 revolution: current status, controversies, and future directions. *Trends cardiovasc. Med.* 30, 179–185. doi:10.1016/j.tcm.2019.05.007
- Wilson, D. E., Emi, M., Iverius, P. H., Hata, A., Wu, L. L., Hillas, E., et al. (1990). Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. *J. Clin. Invest.* 86, 735–750. doi:10.1172/JCI114770
- Wion, K. L., Kirchgessner, T. G., Lusic, A. J., Schotz, M. C., and Lawn, R. M. (1987). Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235, 1638–1641. doi:10.1126/science.3823907
- Wittrup, H. H., Tybjaerg-Hansen, A., Abildgaard, S., Steffensen, R., Schnohr, P., and Nordestgaard, B. G. (1997). A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J. Clin. Invest.* 99, 1606–1613. doi:10.1172/JCI119323
- Yue, P., Averna, M., Lin, X., and Schonfeld, G. (2006). The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum. Mutat.* 27, 460–466. doi:10.1002/humu.20316
- Zanelli, T., Catapano, A. L., Averna, M. R., Barbagallo, C. M., Liotta, A., Giardina, F. C., et al. (1994). A new case of apo C-II deficiency with a nonsense mutation in the apo C-II gene. *Clin. Chim. Acta.* 224, 111–118. doi:10.1016/0009-8981(94)90176-7

Article 5

Whole Exome/Genome Sequencing Joint Analysis of a Family with Oligogenic Familial Hypercholesterolemia

Youmna Ghaleb, Sandy Elbitar, Anne Philippi, Petra El Houry, **Yara Azar**, Miangaly Andrianirina, Alexia Loste, Yara Abou-Khalil, Gaël Nicolas, Marie Le Borgne, Philippe Moulin, Mathilde Di-Filippo, Sybil Charrière, Michel Farnier, Cécile Yelnick, Valérie Carreau, Jean Ferrières, Jean-Michel Lecerf, Alexa Derksen, Geneviève Bernard, Marie-Soleil Gauthier, Benoit Coulombe, Dieter Lütjohann, Bertrand Fin, Anne Boland, Robert Olasso, Jean-François Deleuze, Jean-Pierre Rabès, Catherine Boileau, Marianne Abifadel[†], Mathilde Varret[†]

[†] These authors contributed equally to this work.

Metabolites. 2022 Mar 18;12(3):262. doi: 10.3390/metabo12030262.

Article

Whole Exome/Genome Sequencing Joint Analysis of a Family with Oligogenic Familial Hypercholesterolemia

Younna Ghaleb ^{1,2}, Sandy Elbitar ^{1,2}, Anne Philippi ³, Petra El Khoury ^{1,2}, Yara Azar ^{1,2,4}, Miangaly Andrianirina ¹, Alexia Lose ^{1,4}, Yara Abou-Khalil ^{1,2,4}, Gaël Nicolas ^{4,5}, Marie Le Borgne ^{1,4}, Philippe Moulin ^{6,7}, Mathilde Di-Filippo ^{7,8}, Sybil Charrière ^{6,7}, Michel Farnier ⁹, Cécile Yelnick ^{10,11}, Valérie Carreau ¹², Jean Ferrières ¹³, Jean-Michel Lecerf ¹⁴, Alexa Derksen ^{15,16,17}, Geneviève Bernard ^{15,17,18,19,20}, Marie-Soleil Gauthier ¹⁶, Benoit Coulombe ^{16,21}, Dieter Lütjohann ²², Bertrand Fin ²³, Anne Boland ²³, Robert Olasso ²³, Jean-François Deleuze ^{23,24}, Jean-Pierre Rabès ^{1,25,26}, Catherine Boileau ^{1,4,27}, Marianne Abifadel ^{1,2,†} and Mathilde Varret ^{1,4,*,†}

- ¹ INSERM, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), F-75018 Paris, France; youmna.ghaleb@inserm.fr (Y.G.); sandy.el-bitar@inserm.fr (S.E.); petra.el-khoury@inserm.fr (P.E.K.); yara.azar@inserm.fr (Y.A.); miangaly.andrianirina@inserm.fr (M.A.); alexia.lose@inserm.fr (A.L.); yara.abou-khalil@inserm.fr (Y.A.-K.); marie.le-borgne-moynier@inserm.fr (M.L.B.); jean-pierre.rabes@aphp.fr (J.-P.R.); catherine.boileau@inserm.fr (C.B.); marianne.abi-fadel@inserm.fr (M.A.)
- ² Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie-Santé (PTS), Saint-Joseph University, Beirut 1004 2020, Lebanon
- ³ Institut Cochin, Bâtiment Faculté Inserm U1016, Cnrs UMR8104, Université de Paris Faculté de Médecine, F-75014 Paris, France; anne.philippi@inserm.fr
- ⁴ Laboratory for Vascular Translational Science, Paris Cité University, Sorbonne Paris Nord University, F-75013 Paris, France; gael.nicolas@inserm.fr
- ⁵ INSERM U1149, CNRS ERL 8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation, F-75018 Paris, France
- ⁶ Department of Endocrinology, Nutrition and Metabolic Diseases, Hospices Civils de Lyon, Louis Pradel Cardiovascular Hospital, F-69500 Bron, France; philippe.moulin@chu-lyon.fr (P.M.); sybil.charriere@chu-lyon.fr (S.C.)
- ⁷ CarMen Laboratory, INSERM U1060, INRAE U1397, Université Lyon 1, F-69921 Oullins, France; mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr
- ⁸ Hospices Civils de Lyon, Department of Biochemistry and Molecular Biology, F-69500 Bron, France
- ⁹ EA 7460 Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne-Franche Comté, F-21078 Dijon, France; farnier.michel@orange.fr
- ¹⁰ Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique Centre de Référence des Maladies Auto-Immunes Systémiques Rares du Nord et Nord-Ouest de France (CeRAINO) CHU de Lille, F-59037 Lille, France; cecile.yelnick@chru-lille.fr
- ¹¹ U1167 Risk Factors and Molecular Determinants of Aging-Related Diseases, Inserm CHU de Lille, Lille University, F-59000 Lille, France
- ¹² Department of Endocrinology and Prevention of Cardiovascular Disease, Institute of Cardio Metabolism and Nutrition (ICAN), La Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, F-75005 Paris, France; valerie.carreau@aphp.fr
- ¹³ Department of Cardiology, Toulouse Rangueil University Hospital, UMR 1295 INSERM, F-31400 Toulouse, France; jean.ferrieres@univ-tlse3.fr
- ¹⁴ Nutrition Department, Institut Pasteur de Lille, CEDEX, F-59019 Lille, France; jean-michel.lecerf@pasteur-lille.fr
- ¹⁵ Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, QC H3A 0G4, Canada; alexa.derksen@mail.mcgill.ca (A.D.); genevieve.bernard@mcgill.ca (G.B.)
- ¹⁶ Translational Proteomics Laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC H2W 1R7, Canada; marie-soleil.gauthier@ircm.qc.ca (M.-S.G.); benoit.coulombe@ircm.qc.ca (B.C.)
- ¹⁷ Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montréal, QC H3A 0G4, Canada
- ¹⁸ Department of Pediatrics, McGill University, Montréal, QC H3A 0G4, Canada
- ¹⁹ Department of Human Genetics, McGill University, Montréal, QC H3A 0G4, Canada
- ²⁰ Division of Medical Genetics, Department of Specialized Medicine, McGill University Health Centre, Montréal, QC H4A 3J1, Canada
- ²¹ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada
- ²² Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, F-53127 Bonn, Germany; dieter.luetjohann@ukbonn.de
- ²³ CEA, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Laboratory of Excellence GENMED (Medical Genomics), Paris-Saclay University, F-91057 Evry, France; bertrand.fin@cng.fr (B.F.); boland@cng.fr (A.B.); robert.olasso@cng.fr (R.O.); deleuze@cng.fr (J.-F.D.)



Citation: Ghaleb, Y.; Elbitar, S.; Philippi, A.; El Khoury, P.; Azar, Y.; Andrianirina, M.; Lose, A.; Abou-Khalil, Y.; Nicolas, G.; Le Borgne, M.; et al. Whole Exome/Genome Sequencing Joint Analysis of a Family with Oligogenic Familial Hypercholesterolemia. *Metabolites* **2022**, *12*, 262. <https://doi.org/10.3390/metabo12030262>

Academic Editor: Manfredi Rizzo

Received: 21 January 2022

Accepted: 16 March 2022

Published: 18 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

²⁴ Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Fondation Jean Dausset, F-75019 Paris, France

²⁵ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Ambroise Paré University Hospital (APHP), Université Paris-Saclay, F-92104 Boulogne-Billancourt, France

²⁶ UFR (Unité de Formation et de Recherche) Simone Veil-Santé, Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines University, F-78180 Montigny-le-Bretonneux, France

²⁷ Genetic Department, AP-HP, Hôpital Bichat, F-75018 Paris, France

* Correspondence: mathilde.varret@inserm.fr; Tel.: +33-1402-57521

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Autosomal Dominant Hypercholesterolemia (ADH) is a genetic disorder caused by pathogenic variants in *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *APOE* genes. We sought to identify new candidate genes responsible for the ADH phenotype in patients without pathogenic variants in the known ADH-causing genes by focusing on a French family with affected and non-affected members who presented a high ADH polygenic risk score (wPRS). Linkage analysis, whole exome and whole genome sequencing resulted in the identification of variants p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*, p.(Val1382Phe) in *LRP6* and p.(Ser202His) in *LDLRAP1*. A total of 6 other variants were identified in 6 of 160 unrelated ADH probands: p.(Ala13Val) and p.(Aps347Asn) in *CYP7A1*; p.(Tyr972Cys), p.(Thr1479Ile) and p.(Ser1612Phe) in *LRP6*; and p.(Ser202LeufsTer19) in *LDLRAP1*. All six probands presented a moderate wPRS. Serum analyses of carriers of the p.(Pro398Ala) variant in *CYP7A1* showed no differences in the synthesis of bile acids compared to the serums of non-carriers. Functional studies of the four *LRP6* mutants in HEK293T cells resulted in contradictory results excluding a major effect of each variant alone. Within the family, none of the heterozygous for only the *LDLRAP1* p.(Ser202His) variant presented ADH. Altogether, each variant individually does not result in elevated LDL-C; however, the oligogenic combination of two or three variants reveals the ADH phenotype.

Keywords: autosomal dominant hypercholesterolemia; linkage analysis; next-generation sequencing; LDL uptake; *CYP7A1*; *LRP6*; *LDLRAP1*; protein structural models; polygenic risk score; oligogenic hypercholesterolemia

1. Introduction

Autosomal Dominant Hypercholesterolemia (ADH) is a genetic disorder affecting lipoprotein metabolism that is characterized by the high plasma levels of low-density lipoprotein (LDL) due to its reduced catabolism [1]. Lifelong exposure of arteries to elevated levels of cholesterol promotes early atherosclerotic plaque development and premature cardiovascular disease (CVD) increasing the risk of heart attack, stroke and peripheral vascular disease [2]. In addition to CVD, individuals with ADH may have extravascular deposits, such as tendinous xanthomas, xanthelasma or corneal arcus [3].

ADH is one of the most frequent genetic diseases with a prevalence of 1 in 313 in the general population [4] and more frequent in populations with founder effects (i.e., French Canadians, Afrikaners, and Lebanese) [5]. ADH is caused by mutations in the low-density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) at 19p13.3 (OMIM #143890, #606945) [6, 7], the apolipoprotein B gene (*APOB*) at 2p23–p24 (OMIM #107730, #144010) [8], the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene (*PCSK9*) at 1p32.3 (OMIM # 607786) [9] and the apolipoprotein E gene (*APOE*) at 19q13.32 (OMIM #107741) [10]. The low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1 gene (*LDLRAP1*) at 1p36.11 (OMIM # 605747) is the only gene responsible for the recessive form of hypercholesterolemia identified to date [11].

Mutations in the *LDLR* gene are the most frequent cause of ADH (80–85% of the cases), and more than 3000 variants have been reported [3]. The LDL receptor removes LDL particles from plasma, and alterations in its gene (*LDLR*) are commonly associated with high LDL-C levels [3]. Mutations in *APOB* are the second most frequent cause of ADH (5 to 10% of the cases). Apolipoprotein B is the ligand of LDL receptor and ADH-causative variants in *APOB* prevent or alter LDL binding to the LDL receptor [12]. Less frequent (2% of the cases) are *PCSK9* gain-of-function mutations that are associated with high LDL-C

levels due to increased lysosomal LDL receptor degradation [9,13]. The least frequent are mutations in *APOE* (1% of the cases) that also affect LDL binding to the LDL receptor [14].

In addition to the four major genes, ADH-causative defects are identified in “minor genes” [5]. While involved in recessive forms of hypercholesterolemia, heterozygous variants in *LDLRAP1* have been shown to increase LDL-C levels [15]. Putative pathogenic variants in the adenosine triphosphate-binding cassette transporter G5/G8 genes (*ABCG5/ABCG8*) that are involved in sitosterolemia (OMIM #210250), were found in 2.4% of subjects in an ADH Dutch cohort [16]. Possible pathogenic variants in the lysosomal acid lipase A gene (*LIPA*) that are involved in recessive lysosomal acid lipase deficiency, LAL (OMIM #278000), were found in 2.2% of subjects in an ADH Portuguese cohort [17]. In addition, a frameshift variant in the gene encoding the cholesterol 7 α -hydroxylase (*CYP7A1*) segregates with high LDL-C levels in a large family [18]. *CYP7A1* is an enzyme that catalyzes the rate-limiting step in the conversion of cholesterol to bile acids in the liver (OMIM #118455). Several rare missense variants in the gene encoding LDL receptor-related protein 6 (*LRP6*), which plays a crucial role in lipoprotein endocytosis and is an essential co-receptor in the Wnt/ β -catenin signaling pathway (OMIM #603507) [19,20], are linked to metabolic syndrome, high LDL-C levels, and early onset of CVD [21–23]. Rare variants in the gene encoding the patatin-like phospholipase domain-containing 5 (*PNPLA5*) were significantly associated with higher LDL-C levels in an American cohort [24].

Mutations identified in genes causing ADH account for approximately 80% of cases [25]. Based on weighted polygenic risk score (wPRS) calculations [26], a polygenic origin may account for 36% of nonmutated hypercholesterolemic patients [27]. This indicates the existence of a greater level of genetic heterogeneity in ADH and the involvement of unknown genes [28]. Between monogenic and polygenic forms of ADH, digenic forms were reported with double-heterozygous carriers of mutations in two ADH major genes (*LDLR/APOB*, *LDLR/PCK9* [29] or *APOB/PCSK9* [30]), or in one major gene (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*) and one minor gene (*ABCG5*, *ABCG8*, *LDLRAP1*) [31]. To our knowledge, oligogenic forms with three variants in non-conventional ADH genes have not been reported.

We conducted this study in 1 French ADH family and in 160 unrelated hypercholesterolemic French probands in whom no pathogenic variant was found in the four ADH major genes. Our aim is to identify a new gene responsible for the ADH phenotype, which would allow a better understanding of ADH underlying causes and pathophysiology and would reveal new therapeutic targets.

2. Results

2.1. Patients Characteristics

The family HC438 recruited for this study contained four affected members over two generations, which was large enough to conduct statistically meaningful genetic studies to identify new genes causing ADH. The index case for this family, II-7 (Figure 1), had a total cholesterol level of 9.33 mmol/L and LDL-C of 6.67 mmol/L before lipid-lowering therapy at the age of 56 years (both above the 90th percentile in agreement with inclusion criteria for affected ADH subjects, see Section 4.1). Her levels reached 13.33 mmol/L for total cholesterol and 10.73 mmol/L for LDL-C without treatment at 66 years of age, suggesting a homozygous form of ADH. She suffered from severe atheroma and had no extravascular cholesterol deposits. She also had a family history of hypercholesterolemia and cardiovascular heart disease. All willing members of the family were recruited, resulting in an expansion to 15 individuals over 3 generations, including 4 affected (I-2, II-1, II-4 and II-7) and 11 normocholesterolemic (i.e., normal cholesterol) individuals (I-1, II-5, II-6, II-8, all 3rd generation) (Figure 1). Both parents of the index case II-7 had elevated LDL-C or CVD. The father, I-1, had a myocardial infarction at the age of 75 years and an LDL-C level of 3.23 mmol/L under ciprofibrate treatment at the age of 87 years. We therefore considered him to be unaffected. The mother, I-2, had an LDL-C level of 5.48 mmol/L under diet at the age of 81 years. The LDL-C level of subject II-1 at the age of 63 years was 4.37 mmol/L under 5 mg rosuvastatin treatment and was estimated to be 7.95 mmol/L

without treatment [32]. Patients II-1 and II-7 had higher LDL-C levels than their sister II-4. Therefore, because of the absence of consanguinity of their parents, patients II-1 and II-7 probably inherited two traits, one from each parent, whereas II-4 inherited the disease from her affected mother only (Figure 1). None of the affected family members presented extravascular cholesterol deposits or CVD, except subjects I-1 and II-7 who had CVD.

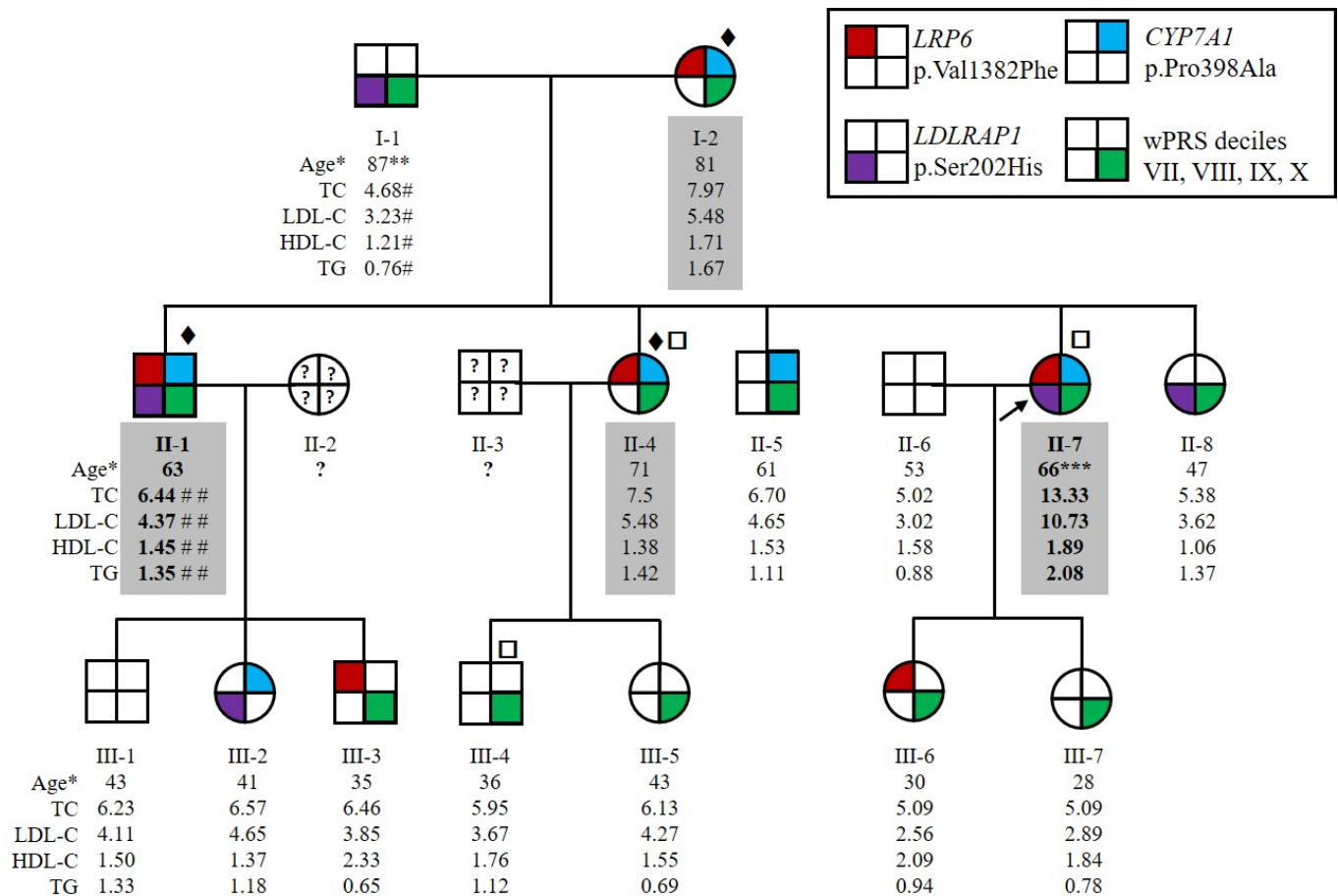


Figure 1. Pedigree of the family HC438 with the segregation of p.(Val1382Phe) variant in *LRP6*, p.(Pro398Ala) variant in *CYP7A1* and p.(Ser202His) variant in *LDLRAP1* and the weighted Polygenic Risk Score (wPRS). The proband II-7 is indicated by the black arrow. Squares and circles represent men and women, respectively. Affected family members are indicated by values highlighted in gray. More severely affected family members are indicated by bold values. * Age at lipid measurement in years. ** Myocardial infarction at 75 years old. *** Severe atheroma. # Under ciprofibrate. ## Under 5 mg rosuvastatin treatment. Patients for whom ♦ whole exome, □ whole genome sequencing was performed. Lipid values in mmol/L: TC for total cholesterol; LDL-C for LDL cholesterol; HDL-C for HDL cholesterol; TGs for triglycerides.

In addition to the HC438 family, a cohort of 160 non-LDLR/non-APOB/non-PCSK9/non-APOE French ADH probands was collected. Lipid values before treatment were available for 98 probands (62.24% women, age: 52.5 ± 19 years): 7.96 ± 1.76 mmol/L for total cholesterol, 5.9 ± 1.24 mmol/L for LDL-C, 1.58 ± 0.71 mmol/L for HDL-C and 1.57 ± 1.1 mmol/L for triglycerides. The wPRS was calculated and 55.2% of the cohort probands were in the top four deciles (VII, VIII, IX and X) of the WHII reference cohort (Figure S1).

2.2. Three Candidate Variants Were Identified by Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing and Positional Cloning

We conducted whole genome sequencing (WGS) and whole exome sequencing (WES) of family HC438 and data were analyzed conjointly. Using a dedicated in-house Python pipeline, 22 variants within the family meeting the filtering criteria (variant quality, frequency, localization, segregation with ADH, predicted consequence and genotype quality; see Section 4.2) were identified in the heterozygous state. Four variants were transmitted from the mother (I-2) to the three affected children (II-1, II-4 and II-7) corresponding to three missense variants in *CYP7A1*, *KIFC2* and *LRP6*, and one intronic variant in *SLC39A4*. Three missense variants in the *LDLRAP1*, *GOLGA4* and *AP2A1* genes were transmitted from the father (I-1) to the two more severely affected children (II-1 and II-7). Three variants were transmitted from the mother (I-2) to the two more severely affected children (II-1 and II-7) corresponding to one missense variant in *MOGAT2* and two intronic variants in *PEX19* and *TSC2*. Finally, 12 UTR variants were transmitted by either parent to the 3 affected children (II-1, II-4 and II-7) (Table S1).

We performed positional cloning using a genome-wide scan of the entire family with 1072 polymorphic microsatellite markers. Parametric linkage analyses were performed under four hypotheses: (1) a paternal trait inherited by the three affected children, (2) a paternal trait inherited by the two more severely affected children, (3) a maternal trait inherited by the three affected children, and (4) a maternal trait inherited by the two more severely affected children (Table S2). The linkage analysis showed a maximum expected logarithm of odds score (ELOD) between 1.61 and 2.00 for the HC438 family, which only allowed significant exclusion of the rs62371472 variant in the *AP3S1* gene and the probable exclusion of the rs541351955 variant in the *SMAP2* gene from paternal and maternal inheritance. The variants *CD59* 3'UTR, *LDLRAP1*-p.(Ser202His) and *GOLGA4*-p.(Arg1494Ile) are probably linked to the disease with a paternal inheritance. The variants *CYP7A1*-p.(Pro398Ala), *LRP6*-p.(Val1382Phe) and *SLC2A3* 3'UTR, as well as *TSC2* intronic variants, are probably linked to the disease with a maternal inheritance. These seven genes with nonsynonymous variants are probably linked to paternally or maternally inherited traits.

Among the seven genes, we selected the three variants in the ADH minor genes *CYP7A1*, *LRP6* and *LDLRAP1* for further analysis. We performed segregation analysis by Sanger sequencing of all recruited family members. The variants p.(Val1382Phe) in *LRP6* and p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* are transmitted from the mother (I-2) to the three affected children (II-1, II-4 and II-7). The variants are also transmitted to the two unaffected members (III-3 and III-6 for *LRP6* variant, II-8 and III-2 for *CYP7A1* variant), indicating incomplete penetrance of the associated phenotype (Figure 1). The p.(Ser202His) variant in *LDLRAP1* was transmitted from the father (I-1) to the two more severely affected children (II-1, II-7); however, it is also transmitted to two unaffected members (II-8 and III-2) (Figure 1). Thus, the two more severely affected family members (II-1 and II-7) carried the three variants. In silico analysis of these variants is detailed in Table 1.

Table 1. Variants in CYP7A1, LDLRAP1 and LRP6. The pathogenicity of the variants was evaluated using Varsome, PolyPhen2, Provean, ClinVar, CADD score and Splice AI.

Gene	c.notation p.notation	rs Number	Pathway	GTEX-TPM_Liver #	gnomAD (Total) *	gnomAD (ENF) *	FREX **	Varsome ***	PolyPhen2	Provean †	ClinVar	CADD Score ‡	Splice AI
CYP7A1 (NM_000780)	c.38C > T p.(Ala13Val)	rs147162838	Bile acid and bile salt metabolism	2.612	0.181% (512/282,726)	0.35% (451/129,062)	0.	LB	B	N (−0.189)	LB/VUS	7.125	No-consq (0)
	c.1039G > A p.(Asp347Asn)	rs8192875			0.274% (776/282,802)	0.019% (25/129,150)	...	LB	PD	D (−0.2990)	...	33	Donor gain (0.48)
	c.1192C > G p.(Pro398Ala)	rs142708991			0.336% (951/282,868)	0.43% (555/129,184)	0.0871%	LB	PD	D (−7.559)	LB	25.1	No-consq (0)
LDLRAP1 (NM_015627)	c.603dupC p.(Ser202LeufsTer19)	rs781585299	Clathrin- mediated endocytosis	112.23	P	P
	c.604_605delTCinsCA p.(Ser202His)	rs386629678			LB	PD	N (−2.072)	LB
LRP6 (NM_002336)	c.2915A > G p.(Tyr972Cys)	rs772441071	Vesicle- mediated transport	9.662	0.001193% (3/251,364)	0.002640% (3/113,656)	...	VUS	PD	D (−7.227)	...	26.9	Acceptor gain (0.04)
	c.4144G > T p.(Val1382Phe)	rs139480047			0.08379% (237/282,856)	0.1061% (137/129,164)	0.261%	B	B	N (−1.246)	LB	22.3	Donor gain (0.02)
	c.4436C > T p.(Thr1479Ile)	rs144175121			0.02263% (64/282,836)	0.04335% (56/129,168)	...	B	B	N (−1.906)	...	23.3	No-consq (0)
	c.4835C > T p.(Ser1612Phe)	...			0.0008097% (2/247,016)	0% (0/111,624)	...	VUS	PD	D (−2.879)	...	29.4	Donor gain (0.02)

Gene expression in the liver, from the Genotype Tissue Expression database (GTEX). TPM: transcripts per million. * Allele frequency, from the Genome Aggregation Database (gnomAD); allele count/allele number in the general population and in the European non-Finnish (ENF). ** Allele frequency from the French Exome Project database. *** Varsome tool according to the ACMG guidelines [33]. † Provean: variant with a score of ≤ -2.5 is considered “deleterious” and with a score of > -2.5 is considered “neutral”. ‡ CADD score ≥ 20 indicates that the variant is predicted to be among the top 1% of the most deleterious substitutions in the human genome, and a score of ≥ 30 indicates that the variant is predicted to be among the top 0.1% of the most deleterious substitutions in the human genome. N: neutral, LB: likely benign, B: benign, VUS: variant of unknown significance, PD: probably damaging, D: deleterious, P: pathogenic.

2.3. Identification of New Variants in *CYP7A1*, *LDLRAP1* and *LRP6*

We sequenced the *CYP7A1*, *LDLRAP1* and *LRP6* genes in the cohort of 160 French hypercholesterolemic probands in whom mutations in *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *APOE* were excluded. We replicated the *CYP7A1* finding by identifying the same p.(Pro398Ala) mutation in a 71-year-old man who presented total cholesterol of 7.52 mmol/L and LDL-C of 5.69 mmol/L. Among other cohort members, we identified the two variants p.(Ala13Val) and p.(Asp347Asn) in this gene and the four rare missense variants p.(Tyr972Cys), p.(Thr1479Ile) and p.(Ser1612Phe) in *LRP6* and p.(Ser202LeufsTer19) in *LDLRAP1* (Tables 1 and 2). The p.(Tyr972Cys) variant in *LRP6* is located in the fourth β -propeller domain of the LRP6 receptor, whereas two other variants are in the intracellular domain (Figure 2). The substituted residues are highly conserved among species from human to zebrafish (Figure S1). The p.(Val1382Phe) variant in *LRP6* is located in the transmembrane domain of LRP6 (Figure 2) in a conserved region (Figure S2).

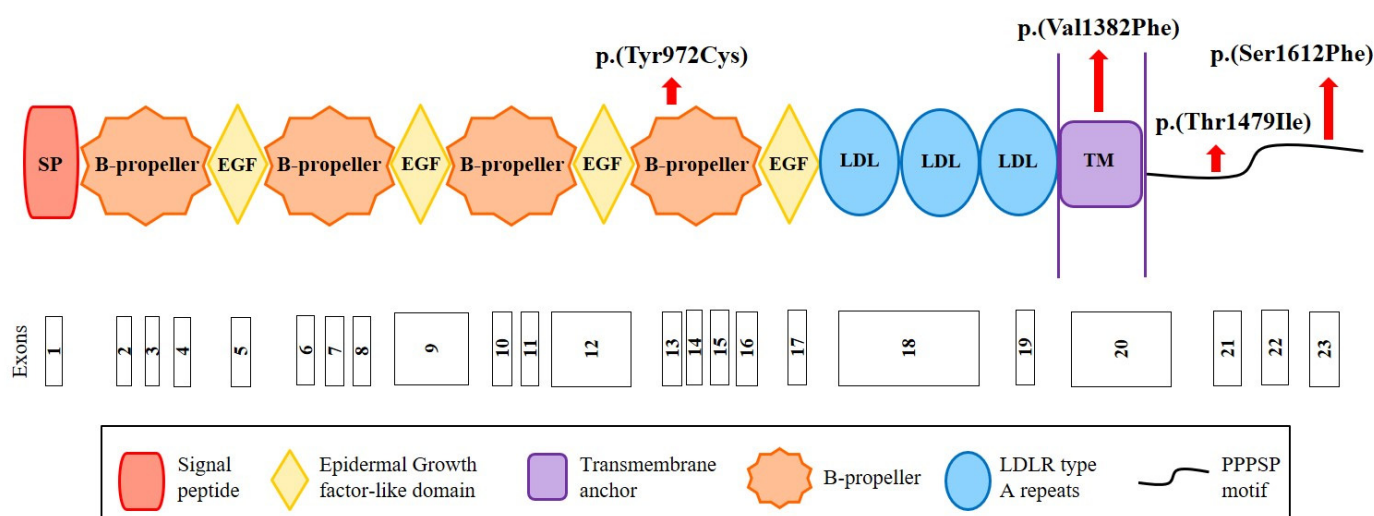


Figure 2. Structure of the LRP6 receptor and position of the identified variants. The LRP6 receptor contains the following structural motifs: signal peptide (SP), 4 β -propeller domains, 4 EGF-like domains (involved in the pH-dependent release of ligands in endosome), 3 LDLR type A repeats (responsible for the binding of ligands), a transmembrane anchor (binds the receptor to the cell membrane), and a cytoplasmic domain with PPPSP motifs (2 motifs at position 1487 and 1604 that allow the receptor to function in the Wnt/ β -catenin pathway). Red arrows indicate the position of the variants identified in this study. Figure built from data from UniProt (www.uniprot.org (accessed on 12 October 2020)) and Ensembl (www.ensembl.org/index.html (accessed on 12 October 2020)) databases.

Table 2. Biological and clinical characteristics of the affected carriers of *CYP7A1*, *LDLRAP1* and *LRP6* variant.

Gene	Variant	Sex	Age *	TC **	LDL-C **	HDL-C **	TG **	wPRS	Decile	Clinic	Family History
<i>CYP7A1</i> (NM_000780)	c.38C > T p.(Ala13Val)	M	59	0.571	IV
	c.1039G > A p.(Asp347Asn)	F	71	7.92	6.24	...	0.98	0.25	I
	c.1192C > G p.(Pro398Ala)	M	71	7.52	5.69
<i>LDLRAP1</i> (NM_015627)	c.603dupC p.(Ser202LeufsTer19)	F	37	7.75	5.56	1.37	1.81	0.752	VII
	c.604_605delTCinsCA p.(Ser202His)	F	39	...	5.44	0.622	V
<i>LRP6</i> (NM_002336)	c.2915A > G	M [†]	40	6.35	4.70	1.21	0.89	CAD	Yes
	p.(Tyr972Cys)	M [‡]	32	7.47	5.30	1.34	1.83	0.371	II	No	Yes
	c.4436C > T p.(Thr1479Ile)	F	48	8.15	5.57	2.12	1.01	0.581	IV	No	Yes
	c.4835C > T p.(Ser1612Phe)	M	51	8.04	5.89	1.71	0.94	0.542	III	CAD	Yes

* Age in years at lipid measurement. ** Lipid values (mmol/L) without lipid-lowering therapy. [†] Father. [‡] Son. TC: total cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; TGs: triglycerides; wPRS: weighted polygenic risk score.

The use of PyMOL to model the effects of the p.(Tyr972Cys) in LRP6-E3E4 (PMB ID 3S8Z) showed that this missense variant results in the loss of a polar interaction with a neighboring glutamic acid residue at position 993 (Figure 3). As a result, this mutant could result in altered stability of LRP6 protein and/or its ability to uptake LDL. A crystal structure of LRP6 containing its transmembrane and intracellular domains is not available, so the variants p.(Val1382Phe), p.(Thr1479Ile), p.(Tyr1584Asn), and p.(Ser1612Phe) could not be modeled.

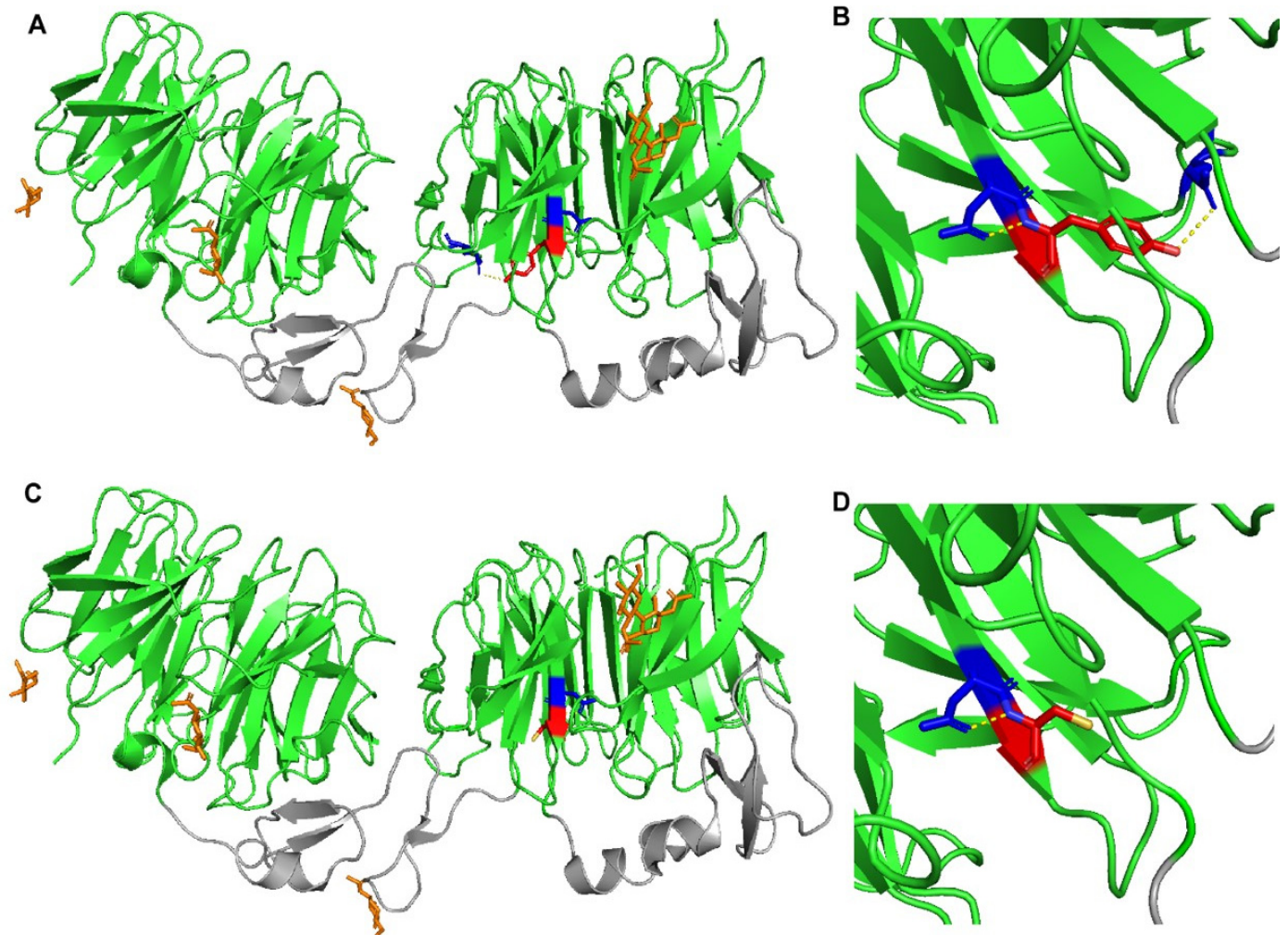


Figure 3. Crystal structure of wild-type and mutant LRP6-E3E4 with β -propeller domains (green) and epidermal growth factor (EGF)-like domains (gray). (A,B) LRP6-E3E4 Tyr972 residue (red) has polar contacts (yellow dotted lines) with Asp971 and Glu993 (blue). (C,D) LRP6-E3E4 mutant Cys972 residue (red) has a polar contact (yellow dotted line) only with Asp971 (blue).

2.4. Bile Acid Synthesis Is Not Affected by the CYP7A1 Variant p.(Pro398Ala)

Cholestanol and 7α -hydroxy-cholesterol levels are significantly lower in carriers of p.(Pro398Ala) in CYP7A1, compared to non-carriers in the HC438 family ($p = 0.015$, $p = 0.032$, respectively), whereas bile acids levels are not affected (Table 3). This variant can therefore participate in the elevation of LDL-C levels. However, this cannot fully explain the phenotype, because family members II-5 and III-2 carrying this variant (II-5 and III-2) do not present hypercholesterolemia.

Table 3. Sterol and bile acid measurements in family HC438.

	II-1 ^{*,†}	II-4 ^{**,†}	II-5 [†]	III-4	III-6	III-7	Carriers ^{***}	Non-Carriers ^{***}	Marker of	<i>p</i> -Value
Serum total cholesterol (mmol/L)	5.08	7.84	6.95	5.73	5.46	3.67	6.62 ± 1.41	4.95 ± 1.12		0.306
R_campesterol (µg/mg) [‡]	1.77	1.13	1.41	1.66	1.98	2.02	1.44 ± 0.32	0.32 ± 1.89	Cholesterol absorption	0.061
R_sitosterol (µg/mg) [‡]	1.65	0.87	0.97	0.94	1.26	1.30	1.16 ± 0.43	1.17 ± 0.20	Cholesterol absorption	0.495
R_cholestanol (µg/mg) [‡]	1.05	1.00	0.79	1.32	1.25	1.38	0.95 ± 0.14	1.32 ± 0.07	Cholesterol absorption	0.015
R_lathosterol (µg/mg) [‡]	0.68	1.46	1.39	2.02	1.22	2.01	1.18 ± 0.43	1.75 ± 0.46	Cholesterol synthesis	0.094
R_lanosterol (µg/mg) [‡]	0.10	0.14	0.12	0.17	0.11	0.20	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.05	Cholesterol synthesis	0.126
R_desmosterol (µg/mg) [‡]	0.65	0.78	0.77	0.91	0.58	0.77	0.74 ± 0.07	0.75 ± 0.17	Cholesterol synthesis	0.433
R_7αOH-cholesterol (ng/mg) [‡]	23	25	39	41	44	52	29 ± 9	46 ± 6	Degradation to bile acids	0.032
R_27OH-cholesterol (ng/mg) [‡]	113	108	95	107	117	128	105 ± 9	118 ± 10	Degradation to bile acids	0.104
Chenodeoxycholic acid (µmol/L)	3.05	2.76	1.34	2.11	0.01	3.49	2.38 ± 0.91	1.87 ± 1.75	Bile acids	0.342
Cholic acid (µmol/L)	1.76	1.92	0.44	1.74	0.01	1.28	1.38 ± 0.81	1.01 ± 0.89	Bile acids	0.314
Lithocholic acid (µmol/L)	0.06	0.16	0.21	0.20	0.31	0.11	0.14 ± 0.08	0.21 ± 0.10	Bile acids	0.224
Deoxycholic acid (µmol/L)	0.27	2.16	2.30	2.99	1.95	1.06	1.58 ± 1.13	2.00 ± 0.96	Bile acids	0.324

[†] carriers of the variant p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*. * under rosuvastatin 5 mg, ** under pravastatin 20 mg. [‡] values corrected for cholesterol concentration (R_sterols). *** Mean ± SD. Statistically significant differences between carriers and non-carriers are highlighted in bold (Bonferroni's Multiple Comparison Test in one-way ANOVA).

2.5. Contradictory Effects of LRP6 Variants on LRP6 Expression and LDL Binding and Uptake

HuH7 cells transfected with a siRNA targeting human *LRP6* (siLRP6) showed the expected reduced expression of the *LRP6* gene by 80% (Figure 4A). No significant differences in *LDLR*, *HMGCR*, *SREBP2* and *PCSK9* mRNA expression were observed (Figure S3), whereas labeled LDL uptake was significantly reduced by 23.14% and 20%, compared to non-transfected cells and to cells transfected with the negative control (siNeg), respectively ($p < 0.05$) (Figure 4B).

As expected, cells transfected with the LRP6-WT plasmid present a significant increase in membrane expression of the LRP6 protein compared to cells transfected with the empty vector (PcM) (Figure 4C), but there is no significant difference in the binding and uptake of labeled LDL (Figure 4F and Figure S4).

The two variants, p.(Tyr972Cys) and p.(Thr1479Ile), significantly decrease the surface expression of LRP6 compared to WT ($p < 0.001$) (Figure 4C), but only p.(Thr1479Ile) significantly decreases LRP6 protein expression in cells (Figure 4D,E). The two variants increase the binding and uptake of labeled LDL in HEK293T cells. However, a significant difference ($p < 0.05$) is observed only with the p.(Tyr972Cys) variant compared to LRP6-WT for binding and uptake measured simultaneously (Figure S4) and for uptake alone (Figure 4F).

Unlike p.(Tyr972Cys) and p.(Thr1479Ile), p.(Val1382Phe) does not affect the membrane expression of LRP6 (Figure 4C), but it significantly reduces LDL uptake when compared to LRP6-WT ($p < 0.05$) (Figure 4F). Nevertheless, this variant has no significant effect when LDL binding and uptake were observed simultaneously (Figure S4).

The effect of LRP6-WT or the mutated plasmids on the membrane expression of the LDL receptor was also evaluated in transfected HEK293T cells and no significant changes were observed (Figure S5).

These confusing contradictory results suggest that each of these variants does not individually have a major effect on cellular LDL uptake and LDL-C circulating levels.

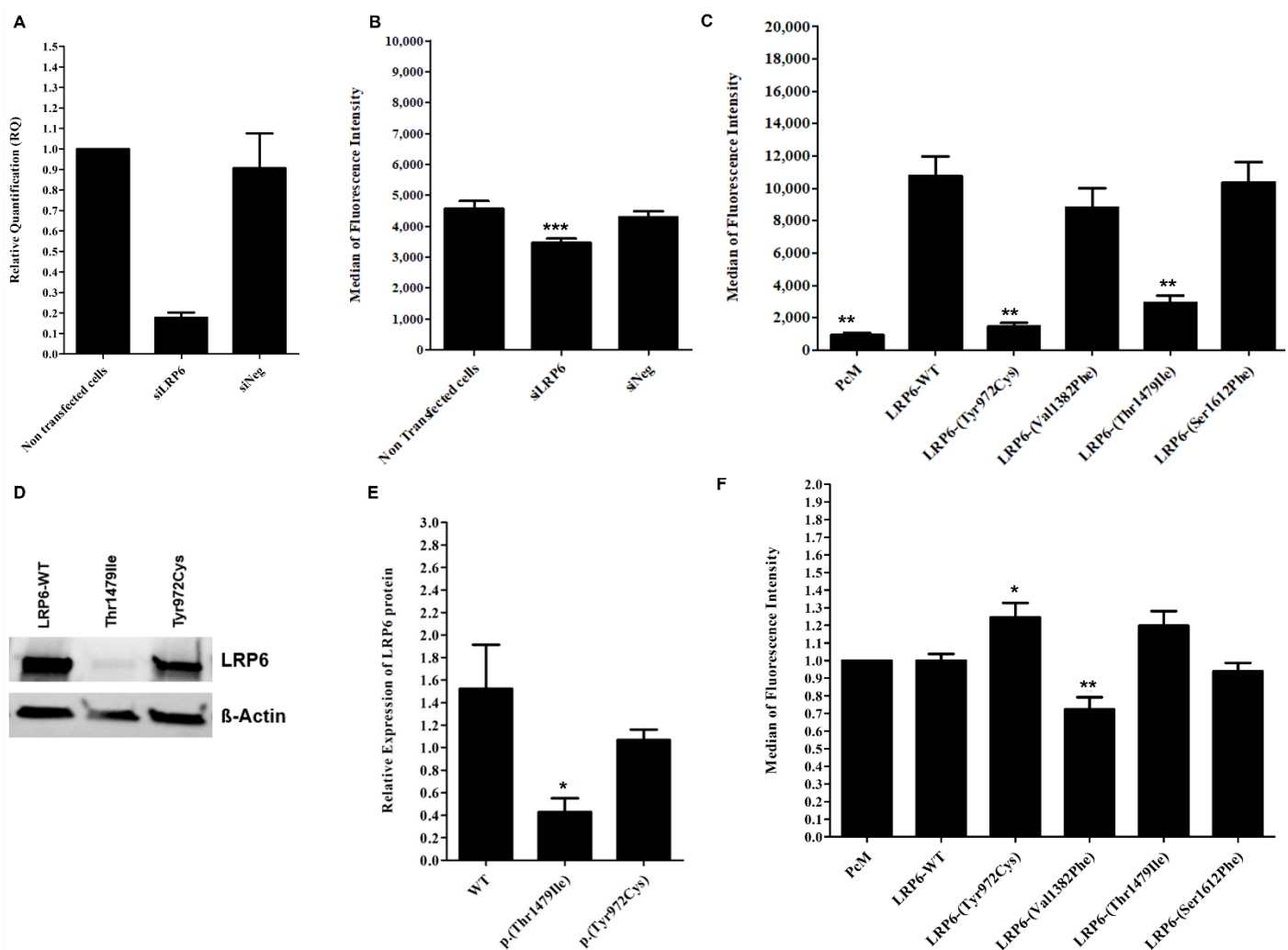


Figure 4. Effect of inhibited, overexpressed or mutated *LRP6* in HEK293T and HuH7 cells. (A) *LRP6* mRNA expression in HuH7 after the silencing of *LRP6*. Reactions were run in triplicate for each cDNA. *POLR2A* was used as the reference housekeeping gene. The relative quantification of gene expression was performed using the $\Delta\Delta C_T$ method and non-transfected cells were used for calibration. (B) LDL-Bodipy uptake in HuH7 after silencing of *LRP6*. Median fluorescence intensity of 50,000 events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells is presented. Data represent three independent assays performed in triplicate. (C) Expression of WT or mutated *LRP6* at the cell surface of transfected HEK293T. The median fluorescence intensity of 100,000 events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells is presented. Data represent four independently performed assays. (D,E) *LRP6* expression in HEK293T cells after transfection with *LRP6*-WT or mutated plasmid (p.(Thr1479Ile) and p.(Tyr972Cys) variants). Proteins were extracted from transfected cells, separated by electrophoresis and then transferred onto PVDF membrane. The membrane was incubated with primary antibody (anti-*LRP6*), followed by incubation with secondary antibody before detection using the iBrightTM FL1500 imaging system. Protein was quantified by ImageJ software. Equal loading was confirmed using the β -actin antibody. Data represent three independent assays. (F) LDL uptake in HEK293T after transfection with an empty vector, *LRP6*-WT or mutated plasmid. The median fluorescence intensity of 100,000 events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells is presented. The fluorescence of each sample was normalized using the empty vector (PcM) as a reference. Data represent three independent assays, each performed in triplicate. In all experiments, the difference between conditions was determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test in one-way ANOVA and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ were considered as statistically significant. Results are shown as mean \pm SD. Error bars represent \pm SD.

2.6. Heterozygotes Carriers of *p.(Val1382Phe)* Did Not Present Altered LDL Uptake or *LRP6* Gene Expression

The number of LDL receptors at the cell surface, LDL binding and LDL uptake are similar for EBV-transformed B-lymphocytes from two heterozygotes carriers of *LRP6-p.(Val1382Phe)*, compared to cells from normocholesterolemic subjects. However, these parameters are significantly reduced in B-lymphocytes from FH (familial hypercholesterolemia) patients' heterozygous for pathogenic variants in the *LDLR* gene (Figure 5A–C). This indicates that the *LRP6-p.(Val1382Phe)* variant alone does not affect the LDL cellular uptake. We hypothesize that the *CYP7A1-p.(Pro398Ala)* also carried by patient II.4 is not involved, since the *CYP7A1* gene is not expressed in the EBV-transformed B-lymphocytes.

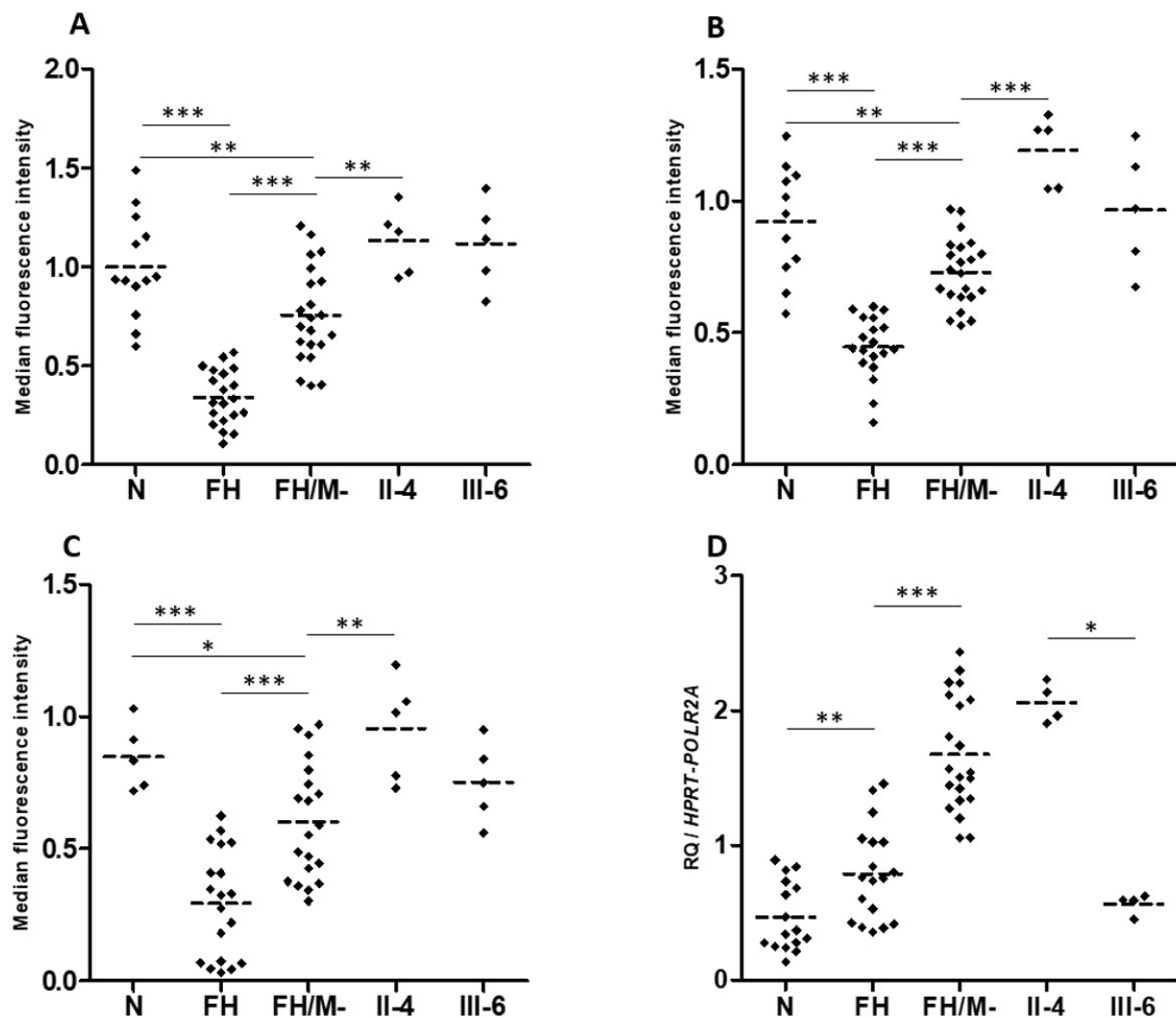


Figure 5. LDL receptor expression, LDL binding and uptake, and *LRP6* gene expression in patients EBV-transformed B-lymphocytes. (A) LDL receptor, (B) LDL-Bodipy binding and (C) LDL-Bodipy uptake quantification in EBV-transformed B-lymphocytes from normocholesterolemic subjects (N), *LDLR* mutation carriers (FH), hypercholesterolemic patients without an identified mutation (FH/M-), and two *LRP6-p.(Val1382Phe)* carriers from the HC438 family: II-4 and III-6 (see Figure 1). The median fluorescence of living cells is presented. Data represent five independently performed assays. (D) *LRP6* gene expression. Relative Quantification (RQ) of *LRP6* in EBV-transformed B-lymphocytes. Reactions were run in triplicate for each cDNA. *HPRT* and *POLR2A* were used as reference genes. The relative quantification was performed using the ΔC_T method. (A–D). Bonferroni's Multiple Comparison Test in one-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Interestingly, *LRP6* gene expression is significantly higher in EBV-transformed B-lymphocytes from FH patients compared to cells from normocholesterolemic subjects (Figure 5D). Cells from affected patient II.4 present *LRP6* expression similar to that of cells from FH patients, whereas cells from unaffected carrier III-6 presented *LRP6* expression similar to that of cells from normocholesterolemic subjects (Figure 5D). This indicates that the higher *LRP6* gene expression is associated with the affected phenotype (FH and II.4 patients), but not with the *LRP6*-p.(Val1382Phe) variant carried by both family members II.4 and III.6.

2.7. Carriers of an *LRP6* or *LDLRAP1* Variant Present Lower LDL-C Levels than Non-Carriers Despite a Similar Polygenic Risk Score

In order to assess the contribution of polygenic hypercholesterolemia, we used a wPRS that includes risk alleles from the six frequent LDL-C-associated genes *CELSR2*, *APOB*, *ABCG5/8*, *LDLR* and *APOE* [26].

As expected, the mean LDL-C levels is significantly higher in the 152 ADH probands compared to the 13 non-ADH subjects (6.1 ± 1.5 vs. 3.4 ± 0.5 mmol/L, $p < 0.0001$) (Table 4). The mean LDL-C levels in the 4 carriers of a *CYP7A1* variants (5.5 ± 0.8 vs. 3.4 ± 0.5 mmol/L, $p = 0.0053$) and the 6 carriers of *LRP6* variants (4.6 ± 1.3 vs. 3.4 ± 0.5 mmol/L, $p = 0.0242$) are significantly higher compared to those of the 13 non-ADH subjects (Table 4). The mean LDL-C levels in the 152 ADH probands were also significantly higher than those of the 6 carriers of *LRP6* variants (4.6 ± 1.3 vs. 6.1 ± 1.5 mmol/L, $p = 0.0088$) (Table 4). These LDL-C differences were not attributable to a polygenic contribution, because the wPRS are statistically similar among the ADH probands and the carriers of variants in the three genes (Table 4). While our results are statistically significant, our variant group was limited to two or six subjects. Larger follow-up studies would confirm our results and add more statistical significance.

Table 4. LDL-C levels and weighted Polygenic Risk Score (wPRS) comparison among the carriers of *CYP7A1*, *LRP6* and/or *LDLRAP1* variants.

	Non-ADH Subjects *	ADH Probands **	<i>CYP7A1</i> Variant Carriers ***	<i>LRP6</i> Variant Carriers #	<i>LDLRAP1</i> Variant Carriers ##	<i>CYP7A1</i> and <i>LRP6</i> Variants ###	<i>CYP7A1</i> , <i>LRP6</i> and <i>LDLRAP1</i> Variants Carriers †
N	13	152	4	6	3	2	2
Sex (% of women)	53.8	60.4	25	33.3	66.7	100	50
Age (years)	50 ± 15	48 ± 18	66 ± 6	39 ± 9	54 ± 28	81–71	6366
<i>p</i> -value vs. non-ADH subjects		0.4897	0.0266	0.0520	0.3185		
<i>p</i> -value vs. ADH probands			0.0094	0.0453	0.4945		
LDL-C (mmol/L)	3.4 ± 0.5	6.1 ± 1.5	5.5 ± 0.8	4.6 ± 1.3	4.7 ± 1.3	5.5–5.5	7.9–10.7
<i>p</i> -value vs. non-ADH subjects		<0.0001	0.0053	0.0242	0.0693		
<i>p</i> -value vs. ADH probands			0.2364	0.0088	0.0542		
wPRS	0.665 ± 0.165	0.700 ± 0.187	0.574 ± 0.326	0.655 ± 0.243	0.792 ± 0.193	0.731–0.831	0.831–0.902
<i>p</i> -value vs. non-ADH subjects		0.2024	0.3428	0.500	0.2091		
<i>p</i> -value vs. ADH probands			0.2091	0.2548	0.2676		

* Normocholesterolemic and non-carriers of a rare variant in an ADH-causing genes. ** Non-carriers of a rare variant in *LDLR*, *APOB*, *APOE*, *PCSK9*, *CYP7A1*, *LRP6*, and *LDLRAP1* genes. *** One p.(Ala13Val), one p.(Asp347Asn), and two p.(Pro398Ala) (Figure 1, Table 2). # Two p.(Tyr972Cys), two p.(Val1382Phe), one p.(Thr1479Ile), and one p.(Ser1612Phe) (Figure 1, Table 2). ## One p.(Ser202LeufsTer19) and two p.(Ser202His) (Figure 1, Table 2). ### Two p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* and p.(Val1382Phe) in *LRP6* (Figure 1). † Two p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*, p.(Val1382Phe) in *LRP6*, and p.(Ser202His) in *LDLRAP1* (Figure 1).

In the HC438 family, all the affected members present a wPRS in the top four deciles (VII, VIII, IX and X) of the WHIII reference cohort, as well as six unaffected members (Figure 1). The wPRS does not influence the LDL-C levels in this family.

3. Discussion

We report here the first joint analysis of WES and WGS to identify ADH-causing genes in a French family. WES was performed for the three family members (I-2, II-1 and II-4) and WGS was performed for II-4 and the two additional family members II-6 and III-3. This permitted the analysis of five affected and unaffected members over three generations. WGS was used to complete WES with better genome coverage. The joint analysis permitted the filtering of variants according to segregation over the three generations with the retention of information and better accuracy compared to the separate analysis of the two sequencing results.

This approach allows us to identify ADH proband II-7, which has no detectable causal mutation in the four major ADH genes. Proband II-7 carries the three rare variants p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*, p.(Val1382Phe) in *LRP6* and p.(Ser202His) in *LDLRAP1* in a polygenic background. The genotyping of the three variants with the wPRS calculation in the whole proband family allowed the identification of two affected members (I-2 and II-4) with the *CYP7A1/LRP6*/polygenic combination. None of the family members presenting a high wPRS and/or carrying only one of the variants in *LRP6*, *CYP7A1* or *LDLRAP1* was affected. To identify ADH carriers with oligogenic combinations, we also sequenced the 3 minor genes (*LRP6*, *CYP7A1* and *LDLRAP1*) in 160 unrelated ADH probands with no causal variants in the 4 major genes. We identified six additional rare variants. The two variants p.(Ala13Val) and p.(Asp347Asn) were found in *CYP7A1*, the three variants p.(Tyr972Cys), p.(Thr1479Ile) and p.(Ser1612Phe) were found in *LRP6* and the single variant p.(Ser202LeufsTer19) was found in *LDLRAP1*. No oligogenic combination of these variants was identified in the same proband. We then evaluated the effect of the p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* on bile acid synthesis and observed no major effect, which would indicate a *CYP7A1* deficiency. Similarly, the functional analysis of the four *LRP6* variants showed no major effect on LDL uptake. We concluded that each variant alone is insufficient to reveal the disease. Rather, a combination of variants is necessary.

The family proband II-7 had severe hypercholesterolemia, suggesting a homozygous form of ADH, and thus inherited defects from both parents. Whole genome and exome sequencing complemented by positional cloning analysis revealed the three rare variants *CD59* 3'UTR, *LDLRAP1* p.(Ser202His) and *GOLGA4* p.(Arg1494Ile) transmitted from the father and the four variants *CYP7A1* p.(Pro398Ala), *LRP6* p.(Val1382Phe), *SLC2A3* 3'UTR and *TSC2* intronic variant from the mother. We selected the variants in the three ADH minor genes *CYP7A1*, *LRP6* and *LDLRAP1* for further analysis in the whole family, but could not establish a good segregation with ADH for any of these genes. Indeed, each of the three variants is also carried by the unaffected family members II-8 and III-2 for p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*, III-3 and III-6 for p.(Val1382Phe) in *LRP6* and I-1, II-8 and III-2 for p.(Ser202His) in *LDLRAP1*. Only the *CYP7A1* and *LRP6* variants are carried by the four affected family members, whereas the variants in *LDLRAP1* are present only in the two more severely affected children (II-1 and II-7). We concluded that the combined effects of p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* and p.(Val1382Phe) in *LRP6* are needed to reveal the ADH phenotype. Furthermore, ADH becomes more severe with the addition of p.(Ser202His) in *LDLRAP1*.

While carrying the same genotype and being the more severely affected subjects, II-1 and II-7 have different LDL-C levels without treatment (7.95 vs. 10.73 mmol/L). The phenotypic variability in ADH is frequently reported as the consequence of metabolic, environmental and/or genetic factors [3]. The evaluation of the eating behavior and lifestyle of these two patients, as well as a search for modifying genetic factors, will help to understand this difference. However, the higher wPRS for subject II-7 (0.902 in decile X) compared to II-1 (0.831 in decile IX) may partially explain this phenotypic difference. The *CYP7A1* gene encodes cholesterol 7 alpha-hydroxylase, which is a 504 amino acid microsomal cytochrome P450 that catalyzes the rate-limiting reaction in the cholesterol catabolic pathway in the liver. This is the first step in the conversion of cholesterol to bile acids [34,35], and a deficiency of *CYP7A1* would decrease bile acid production and the accumulation of

cholesterol in the liver. This would lead to the retention of the Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) in the endoplasmic reticulum, the downregulation of LDL receptors, and consequent hypercholesterolemia. Several polymorphisms in *CYP7A1* were identified and associated with LDL-C levels [36,37]. Markers for cholesterol absorption, synthesis and degradation to bile acids as well as bile acids were measured in the serum of six members of the family. The results show that a marker of cholesterol absorption (cholestanol) and a marker of cholesterol degradation to bile acids (7α -hydroxy-cholesterol) are significantly lower in carriers of the p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* compared to non-carriers ($p = 0.015$, $p = 0.032$, respectively), whereas bile acids are not affected. Thus, we concluded that p.(Pro398Ala) in *CYP7A1* can participate in the elevation of the LDL-C level; however, this variant cannot solely explain the ADH phenotype in the family.

The human *LRP6* gene produces a 1613 amino acid protein that is a member of the LDL receptor family, which consists of transmembrane cell surface proteins involved in the receptor-mediated endocytosis of specific ligands [6,38]. The LRP6 receptor has a unique structure and is crucial for lipoprotein endocytosis. It also functions as an essential co-receptor for the Wnt/ β -catenin signaling pathway [19,20]. LRP6 has pleiotropic effects with an important role in cell differentiation, proliferation and migration during embryonic development. Pathogenic variants in *LRP6* are also associated with diverse human diseases [39]. The role of LRP6 in LDL metabolism was mainly studied by Mani et al., who identified the p.(Arg611Cys) missense variant in a family of Asian origin [40]. In addition to LRP6-(Arg611Cys), common variations within *LRP6* are associated with modest elevations in serum LDL in the general population. The common variant rs10845493 in *LRP6* is associated with elevated LDL levels [21] and rs2302685 (p.(Val1062Ile)) is associated with hypercholesterolemia [23]. The functional analysis of the four LRP6 variants identified in this study showed contradictory results.

We observed that the overexpression of *LRP6* in HEK293T cells had no significant effect on LDL uptake. This result differs from that of a previous study showing that overexpression of *LRP6* in CHO-K1 cells resulted in increased LDL internalization [38]. The discrepancy may be explained by the different cell types, HEK293T versus CHO-K1. Alternatively, our results show that the knockdown of *LRP6* in HuH7 cells reduce LDL uptake. This suggests that physiological levels of LRP6 are sufficient for LDL uptake in HEK293T cells and, consequently, the overexpression of LRP6 does not affect LDL uptake.

The two *LRP6* variants p.(Tyr972Cys) and p.(Thr1479Ile) significantly decrease the membrane expression of LRP6 compared to WT. This is similar to the p.(Arg611Cys) variant in human lymphoblastoid cells [41] and CHO-K1 cells [38]. However, the decreases in the membrane expression of LRP6 does not affect the expression of the LDL receptor. This result is similar to that reported for the p.(Arg611Cys) variant in NIH3T3 and in human lymphoblastoid cells [41]. We tested the effects of the p.(Arg611Cys) variant in HEK293T cells and showed a slight but not significant decrease in membrane expression of LRP6, with no effect on the expression of the LDL receptor (data not shown). Moreover, p.(Tyr972Cys), which reduced the membrane expression of LRP6, significantly increased LDL uptake compared to LRP6-WT in HEK293T cells. These results were supported by the PyMOL modeling of *LRP6* p.(Tyr972Cys) that predicted conformational changes or altered interactions of LRP6 due to the loss of polar interaction with the neighboring Glu993 residue. The effect of p.(Tyr972Cys) on LDL uptake may be due to LRP6 competition with the LDL receptor in LDL uptake. The absence of LRP6 at the cell surface may increase LDL uptake by the LDL receptor. Nevertheless, this effect may not be major or sufficient to significantly reduce LDL levels in vivo.

The p.(Val1382Phe) variant is located in the transmembrane domain of LRP6 receptor and is probably unable to internalize after binding to LDL particles. However, the variant probably does not alter LDL binding or affect the membrane expression of LRP6. We conclude that this effect may not be major or sufficient to significantly increase LDL levels in vivo.

Note that these newly identified variants in *LRP6* are not located in the same domain of the receptor and none is in the 2nd EGF domain, which is specifically needed to induce the release of bound LDL at a low pH in the endosome [41] or the 2nd β -propeller domain where the previously described variants are associated with metabolic syndrome and CVD.

The variant p. (Ser202His) in *LDLRAP1* was heterozygous in all carriers, and other heterozygous variants are known to increase LDL-C levels [15]. However, none of the family members carrying p. (Ser202His) alone presented elevated LDL-C levels, whereas the two unrelated probands with p.(Ser202His) and p.(Ser202LeufsTer19) presented elevated LDL-C levels.

Altogether, our results indicate that in the HC438 family, the combined effects of *CYP7A1*-p.(Pro398Ala) and *LRP6*-p.(Val1382Phe) are needed to reveal the ADH phenotype, which becomes more severe with the addition of the p.(Ser202His) in *LDLRAP1*. To our knowledge, no direct interactions between *CYP7A1*-related metabolism and the *LRP6* or *LDLRP1* pathways have been described. Functional studies showed that when the LDL particle binds to its receptor, *LRP6* forms a complex with the LDL receptor, *LDLRAP1* and clathrin to initiate endocytosis of the LDL receptor/LDL complex [19,38]. Thus, *LRP6* and *LDLRAP1* are essential for an efficient LDL endocytosis of the LDL. Furthermore, *LDLRAP1*-p.(Ser202His) probably worsens the effect of *LRP6*-p.(Val1382Phe), which leads to the more severe phenotype observed with the two affected family members II-1 and II-7 carrying the two variants.

It would be interesting to functionally analyze both *LRP6* and *LDLRAP1*. However, we have chosen to study the effect of each gene variant and performed the functional analyses of the four variants in *LRP6* alone. A future study will have to examine the functional analysis for both *LRP6*-p.(Val1382Phe) and *LDLRAP1*-p.(Ser202His). It will also be interesting to evaluate the effect of variants in the *CYP7A1*, *LRP6* or *LDLRAP1* genes on LDL-C levels and phenotypic variability among ADH patients with a pathogenic variant in a major ADH gene.

In summary, in the HC438 family, we identified three variants in three different ADH minor genes: p.(Pro398Ala) in *CYP7A1*, p.(Val1382Phe) in *LRP6* and p.(Ser202His) in *LDLRAP1*. We excluded a major effect of each variant alone as well as the involvement of the wPRS. Thus, an oligogenic form of hypercholesterolemia is probably present in this family and high levels of LDL-C could be caused by the cumulative effect of *LRP6* and *CYP7A1* variants, which is aggravated by the *LDLRAP1* variant.

4. Materials and Methods

4.1. Probands and Family Recruitment

Probands and family members were all of non-Finnish European origin and recruited through the French Research Network on hypercholesterolemia that includes 14 different lipid clinics in France. Affected probands and family members meet the following inclusion criteria: total and LDL-C above the 90th percentile when compared with a sex- and age-matched French population (STANISLAS cohort [42]), normal levels of triglycerides and HDL-C and autosomal dominant transmission of hypercholesterolemia in the family. Exclusion criteria included any diseases leading to secondary hypercholesterolemia. Lipid levels before the initiation of the treatment were used when available. For all subjects, the four ADH-causing genes were studied as previously reported [30]. This allowed us to identify probands in whom mutations in *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, and *APOE* were excluded. Thus the study population consisted of 160 non-*LDLR*/non-*APOB*/non-*PCSK9*/non-*APOE* probands and 1 family (HC438).

DNA analyses in human subjects were performed after informed consent was obtained from all subjects in agreement with French bioethics laws. The research project received IRB approval (research project trial #05-07-06 approved by French Consultative Committee for the Protection of Person in Biomedical Research, Paris, Necker).

4.2. Whole Genome and Exome Sequencing and Data Analysis

Whole exome sequencing (WES) was performed at the Broad Institute of Harvard and MIT (Cambridge, MA, USA) for the three affected members I-2, II-1 and II-4 from the HC438 family (Figure 1), as previously described [43]. Whole genome sequencing (WGS) was performed at the Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH, CEA, Evry, France) for the three family members (II-4, II-7 and III-4) using an Illumina HiSeq2500 platform. DNA was prepared using Illumina TruSeq DNA PCR-Free library preparation kits, according to the manufacturer's instructions. An average sequencing depth of 30x was obtained for each sample.

The VCF files from WES and WGS were analyzed conjointly using a dedicated in-house python pipeline. Variants were filtered according to (1) their quality (variant quality (Phred Qscore) > 20); (2) the genotype quality (>20) and depth (>5X); (3) the predicted consequence in terms of coding substitution and insertion/deletion (frameshift or in-frame), splice-site extending to 10 bases, UTR regions, and 1Kb upstream and downstream; (4) their frequency (minor allele frequency <0.003) based on the information available in the public databases (genome aggregation database (gnomAD) and 1000 genomes project version of August 2015); (5) their segregation with the disease in the 5 family members analyzed; and (6) their localization in a gene involved in at least 1 of the 7 pathways in which ADH genes are involved (Reactome (<https://reactome.org> (accessed on 6 November 2020)), which are cholesterol biosynthesis (R-HSA-191273), regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (R-HSA-1655829), clathrin-mediated endocytosis (R-HSA-8856828), vesicle-mediated transport (R-HSA-5653656), transport of small molecules (R-HSA-382551), digestion and absorption (R-HSA-8963743), bile acid and bile salt metabolism (R-HSA-194068)).

Finally, variants in candidate genes were sequenced in the whole family to test their segregation with the disease under the hypothesis of an autosomal dominant inheritance.

4.3. Positional Cloning

In parallel with WES and WGS, a positional cloning approach using a genome-wide scan in 14 family members was performed with 1035 polymorphic microsatellite markers from deCODE Genetics, Iceland. Parametric linkage analyses were performed with accepted parameters for ADH, which were dominant transmission of the trait, penetrance of 0.6 for heterozygotes and a frequency of the disease allele of 0.01%. The power of the family for linkage was evaluated using the FastSlink v2.51 software [44]. We used Pedcheck [45] to detect Mendelian inheritance errors. SuperLink v1.5v [46] and SimWalk v2.91 [47] softwares were used to compute two-point and multipoint LOD scores.

All these softwares were run using the easyLinkage Plus v5.00 package [48].

4.4. Sequencing and In Silico Analysis of the Variants

The coding exons of *LRP6*, *CYP7A1*, and *LDLRAP1* and their flanking exon–intron boundaries (100 pb surrounding each exon boundary) were sequenced by Sanger or by next-generation sequencing [49]. The coverage was >99% for the coding bases of the *LRP6* and *CYP7A1* genes and 90% for *LDLRAP1*, in the 160 unrelated ADH probands. The reference sequences were NM_002336.3 for *LRP6*, NM_000780.4 for *CYP7A1* and NM_015627.3 for *LDLRAP1* (GRCh37/hg19 in UCSC Genome Browser).

Novel variants were mapped to known functional domains obtained using the UniProtKB database (UniProt Knowledgebase; www.uniprot.org (accessed on 6 November 2020)). The presence and frequency of these variants in a control group representative of the French population was verified using the French Exome Project database (FREX; www.france-génomique.org/bases-de-donnees/frex-the-french-exome-project-database/ (accessed on 12 November 2021)). Their frequency in the general population was taken from the Genome Aggregation database (gnomAD; <http://gnomad.broadinstitute.org/> (accessed on 6 November 2020)). Their pathogenicity was evaluated using the Varsome tool (The Human Genomic Variant Search Engine; <https://varsome.com> (accessed on 12

November 2021)) [50], according to ACMG guidelines [33] and CADD score (Combined Annotation Dependent Deletion; <https://cadd.gs.washington.edu/snv> (accessed on 6 November 2020)). In addition, the in silico prediction tools PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping version 2; <https://genetics.bwh.harvard.edu/pph> (accessed on 6 November 2020)), Provean (Protein Variation Effect Analyzer; <https://provean.jcvi.org> (accessed on 6 November 2020)), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed on 6 November 2020)), and SpliceAI (<https://spliceailookup.broadinstitute.org> (accessed on 6 November 2020)) were used.

4.5. Construction of LRP6 Structural Models

Structural models of the wild-type and mutant human LRP6-E3E4 (PDB ID 3S8Z) were generated using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC (<http://www.pymol.org> (accessed on 6 November 2020)).

4.6. Weighted Polygenic Risk Score (wPRS) Calculation

For each individual, the wPRS was calculated using the weighted sum of the beta coefficient reported by the GLGC of the risk allele for the four selected SNPs plus the two APOE SNPs, as previously described [26,51]. wPRS were then compared to those of 3020 normocholesterolemic men and women of European ancestry from the U.K. Whitehall II (WHII) cohort study (SE Humphries and M Futema, personal communication). The probability of monogenic FH gradually increased for deciles under V, whereas scores in the top four deciles were associated with a high probability of polygenic hypercholesterolemia.

4.7. Sterol and Bile Acids Measurements

Markers of cholesterol absorption (campesterol, sitosterol, and cholestanol), cholesterol synthesis (lathosterol, lanosterol, and desmosterol), and cholesterol degradation to bile acids (7 α -hydroxy-cholesterol, 27-hydroxy-cholesterol) as well as bile acids were measured in the patient's serum with gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring, as previously described [52,53]. The values of non-cholesterol sterols and oxysterols were corrected for the cholesterol concentration (R_sterols).

4.8. Site-Directed Mutagenesis

The coding sequence of LRP6 (LRP6-WT) (NM_002336) is cloned into the 4.7 kb vector PCMV6XL4 (PcM), which encodes ampicillin resistance and is suitable for mammalian cell over-expression assays. The PcM and LRP6-WT plasmids were purchased from OriGene[®] Technologies. Mutated plasmids were generated separately by site-directed mutagenesis using a Agilent[®] Technologies QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, according to manufacturer's instruction. Briefly, the mutant strand was synthesized by a thermal cycling reaction using a high-fidelity DNA polymerase and complementary mutagenic primers. This reaction was followed by a *DpnI* digestion of the parental methylated and hemimethylated DNA. The DNA vector containing the desired variant was then amplified into XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells by ThermoFisher[®] Scientific and extracted using the NucleoBond[®] Xtra Midi Plus kit by Machery-Nagel. The constructs were verified by Sanger sequencing with primers spanning the coding sequence of LRP6.

4.9. Cell Culture and Transfection

HuH7 cells were provided by Gael NICOLAS (INSERM U1149, CNRS ERL 8252, Centre de Recherche sur l'inflammation, Paris, France) and Hek293T cells were provided by ThermoFisher Scientific. HuH7 cells and HEK293T cells were authenticated by Eurofins Scientific. Cells were cultured in 1X Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic (from Gibco[®] by ThermoFisher[®] Scientific, Waltham, MA, USA), at 37 °C under 5% CO₂ in a humid atmosphere. Routine passage was every three days. For all experiments, HuH7 and HEK293T were used at passages 2 to 10. About 800,000 HEK293T cells were seeded in 6-well plates and maintained

in complete DMEM medium (1X DMEM supplemented with 10% FBS) for 24 h before transfection. Cells were then co-transfected with the empty vector (PcM), LRP6-WT or mutated plasmids, and a plasmid containing cyan fluorescent protein (CFP or pSF-CMV-FrCFP from Oxford Genetics[®], Oxford, U.K.) to assess the transfection rate by flow cytometry analysis. Cell transfections with a total of 3 µg of DNA per well were performed with Lipofectamine[®] LTX and Plus[™] Reagent from Invitrogen[®] by ThermoFisher[®] Scientific in 1X DMEM medium supplemented with 10% FBS. At 24 h post-transfection, cells were starved for 24 h in serum-free media.

LRP6 silencing was achieved using a Silencer[®] Select siRNA targeting human LRP6 (siLRP6) from Ambion. A siNeg from Eurogentec[®] was used as a negative control. The siLRP6 sequence and siNeg sequence were not homologous to any other human gene sequence according to BLAST analysis. HuH7 cells were transfected with siLRP6 or siNeg using the reverse transfection method. Briefly, the siRNA molecule was diluted in 1X OptiMem Medium from Gibco[®] by ThermoFisher[®] Scientific in each well of a Biocoat Collagen I Cellware 6-well plate and combined with diluted Lipofectamine from Invitrogen[®] by ThermoFisher[®] Scientific to form complexes. About 400,000 HuH7 cells were suspended in 1X DMEM medium then added directly to the lipofectamine–siRNA complexes. Transfected HuH7 cells were maintained in the transfection medium until analysis.

Human EBV-transformed B-lymphocytes were cultured in suspension in RPMI-1640-glutamax medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic from Gibco[®] by ThermoFisher[®] Scientific, at 37 °C under 5% CO₂ in a humid atmosphere. The medium was partially renewed every three-to-seven days. About 2 × 10⁶ cells were seeded in 24-well plates and starved for 24 h in serum-free media before flow cytometry analysis or LDL-Bodipy treatment. About 5 × 10⁶ cells were seeded in 24-well plates. Each cell line was seeded in triplicate and starved for 24 h in serum-free media before RNA extraction.

4.10. LRP6 and LDL Receptor Cell Surface Expression

A human LRP6 APC-conjugated antibody was purchased from the R&D System and its specificity was confirmed in vitro by ELISA. The isotype control of LRP6, the PE mouse anti-human LDLR and its isotype control were purchased from BD Biosciences[®].

The cell surface expression of LRP6 and the LDL receptor in non-permeabilized and transfected HEK293T cells were analyzed by flow cytometry using antibodies that recognize the extracellular region of human LRP6 and human LDLR. The cell surface expression of the LDL receptor in human EBV-transformed B-lymphocytes was analyzed by flow cytometry using an antibody that recognized the extracellular region of human LDL receptor.

At 48 h post-transfection with LRP6-WT or mutated plasmid, HEK293T cells were washed with 1X PBS, incubated with both LRP6 and LDL receptor antibodies for 30 min at 4 °C, then analyzed by flow cytometry using an LSRII from BD Bioscience[®].

At 24 h after incubation in serum-free DMEM medium, human EBV-transformed B-lymphocytes were washed, incubated with an LDL receptor antibody for 30 min at 4 °C and analyzed on a BD Accuri[™] C6 flow cytometer.

Cell viability was assessed by LiveDead[®] staining from Invitrogen[®] by ThermoFisher[®] Scientific. The median fluorescence intensity of 100,000 events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells was analyzed. The assay was performed independently five times.

4.11. LDL Uptake

Low-Density Lipoprotein from Human Plasma, Bodipy[®] FL complex (LDL-Bodipy) was purchased from ThermoFisher[®] Scientific.

The uptake of LDL in non-permeabilized and transfected HEK293T and HuH7 cells was analyzed by flow cytometry (LSRII from BD Bioscience[®], Franklin Lakes, NJ, USA) using LDL-Bodipy. At 48 h post-transfection with LRP6-WT or mutated plasmid and 72 h post-transfection with siRNA, HEK293T and HuH7 cells were incubated in serum-

free DMEM medium with 10 µg/mL LDL-Bodipy for 4 h at 37 °C. After four hours of incubation, the medium was removed, and the cells were washed twice with ice-cold 1X PBS. Labeled HEK293T and HuH7 cells were analyzed by flow cytometry. Cell viability was assessed by LiveDead® in flow cytometry analysis. The median fluorescence intensity of 50,000 (siRNA transfection in HuH7) and 100,000 (plasmid transfection in HEK293T) events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells was analyzed. Each assay was performed in triplicate and the triplicate assays were replicated independently three times.

The LDL binding and uptake of human EBV-transformed B-lymphocytes were analyzed by FACS using LDL-Bodipy. After incubation of the human EBV-transformed B-lymphocytes in a serum-free DMEM medium for 24 h, 10 µg/mL LDL-Bodipy was added and incubation was prolonged by 4 h at 4 °C for the binding experiment or at 37 °C for the uptake experiment. The cells were washed and analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer. Cell viability was assessed by LiveDead® staining from Invitrogen® by ThermoFisher® Scientific. Median fluorescence intensity of 100,000 events was acquired for each sample, but only the median fluorescence intensity of living cells was analyzed. The assay was performed independently five times.

4.12. Protein Extraction and Western Blot Assays

Transfected HEK293T cells were lysed in Pierce® RIPA buffer from ThermoFisher® Scientific supplemented with a Halt™ Protease and Phosphatase Single-Use Inhibitor cocktail (100×) from ThermoFisher® Scientific. Proteins were extracted by centrifugation for 15 min at 14,000× g at 4 °C. The total protein concentration was quantified on Tecan® infinite 200 Pro using a Pierce™ BCA Protein Assay kit from ThermoFisher® Scientific.

Western blot assays were performed following the standard protocol. Equal quantities of protein extracts (2.5 µg) were loaded onto 4–20% Mini-Protean® TGX™ precast protein gels from BioRad®, separated by electrophoresis then transferred to Amersham hybond™—P PVDF membrane from GE Healthcare®. The membrane was blocked with 10% non-fat dry milk in TBST 0.1% for one hour at room temperature then incubated overnight at 4 °C with a recombinant anti-LRP6 antibody (ab134146) from Abcam®. The membrane was washed three times with 0.1% TBST, followed by the addition of peroxidase-conjugated affiniPure Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody from Jackson ImmunoResearch for one hour at room temperature. The membrane was then washed three times with 0.1% TBST, treated with the ECL detection kit (Clarity™ Western ECL Substrate, from BioRAD®, Hercules, CA, USA) and detected using the iBright™ FL1500 imaging system from ThermoFisher® Scientific. Protein was quantified by ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). An internal reference, β-actin, was detected using a monoclonal anti-β-actin-peroxidase antibody (AB3854) from Sigma-Aldrich. The results presented are representative of three independent experiments.

4.13. Total RNA Extraction, RT and Real-Time PCR Quantification

Total RNA was extracted from transfected HuH7 cells and human EBV-transformed B-lymphocytes using the RNeasy Mini Kit from Qiagen® according to manufacturer's instructions. RNA was eluted into RNase-free water, measured by Nanodrop spectrophotometer by Thermo Scientific® to determine the concentration and quality, then stored at –80 °C until use. cDNA was produced using random primers and SuperScript™ II Reverse Transcriptase from Invitrogen® by ThermoFisher® Scientific.

Messenger RNA expression levels of the *LRP6*, *LDLR*, *HMGCR*, *SREBP2*, and *PCSK9* genes were assessed using specific primers in HuH7 cells transfected with siRNA. mRNA expression levels of the *LRP6* gene were assessed in human EBV-transformed B-lymphocytes. Primers of target genes were mixed with Absolute Blue qPCR Mix, SYBR Green, ROX from ThermoFisher® Scientific, and the cDNA solution was diluted to 2 ng/µL. Reactions were run in triplicate for each cDNA on an Applied® Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System. The data were analyzed using the StepOne software v2.3 and Microsoft

Excel. Threshold cycle (C_T) values were used to calculate the relative quantification (RQ) of gene expression using the comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) method. Data were normalized using *POLR2A* as a reference gene. The observed differences were considered significant when the RQ is below 0.5 or above 2 [54]. The experiments were performed in triplicate.

4.14. Statistical Analysis

All variables are expressed as the mean \pm standard deviation and represent the results of four independent experiments. Bonferroni's Multiple Comparison Test in one-way ANOVA was used to assess the differences between the two groups. To ensure that variances were not significantly different between the groups, the Bartlett's test was used. A probability value of $p < 0.05$ was considered significantly different. GraphPad Prism[®] software was used for the statistical analysis and to generate the graphs.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12030262/s1>, Figure S1: Distribution of the probands in the 10 deciles of the weighted Polygenic Risk Score in the U.K. Whitehall II (WHII) cohort study; Figure S2: Conservation of the mutated amino acid in *LRP6*; Figure S3: Expression of genes implicated in cholesterol metabolism in HuH7 cells transfected with siLRP6; Figure S4: LDL binding and uptake in HEK293T after transfection with an empty vector, LRP6-WT or mutated plasmid (cells harvested without trypsin); Figure S5: Effects of transfection with WT or mutated LRP6 on membrane expression of LDL receptors; Table S1: Variants identified in the HC438 family by WES and WGS; Table S2: Linkage analysis of the variants identified in the HC438 family by WES and WGS.

Author Contributions: Funding acquisition: C.B., M.A. (Marianne Abifadel) and M.V. Conception of the work: M.V., M.A. (Marianne Abifadel) and C.B. Acquisition and analysis of data for: *probands and family recruitment*: P.M., M.D.-F., S.C., M.F., C.Y., V.C., J.F., J.-M.L. and J.-P.R.; *whole genome and exome sequencing*: B.F., A.B., R.O. and J.-F.D.; *WGS and WES data analysis*: A.P.; *positional cloning*: M.V.; *Sanger and next-generation sequencing*: Y.G., Y.A., Y.A.-K., M.V. and M.D.-F.; *In silico analysis of the variants*: Y.G.; *construction of LRP6 structural models*: A.D., G.B., M.-S.G. and B.C.; *wPRS calculation*: Y.G., M.V. and M.D.-F.; *sterol and bile acid measurements*: D.L.; *site-directed mutagenesis*: Y.G. and S.E.; *cell culture and transfection*: Y.G., S.E., P.E.K., M.A. (Miangaly Andrianirina) and G.N.; *receptor cell surface expression and LDL uptake*: Y.G., A.L., M.L.B., M.A. (Miangaly Andrianirina) and M.V.; *Western blot and real-time PCR*: Y.G., Y.A., M.A. (Miangaly Andrianirina) and Y.A.-K.; *statistical analysis*: Y.G. and M.V. Drafting the work: Y.G., M.V. and M.A. (Marianne Abifadel) Revisions: All. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Leducq Foundation (FLQ # 13CVD03), the Laboratory of Excellence GENMED (Medical Genomics) grant no. ANR-10-LABX-0013 managed by the National Research Agency (ANR), part of the Investment for the Future program, and the National Project CHOPIN (Cholesterol Personalized Innovation) granted by the National Research Agency (ANR-16-RHUS-0007), INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). Youmna Ghaleb is supported by a grant from the Lefoulon-Delalande Foundation and the International Atherosclerosis Society (IAS). Yara Azar and Yara Abou-Khalil are supported by grants from the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and the Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon; Yara Azar is supported by a grant from AMGEN funding (PCSK9013). Yara Abou-Khalil is supported by a grant from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Technologie (France) and a grant from Nouvelle Société Francophone de l'Athérosclérose (France). Geneviève Bernard received a Research Scholar Junior 1 award from the Fonds de Recherche du Québec—Santé (FRQS) (2012–2016) and the New Investigator Salary Award from the Canadian Institutes of Health Research (2017–2022).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and received IRB approval by the French Consultative Committee for the Protection of Persons in Biomedical Research, Paris, Necker (research project trial #05-07-06).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study in agreement with the French bioethics laws.

Data Availability Statement: All the data have been included in article.

Acknowledgments: We thank all family members and the proband cohort for participating in the study. We thank Sekar Kathiresan, Gina Peloso and Nathan Stitzel (Broad Institute of MIT, Boston, MA, USA) for their help in the exome sequencing experiments. Sekar Kathiresan was supported by NIH R01 HL107816. We acknowledge the use of the bioresources of the Necker DNA Biobank (BB-033-00065). We thank Silvia Friedrichs for the technical assistance in sterol and bile acid analyses by GC-MS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest related with the topic of the paper.

References

1. Nordestgaard, B.G.; Chapman, M.J.; Humphries, S.E.; Ginsberg, H.N.; Masana, L.; Descamps, O.S.; Wiklund, O.; Hegele, R.A.; Raal, F.J.; Defesche, J.C.; et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 3478–3490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Béliard, S.; Boccaro, F.; Cariou, B.; Carrié, A.; Collet, X.; Farnier, M.; Ferrières, J.; Krempf, M.; Peretti, N.; Rabès, J.-P.; et al. High burden of recurrent cardiovascular events in heterozygous familial hypercholesterolemia: The French Familial Hypercholesterolemia Registry. *Atherosclerosis* **2018**, *277*, 334–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Defesche, J.C.; Gidding, S.S.; Harada-Shiba, M.; Hegele, R.A.; Santos, R.D.; Wierzbicki, A.S. Familial hypercholesterolaemia. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Beheshti, S.O.; Madsen, C.M.; Varbo, A.; Nordestgaard, B.G. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 2553–2566. [[CrossRef](#)]
5. Berberich, A.J.; Hegele, R.A. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 9–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brown, M.S.; Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **1986**, *232*, 34–47. [[CrossRef](#)]
7. Goldstein, J.L.; Schrott, H.G.; Hazzard, W.R.; Bierman, E.L.; Motulsky, A.G. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J. Clin. Investig.* **1973**, *52*, 1544–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Innerarity, T.L.; Mahley, R.W.; Weisgraber, K.H.; Bersot, T.P.; Krauss, R.M.; Vega, G.L.; Grundy, S.M.; Friedl, W.; Davignon, J.; McCarthy, B.J. Familial defective apolipoprotein B-100: A mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 1337–1349. [[CrossRef](#)]
9. Abifadel, M.; Varret, M.; Rabès, J.-P.; Allard, D.; Ouguerram, K.; Devillers, M.; Cruaud, C.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Erlich, D.; et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 154–156. [[CrossRef](#)]
10. Marduel, M.; Carrié, A.; Sassolas, A.; Devillers, M.; Carreau, V.; Filippo, M.D.; Erlich, D.; Abifadel, M.; Marques-Pinheiro, A.; Munnich, A.; et al. Molecular Spectrum of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia in France. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, E1811–E1824. [[CrossRef](#)]
11. Garcia, C.K.; Wilund, K.; Arca, M.; Zuliani, G.; Fellin, R.; Maioli, M.; Calandra, S.; Bertolini, S.; Cossu, F.; Grishin, N.; et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* **2001**, *292*, 1394–1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fernández-Higuero, J.A.; Benito-Vicente, A.; Etxebarria, A.; Milicua, J.C.G.; Ostolaza, H.; Arrondo, J.L.R.; Martín, C. Structural changes induced by acidic pH in human apolipoprotein B-100. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. El Khoury, P.; Elbitar, S.; Ghaleb, Y.; Khalil, Y.A.; Varret, M.; Boileau, C.; Abifadel, M. PCSK9 Mutations in Familial Hypercholesterolemia: From a Groundbreaking Discovery to Anti-PCSK9 Therapies. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2017**, *19*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Khalil, Y.A.; Rabès, J.-P.; Boileau, C.; Varret, M. APOE gene variants in primary dyslipidemia. *Atherosclerosis* **2021**, *328*, 11–22. [[CrossRef](#)]
15. Tada, H.; Kawashiri, M.-A.; Nohara, A.; Inazu, A.; Mabuchi, H.; Yamagishi, M. Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolaemia. *Eur. Heart J.* **2017**, *38*, 1573–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Reeskamp, L.F.; Volta, A.; Zuurber, L.; Defesche, J.C.; Hovingh, G.K.; Grefhorst, A. ABCG5 and ABCG8 genetic variants in familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* **2020**, *14*, 207–217.e7. [[CrossRef](#)]
17. Chora, J.R.; Alves, A.C.; Medeiros, A.M.; Mariano, C.; Lobarinhas, G.; Guerra, A.; Mansilha, H.; Cortez-Pinto, H.; Bourbon, M. Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? *J. Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 477–484.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pullinger, C.R.; Eng, C.; Salen, G.; Shefer, S.; Batta, A.K.; Erickson, S.K.; Verhagen, A.; Rivera, C.R.; Mulvihill, S.J.; Malloy, M.J.; et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 109–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Go, G. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 (LRP6) Is a Novel Nutritional Therapeutic Target for Hyperlipidemia, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, and Atherosclerosis. *Nutrients* **2015**, *7*, 4453–4464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Go, G.-W.; Mani, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J. Biol. Med.* **2012**, *85*, 19–28.
21. Tomaszewski, M.; Charchar, F.J.; Barnes, T.; Gawron-Kiszka, M.; Sedkowska, A.; Podolecka, E.; Kowalczyk, J.; Rathbone, W.; Kalarus, Z.; Grzeszczak, W.; et al. A common variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 6 gene (LRP6) is associated with LDL-cholesterol. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1316–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mani, A.; Radhakrishnan, J.; Wang, H.; Mani, A.; Mani, M.-A.; Nelson-Williams, C.; Carew, K.S.; Mane, S.; Najmabadi, H.; Wu, D.; et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* **2007**, *315*, 1278–1282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Montazeri-Najafabady, N.; Dabbaghmanesh, M.H.; Mohammadian Amiri, R. The association of LRP6 rs2302685 (V1062I) polymorphism with the risk of hyperlipidemia in Iranian children and adolescents. *Ann. Hum. Genet.* **2018**, *82*, 382–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lange, L.A.; Hu, Y.; Zhang, H.; Xue, C.; Schmidt, E.M.; Tang, Z.-Z.; Bizon, C.; Lange, E.M.; Smith, J.D.; Turner, E.H.; et al. Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *94*, 233–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, J.; Dron, J.S.; Ban, M.R.; Robinson, J.F.; McIntyre, A.D.; Alazzam, M.; Zhao, P.J.; Dilliot, A.A.; Cao, H.; Huff, M.W.; et al. Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 2439–2445. [[CrossRef](#)]
26. Futema, M.; Shah, S.; Cooper, J.A.; Li, K.; Whittall, R.A.; Sharifi, M.; Goldberg, O.; Drogari, E.; Mollaki, V.; Wiegman, A.; et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin. Chem.* **2015**, *61*, 231–238. [[CrossRef](#)]
27. Rabès, J.-P.; Béliard, S.; Carrié, A. Familial hypercholesterolemia: Experience from France. *Curr. Opin. Lipidol.* **2018**, *29*, 65–71. [[CrossRef](#)]
28. Varret, M.; Abifadel, M.; Rabès, J.-P.; Boileau, C. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin. Genet.* **2008**, *73*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sjouke, B.; Defesche, J.C.; Hartgers, M.L.; Wiegman, A.; van Lennep, J.E.R.; Kastelein, J.J.; Hovingh, G.K. Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. *J. Clin. Lipidol.* **2016**, *10*, 1462–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Elbitar, S.; Susan-Resiga, D.; Ghaleb, Y.; El Khoury, P.; Peloso, G.; Stitzel, N.; Rabès, J.-P.; Carreau, V.; Hamelin, J.; Ben-Djoudi-Ouadda, A.; et al. New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1943. [[CrossRef](#)]
31. Tada, H.; Kawashiri, M.-A.; Nomura, A.; Teramoto, R.; Hosomichi, K.; Nohara, A.; Inazu, A.; Mabuchi, H.; Tajima, A.; Yamagishi, M. Oligogenic familial hypercholesterolemia, LDL cholesterol, and coronary artery disease. *J. Clin. Lipidol.* **2018**, *12*, 1436–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Haralambos, K.; Whatley, S.D.; Edwards, R.; Gingell, R.; Townsend, D.; Ashfield-Watt, P.; Lansberg, P.; Datta, D.B.N.; McDowell, I.F.W. Clinical experience of scoring criteria for Familial Hypercholesterolaemia (FH) genetic testing in Wales. *Atherosclerosis* **2015**, *240*, 190–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Danielsson, H.; Einarsson, K.; Johansson, G. Effect of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid. Bile acids and steroids 180. *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 44–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shefer, S.; Hauser, S.; Bekersky, I.; Mosbach, E.H. Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J. Lipid Res.* **1970**, *11*, 404–411. [[CrossRef](#)]
36. Couture, P.; Otvos, J.D.; Cupples, L.A.; Wilson, P.W.; Schaefer, E.J.; Ordovas, J.M. Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1883–1889. [[CrossRef](#)]
37. Teslovich, T.M.; Musunuru, K.; Smith, A.V.; Edmondson, A.C.; Stylianou, I.M.; Koseki, M.; Pirruccello, J.P.; Ripatti, S.; Chasman, D.I.; Willer, C.J.; et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **2010**, *466*, 707–713. [[CrossRef](#)]
38. Ye, Z.; Go, G.-W.; Singh, R.; Liu, W.; Keramati, A.R.; Mani, A. LRP6 protein regulates low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated LDL uptake. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1335–1344. [[CrossRef](#)]
39. Joiner, D.M.; Ke, J.; Zhong, Z.; Xu, H.E.; Williams, B.O. LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2013**, *24*, 31–39. [[CrossRef](#)]
40. Mineo, C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 1254–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Liu, W.; Mani, S.; Davis, N.R.; Sarrafzadegan, N.; Kavathas, P.B.; Mani, A. Mutation in EGFP domain of LDL receptor-related protein 6 impairs cellular LDL clearance. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 1280–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Siest, G.; Visvikis, S.; Herbeth, B.; Gueguen, R.; Vincent-Viry, M.; Sass, C.; Beaud, B.; Lecomte, E.; Steinmetz, J.; Locuty, J.; et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: The Stanislas cohort. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1998**, *36*, 35–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Stitzel, N.O.; Peloso, G.M.; Abifadel, M.; Cefalu, A.B.; Fouchier, S.; Motazacker, M.M.; Tada, H.; Larach, D.B.; Awan, Z.; Haller, J.F.; et al. Exome sequencing in suspected monogenic dyslipidemias. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2015**, *8*, 343–350. [[CrossRef](#)]
44. Schäffer, A.A.; Lemire, M.; Ott, J.; Lathrop, G.M.; Weeks, D.E. Coordinated conditional simulation with SLINK and SUP of many markers linked or associated to a trait in large pedigrees. *Hum. Hered.* **2011**, *71*, 126–134. [[CrossRef](#)]
45. O’Connell, J.R.; Weeks, D.E. PedCheck: A program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fishelson, M.; Geiger, D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2002**, *18* (Suppl. S1), S189–S198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Weeks, D.E. A likelihood-based analysis of consistent linkage of a disease locus to two nonsyntenic marker loci: Osteogenesis imperfecta versus COL1A1 and COL1A2. *Am. J. Hum. Genet.* **1990**, *47*, 592–594.
48. Lindner, T.H.; Hoffmann, K. easyLINKAGE: A PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2005**, *21*, 405–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Marmontel, O.; Rollat-Farnier, P.A.; Wozny, A.-S.; Charrière, S.; Vanhoye, X.; Simonet, T.; Chatron, N.; Collin-Chavagnac, D.; Nony, S.; Dumont, S.; et al. Development of a new expanded next-generation sequencing panel for genetic diseases involved in dyslipidemia. *Clin. Genet.* **2020**, *98*, 589–594. [[CrossRef](#)]
50. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C.E.; Albarca Aguilera, M.; Meyer, R.; Massouras, A. VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2019**, *35*, 1978–1980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ghaleb, Y.; Elbitar, S.; El Khoury, P.; Bruckert, E.; Carreau, V.; Carrié, A.; Moulin, P.; Di-Filippo, M.; Charriere, S.; Iliozer, H.; et al. Usefulness of the genetic risk score to identify phenocopies in families with familial hypercholesterolemia? *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **2018**, *26*, 570–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lütjohann, D.; Hahn, C.; Prange, W.; Sudhop, T.; Axelson, M.; Sauerbruch, T.; von Bergmann, K.; Reichel, C. Influence of rifampin on serum markers of cholesterol and bile acid synthesis in men. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, *42*, 307–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Šošić-Jurjević, B.; Lütjohann, D.; Renko, K.; Filipović, B.; Radulović, N.; Ajdžanović, V.; Trifunović, S.; Nestorović, N.; Živanović, J.; Manojlović Stojanoski, M.; et al. The isoflavones genistein and daidzein increase hepatic concentration of thyroid hormones and affect cholesterol metabolism in middle-aged male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *190*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article 6




Identification of a Variant in APOB Gene as a Major Cause of Hypobetalipoproteinemia in Lebanese Families

Carine Ayoub, **Yara Azar**, Yara Abou-Khalil, Youmna Ghaleb, Sandy Elbitar, Georges Halaby, Selim Jambart, Marie-Hélène Gannagé-Yared, Cesar Yaghi, Carole Saade Riachy, Ralph El Khoury, Jean-Pierre Rabès, Mathilde Varret, Catherine Boileau, Petra El Khoury, Marianne Abifadel

Metabolites. 2021 Aug 24;11(9):564. doi: 10.3390/metabo11090564.

Article

Identification of a Variant in *APOB* Gene as a Major Cause of Hypobetalipoproteinemia in Lebanese Families

Carine Ayoub¹, Yara Azar^{1,2,3}, Yara Abou-Khalil^{1,2,3}, Youmna Ghaleb^{1,2}, Sandy Elbitar^{1,2}, Georges Halaby⁴, Selim Jambart⁴, Marie-Hélène Gannagé-Yared^{4,5}, Cesar Yaghi^{4,5} , Carole Saade Riachy⁴, Ralph El Khoury⁴, Jean-Pierre Rabès^{2,6}, Mathilde Varret^{2,3}, Catherine Boileau^{2,3,7} , Petra El Khoury^{1,2,*} and Marianne Abifadel^{1,2,*} 

- ¹ Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie-Santé, Saint Joseph University of Beirut, Beirut 17-5208, Lebanon; carine.ayoub@net.usj.edu.lb (C.A.); yara.azar@inserm.fr (Y.A.); yara.abou-khalil@inserm.fr (Y.A.-K.); youmna.ghaleb@inserm.fr (Y.G.); sandy.el-bitar@inserm.fr (S.E.)
- ² Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), INSERM U1148, Bichat Hospital, F-75018 Paris, France; jean-pierre.rabes@aphp.fr (J.-P.R.); mathilde.varret@inserm.fr (M.V.); catherine.boileau@inserm.fr (C.B.)
- ³ Centre Hospitalo-Universitaire Xavier Bichat, Université de Paris, F-75018 Paris, France
- ⁴ Faculty of Medicine, Saint Joseph University of Beirut, Beirut 17-5208, Lebanon; mjhalaby@wise.net.lb (G.H.); selim.jambart@gmail.com (S.J.); mariehylene.yared@usj.edu.lb (M.-H.G.-Y.); cesaryaghi@gmail.com (C.Y.); carolesaaderiachy@gmail.com (C.S.R.); ralphelkhoury@gmail.com (R.E.K.)
- ⁵ Hotel Dieu de France of Beirut University Hospital, Beirut 166830, Lebanon
- ⁶ Biochemistry and Molecular Genetics Laboratory, AP-HP, Université Paris-Saclay, Ambroise Paré Hospital, Boulogne Billancourt, UVSQ, UFR Simone Veil—Santé, F-78180 Montigny-Le-Bretonneux, France
- ⁷ Genetics Department, AP-HP, Bichat Hospital, F-75018 Paris, France
- * Correspondence: petra.khoury@usj.edu.lb (P.E.K.); marianne.abifadel@usj.edu.lb (M.A.)
- † These two authors contributed equally to this work.



Citation: Ayoub, C.; Azar, Y.; Abou-Khalil, Y.; Ghaleb, Y.; Elbitar, S.; Halaby, G.; Jambart, S.; Gannagé-Yared, M.-H.; Yaghi, C.; Saade Riachy, C.; et al. Identification of a Variant in *APOB* Gene as a Major Cause of Hypobetalipoproteinemia in Lebanese Families. *Metabolites* **2021**, *11*, 564. <https://doi.org/10.3390/metabo11090564>

Academic Editor: Manfredi Rizzo

Received: 24 July 2021

Accepted: 14 August 2021

Published: 24 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Familial hypobetalipoproteinemia (FHBL) is a codominant genetic disorder characterized by reduced plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B. To our knowledge, no study on FHBL in Lebanon and the Middle East region has been reported. Therefore, we conducted genetic studies in unrelated families and probands of Lebanese origin presenting with FHBL, in order to identify the causes of this disease. We found that 71% of the recruited probands and their affected relatives were heterozygous for the p.(Arg490Trp) variant in the *APOB* gene. Haplotype analysis showed that these patients presented the same mutant haplotype. Moreover, there was a decrease in plasma levels of PCSK9 in affected individuals compared to the non-affected and a significant positive correlation between circulating PCSK9 and ApoB levels in all studied probands and their family members. Some of the p.(Arg490Trp) carriers suffered from diabetes, hepatic steatosis or neurological problems. In conclusion, the p.(Arg490Trp) pathogenic variant seems a cause of FHBL in patients from Lebanese origin, accounting for approximately 70% of the probands with FHBL presumably as a result of a founder mutation in Lebanon. This study is crucial to guide the early diagnosis, management and prevention of the associated complications of this disease.

Keywords: familial hypobetalipoproteinemia; low-density lipoprotein cholesterol; *APOB* gene; PCSK9; non-alcoholic fatty liver; diabetes; Lebanon; Middle East

1. Introduction

Familial hypobetalipoproteinemia (FHBL1, OMIM #615558) is the most common monogenic form of primary hypobetalipoproteinemia [1,2]. It is a codominant genetic disorder affecting lipoprotein metabolism, characterized by reduced plasma levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein B (ApoB) below the fifth percentile of the distribution in the general population adjusted for sex, age

and race [3–5]. The severity of the reduction depends on the gene involved, the mutation and the mode of inheritance of this disease [4]. The frequency of heterozygous FHBL in the general population is estimated to be 1:1000–1:3000 [4,6]. FHBL is caused mainly by mutations in the *APOB* gene which encodes the apolipoprotein B [2,7]. Less frequently, it is due to loss-of-function mutations in the *PCSK9* gene [2,6], a protagonist in cholesterol metabolism discovered in 2003 by identifying gain-of-function mutations in French families with familial hypercholesterolemia [8]. The *APOB* gene is located on the short arm of chromosome 2 at position 2p24.1 [9,10]. This gene encodes the apolipoprotein B that exists in the plasma in two isoforms: ApoB-100 which is the full-length protein secreted by the liver and associated with the very-low-density lipoprotein (VLDL) and its metabolic products: intermediate-density lipoprotein (IDL) and LDL, and ApoB-48 which is the intestinal variant associated with chylomicrons. ApoB-48 results from a tissue specific messenger RNA (mRNA) processing or editing in the intestine that converts codon 2153 to a stop codon [11–13]. More than 120 mutations in this gene have been reported to cause FHBL [7]. These mutations occur throughout the entire coding-region, mainly in exon 26, and are principally nucleotide substitutions (causing nonsense mutations) and deletions/insertions of a single or more nucleotides (causing frameshift mutations), and less commonly splice site mutations [3,4,14,15]. These mutations interfere with the full translation of the protein by introducing a premature stop codon in ApoB mRNA and causing the synthesis of short truncated proteins of different sizes, ranging from ApoB-2 to ApoB-89, as per a centile nomenclature (percent length of the native ApoB-100 molecule) [3,4,12]. Missense variants have also been identified [4,16]. The first missense mutation is “p.(Arg490Trp) previously reported as p.(Arg463Trp)” (c.1468C>T, rs771541567) by Burnett et al. in 2003 in an extended Lebanese family with FHBL living in Australia [16,17].

Patients who are heterozygous for mutations in the *APOB* gene are generally asymptomatic but present an increased risk of developing liver disease [18]. Truncations in the ApoB cause a defective synthesis and export of VLDL from the liver, which causes an accumulation of triglycerides (TG) in the hepatocytes [1], and thus exposes those patients to an increased risk of developing fatty liver disease (up to a 60% prevalence) [19]. Patients with homozygous or compound heterozygous FHBL present symptoms that are identical to those of abetalipoproteinemia caused by mutations in the microsomal triglyceride transfer protein (*MTP*) gene [4,11]. These principally include a fat malabsorption during the neonatal period, steatorrhea, vomiting, abdominal distension, failure to thrive, steatosis and deficiencies in fat-soluble vitamins. These symptoms improve after dietary fat restriction and supplementation with high doses of vitamins E and A. The progression of the disease can lead to atypical retinitis pigmentosa and spinocerebellar ataxia [4,11,12].

To our knowledge, no genetic study on FHBL has been conducted in the Middle East (ME) region. In fact, the ME region is characterized by a high prevalence of consanguineous marriages, metabolic syndrome, dyslipidemia characterized by low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels and high triglycerides levels, familial hypercholesterolemia (FH), diabetes [20], and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [21]. More specifically, the Lebanese population is characterized by a high frequency of dyslipidemia, particularly FH [22]. Our team has conducted several studies on dyslipidemia in the Lebanese population that allowed to characterize the mutational spectrum of FH [22], to identify the first Lebanese mutation in the *LPL* gene causing type I hyperlipoproteinemia [23], and more recently to describe the first Lebanese pathogenic variant in the *ABCA1* gene causing Tangier disease [24]. In this article, patients were recruited as part of a molecular study aiming to investigate the genetic causes of FHBL in Lebanon to improve diagnosis and prevent associated risks especially of liver diseases. We characterize FHBL in three unrelated Lebanese families and four unrelated probands and highlight the presence of a frequent pathogenic variant in the *APOB* gene responsible for this phenotype, presumably as a result of a founder effect.

2. Results

2.1. Clinical Characteristics and Biochemical Analysis of the Proband and Their Relatives

In the first family (Figure 1), the proband (II.1) was a 28-year-old Lebanese woman, referred to our laboratory by her endocrinologist at Hôtel Dieu de France hospital after perceiving very low levels of LDL-C and ApoB (0.44 mmol/L and 0.10 g/L, respectively). She was diagnosed at 32-years of age with fatty liver disease. Her father (I.1) aged 61 years also presented low levels of lipid parameters (LDL-C levels of 0.64 mmol/L and ApoB levels of 0.17 g/L) and was also diagnosed with fatty liver detected by ultrasonography. She had two sisters (II.2 and II.4) aged 25 and 16 years who also had low levels of lipid parameters (LDL-C levels of 0.44 mmol/L for both sisters and ApoB levels of 0.11 and 0.10 g/L, respectively) while her mother (I.2) (54 years old) and her brother (II.3) (21 years old) did not present low LDL-C nor ApoB levels (4.40 and 2.22 mmol/L for LDL-C levels and 1.14 and 0.57 g/L for ApoB levels, respectively) (Table 1). The father was recently diagnosed with Parkinson's disease. Family history revealed that her father's uncle had died from cirrhosis.

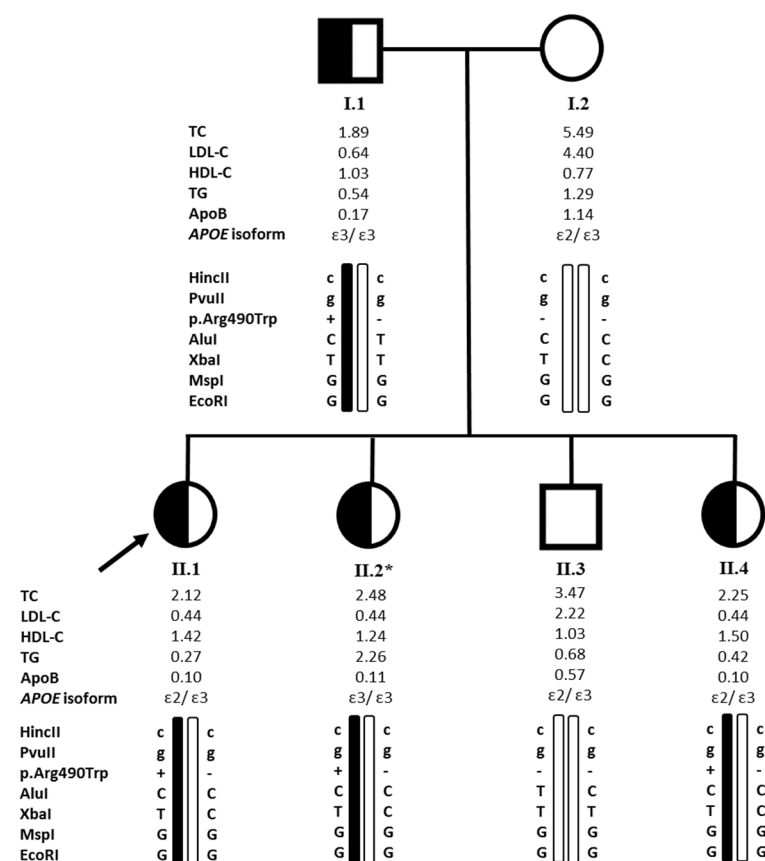


Figure 1. Pedigree of family 1 and haplotype analysis. The arrow indicates the proband. Half blackened symbols indicate heterozygous carriers of the p.(Arg490Trp) (p.(Arg463Trp), according to the original nomenclature) variant in the *APOB* gene and unblackened symbols indicate unaffected members. Filled bars indicate the allele carrying the mutation. The +/- sign indicates that the individual is heterozygous for the p.(Arg490Trp) variant and the -/- sign indicates that the individual does not carry the variant. *APOE* isoforms are also presented. TC, LDL-C, HDL-C, TG levels are given in mmol/L and ApoB levels are given in g/L. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, TC: total cholesterol, TG: triglycerides. The * sign indicates that the individual was not fasting when the blood sample was collected.

Table 1. Lipid measurements, clinical history (diabetes, liver disease and neurological problems) and genetic characteristics in the study population.

Subject	Age	Gender	TC	HDL-C	TG (mmol/L)	LDL-C [§]	LDL-C [#]	ApoB (g/L)	Plasma PCSK9 Levels (ng/mL)	Fatty Liver	Diabetes	Neurological Prob- lem	HBL	APOE Isoforms	p.Leu21dup in PCSK9	p.(Arg490Trp) in APOB
Family 1																
I.1	61	M	1.89	1.03	0.54	0.64		0.17	53.70	Yes	No	Parkinson's disease	Yes	ε3/ε3	No	Yes
I.2	54	F	5.49	0.77	1.29	4.40		1.14	67.74	No	No		No	ε2/ε3	No	No
II.1 [¥]	28	F	2.12	1.42	0.27	0.44		0.10	29.36 [¶]	Yes	No		Yes	ε2/ε3	No	Yes
II.2 [*]	25	F	2.48	1.24	2.26	0.44		0.11	34.41	No	No		Yes	ε3/ε3	No	Yes
II.3	21	M	3.47	1.03	0.68	2.22		0.57	57.02	No	No		No	ε2/ε3	No	No
II.4	16	F	2.25	1.50	0.42	0.44		0.10	34.01	No	No		Yes	ε2/ε3	No	Yes
Family 2																
I.1	93	M	4.19	0.98	2.21		2.21	N/A		N/A	Yes		No	N/A	N/A	N/A
I.2	73	F	1.84	0.93	0.47		0.70	N/A		N/A	Yes		Yes	N/A	N/A	N/A
II.1	53	M	4.16	1.73	0.71		2.11	N/A		N/A	Yes		No	N/A	N/A	N/A
II.2	52	F	2.59	1.14	1.69		0.68	0.45	68.35	No	Yes		Yes	ε3/ε3	Yes	Yes
II.3 [¥]	47	F	2.72	0.88	0.75		1.50	0.40	34.16	No	No		Yes	ε3/ε3	No	Yes
Family 3																
I.1	90	M								No	Yes	Multiple System Atro- phy	Yes	ε3/ε3	No	Yes
II.1 [¥]	60	F	2.69	1.08	0.93	1.08		0.41	68.98	No	Yes		Yes	ε3/ε3	No	Yes
Proband 4	49	M	1.60	0.88	0.59		0.45	N/A		Yes	Yes		Yes	ε3/ε3	No	Yes
Proband 5	63	F	2.38	0.96	1.41		0.78	N/A		Yes	Yes	Neuropathies	Yes	ε3/ε3	Yes	Yes
Proband 6	33	F	3.96	2.43	0.34		1.38	N/A		N/A	No		Yes	ε3/ε3	No	No
Proband 7	23	F	3.21	1.47	0.67		1.44	0.66	69.39	N/A	No		Yes	ε3/ε3	No	No
Mean ± SD			2.30	1.13 ±	0.83 ±			0.25 ±								
p.(Arg490Trp)			±	0.22	0.50		0.72 ± 0.36	0.16	48.94 ± 17.05							
carriers (n = 9)			0.38													

F: female, M: male, HBL: hypobetalipoproteinemia; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, TC: total cholesterol, TG: triglycerides, N/A: not available, SD: standard deviation. [§] Indicates that LDL-C was measured by a direct method. [#] Indicates that LDL-C value was calculated using the Friedewald formula. [¥] Indicates the proband in the family. [¶] Indicates that PCSK9 levels were measured in the serum because plasma was not available and that the value was dismissed while calculating the mean and the standard deviation in plasma. ^{*} Indicates that the individual was not fasting when the blood sample was collected and that the TG value was dismissed while calculating the mean and SD of TG levels.

In the second family (Table 1), the proband (II.3) was a 47-year-old woman presenting low levels of LDL-C (1.50 mmol/L). Her mother (I.2) and sister (II.2) aged 73 and 52 years respectively also had low LDL-C levels (0.70 and 0.68 mmol/L, respectively) and suffered from diabetes and hypertension. The sister was treated with metformin, bisoprolol and valsartan. The mother had a breast cancer and was treated with tamoxifen. Her father (I.1) aged 93 years and brother (II.1) aged 53 years did not present hypocholesterolemia (LDL-C levels of 2.21 and 2.11 mmol/L, respectively) and suffered from diabetes (Table 1). The father also presented hypertension, prostate cancer, and dyslipidemia treated by simvastatin.

In the third family (Table 1), the proband (II.1) was a 60-year-old woman who presented low LDL-C levels (1.08 mmol/L). She suffered from diabetes with an HbA1c of 8.80% and a fasting blood glucose level of 11.93 mmol/L (2.15 g/L). Her father (I.1) aged 90 years was also diabetic and presented low LDL-C levels. He was diagnosed with multiple system atrophy disease six years ago.

In addition to these families, four unrelated probands were also recruited. Proband 4 was a 49-year-old male who presented low LDL-C levels (0.45 mmol/L) (Table 1) and was a smoker. He suffered from hepatic steatosis, diabetes and hypertension and was treated by metformin, losartan, hydrochlorothiazide, amlodipine and bisoprolol. Proband 5 was a 63-year-old woman who presented hypobetalipoproteinemia (LDL-C levels of 0.78 mmol/L) (Table 1) associated with a fatty liver revealed by an abdominal ultrasonography. She also suffered from diabetes, hypertension, osteoporosis, and complained about neuropathies. Her treatment consisted of glimepiride, glargine, metformin, dapagliflozine and irbesartan. An intestinal biopsy stained with Sudan black ruled out the presence of abetalipoproteinemia. Proband 6 was a 33-year-old woman with low LDL-C levels (1.38 mmol/L) (Table 1). Proband 7 was a 23-year-old woman with low levels of LDL-C (1.44 mmol/L) (Table 1).

2.2. Genetic Analysis

We sequenced exon 11 of the *APOB* gene, in which the pathogenic c.1468 C>T variation (rs771541567) has been previously reported by Burnett et al. in an extended Lebanese family living in Australia [16,17]. It was originally designated by p.(Arg463Trp) according to the original nomenclature [16] considering the amino acid numbering of the mature protein (without the signal peptide of 27 amino acids). Thus, it corresponds to p.(Arg490Trp) according to the present international nomenclature (the first amino acid of the ApoB being the initiator methionine NP_000375.3).

In the first family, sequencing of exon 11 revealed the presence of the p.(Arg490Trp) variant at the heterozygous state in the proband (II.1) and the affected relatives (I.1, II.2 and II.4) and its absence in non-affected individuals (I.2 and II.3), highlighting a segregation with the FHBL phenotype in the family (Figure 1). In the second family, the same variant was identified at the heterozygous state in the proband (II.3) and her sister (II.2) for whom the genetic testing was available (Table 1). In the third family, genetic testing was available for the proband (II.1) and her father (I.1) who were both heterozygous for the p.(Arg490Trp) variant (Table 1). Proband 4 and 5 were also heterozygous carriers (Table 1). The variant was not found in probands 6 and 7 and was absent in the 60 non-hypocholesterolemic individuals. In total, five out of the seven recruited probands, were heterozygous for the p.(Arg490Trp) variant, which represents approximately 70% of the cases of hypobetalipoproteinemia in the present FHBL cohort and was not found in the 60 non-hypocholesterolemic controls.

Interestingly, the amino acid arginine at position 490 is well conserved among species. The p.(Arg490Trp) variant was predicted to be disease causing on Mutation Taster (Grantham Matrix score of 101), deleterious on PROVEAN (with a score of -5.204), with probably damaging consequences on the functionality of the protein according to Polyphen-2 (score of 0.996, sensitivity: 0.36; specificity: 0.97), and presented a CADD score of 34 suggesting that this variant is predicted to be among the top 0.1% of the most deleterious substitutions

in the human genome. The allele frequency of this variant is estimated to be 7.96×10^{-6} in the general population according to GnomAD.

We also sequenced all the exons of the *PCSK9* gene in which loss-of-function mutations have been associated with hypocholesterolemia [25]. The sequencing revealed that one proband (Proband 5) and the sister of Proband II.3 in family 2 (II.2) were heterozygous for the common polymorphism p.Leu21dup in exon 1 that lowers LDL-cholesterol levels [22] (Table 1).

We also sequenced exon 4 of the *APOE* gene knowing that the ApoE isoforms may be responsible for a 15–60% of LDL-C plasma levels variation in FHBL subjects versus 10% in the general population [26,27]. *APOE* sequencing revealed that in family 1, some individuals presented the E2/E3 isoforms (I.2, II.1, II.3, and II.4) while others presented the E3/E3 isoforms (I.1 and II.2) (Figure 1). The sequenced members of family 2 (II.2 and II.3) and family 3 (I.1 and II.1), as well as the four other probands (proband 4, 5, 6 and 7) presented the E3/E3 isoforms (Table 1).

2.3. The Founder p.(Arg490Trp) Variant

The relatively high frequency of the p.(Arg490Trp) variant in the present FHBL cohort and its occurrence in Lebanese families living abroad raised questions about its origin and the presence of a founder effect. Therefore, we conducted a haplotype analysis to determine whether the chromosomal background of the variation detected in some individuals is identical. The latter showed that in families 1 (Figure 1), 2 and 3, all the individuals harboring the p.(Arg490Trp) variant, as well as probands 4 and 5, carry a similar mutant haplotype (Table 2).

For the HincII and PvuII markers, all heterozygous carriers presented at both sites a nucleotide substitution which is predominant compared to the wild type nucleotide, with a prevalence of 86% and 93% respectively. For the AluI marker, all heterozygous individuals did not present a polymorphism at this site, the wild type amino acid Ala was conserved, with a prevalence of 47%. For the XbaI marker, all heterozygous individuals had a nucleotide substitution, with a prevalence of almost 50%. For the MspI and EcoRI markers, all heterozygotes had the wild type amino acid conserved. The prevalence of the wild type amino acid is respectively around 90% and 81%. These prevalences are reported in Non-Finnish European according to GnomAD and in an Austrian population reported in previous studies [28].

Table 2. Mutant haplotypes of the affected probands and relatives harboring the p.(Arg490Trp) (p.(Arg463Trp) according to the original nomenclature) variant.

Haplotype Marker	Reference SNP [29,30]	Nucleotide Change (NM_000384.3)	Amino Acid Change (Original/Present Nomenclature NP_000375.3)	Prevalence in Non-Finnish European (GnomAD)	Haplotype of the APOB-p.(Arg490Trp) Carriers				
					Proband (II.1) and Affected Members of Family 1	Proband (II.3) and Member (II.2) of Family 2	Proband (II.1) and Member (I.1) of Family 3	Proband 4	Proband 5
HincII			Intron 4		c	c	c	c	c
PvuII			Intron 4		g	g	g	g	g
Heterozygous for p.(Arg490Trp)	rs771541567	c.1468C>T	p.(Arg463Trp)/p.(Arg490Trp)	0.000017	T	T	T	T	T
AluI	rs679899	c.1853C>T	p.(Ala591Val)/p.(Ala618Val)	0.47	C	C	C	C	C
XbaI	rs693	c.7545C>T	p.(Thr2488=)/p.(Thr2515=)	0.499	T	T	T	T	T
MspI	rs1801701	c.10913G>A	p.(Arg3611Gln)/p.(Arg3638Gln)	0.091	G	G	G	G	G
EcoRI	rs1042031	c.12541G>A	p.(Glu4154Lys)/p.(Glu4181Lys)	0.182	G	G	G	G	G

2.4. Impact of the p.(Arg490Trp) Mutation on Plasma PCSK9 Levels

We measured plasma and serum PCSK9 levels in family 1 and in some of the other individuals of the present cohort, for whom plasma was available. The results are presented in Table 1 and Figure 2. In family 1, heterozygous carriers of the p.(Arg490Trp) variant (I.1, II.1, II.2, and II.4) presented an approximately 35% decrease in plasma levels of PCSK9 compared to non-affected individuals (I.2 and II.3) (mean \pm standard deviation of 40.71 ± 11.25 ng/mL versus 62.38 ± 7.58 ng/mL, respectively). In addition, we found a significant positive correlation between circulating PCSK9 and ApoB levels in all studied probands and their family members ($r = 0.81$; $p = 0.004$) as well as in FHBL patients carrying the p.(Arg490Trp) variant ($r = 0.85$; $p = 0.02$).

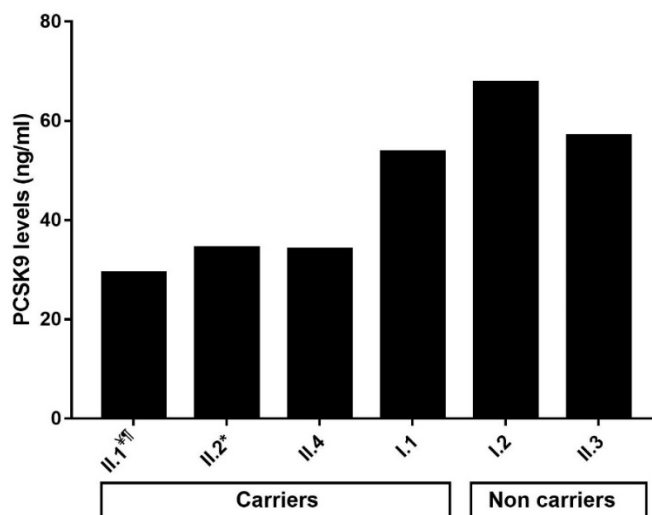


Figure 2. Levels of circulating PCSK9 in the carriers of the p.(Arg490Trp) variant and the non-carriers in family 1. [‡] Indicates the proband in the family. [¶] Indicates that PCSK9 levels were measured in the serum because plasma was not available and that the value was dismissed while calculating the mean and the standard deviation in plasma. * Indicates that the subject was not fasting when the blood sample was collected.

3. Discussion

This is the first study conducted to investigate the genetic causes of hypobetalipoproteinemia in Lebanon, and to measure PCSK9 levels in familial hypobetalipoproteinemia caused by a missense mutation. We searched for the p.(Arg490Trp) variant which was described for the first time in 2003 by Burnett et al. in an extended family with FHBL of Lebanese origin living in Australia [16,17]. This variant has a very rare frequency in GnomAD and is predicted to be pathogenic according to in silico genetic tools. Moreover, it had been detected in several unrelated hypocholesterolemic families in Italy and Canada and in individuals from Spanish and Dutch origin [3,26,31–34]. Interestingly, the family from Australia [16] and of the one from Canada [32], originated from Lebanon. In the present cohort, we found that the p.(Arg490Trp) was present in 71% of the hypocholesterolemic probands, segregated with the FHBL disease in the studied families, and was not found in 60 Lebanese controls. Thus, this variant seems a cause of FHBL in the Lebanese patients. Haplotype analysis was performed and showed that the FHBL patients harboring the p.(Arg490Trp) pathogenic variant shared as well surrounding genetic variants in a common haplotype, despite having different geographical origins within Lebanon. A founder mutation transmitted by a common ancestor is thus suspected but needs larger studies to be confirmed. Nevertheless, our results highlight the importance of investigating the genetic causes of FHBL in Lebanon, starting with the search for the p.(Arg490Trp) variant in exon 11 of *APOB*.

Moreover, two carriers of the p.(Arg490Trp) were heterozygous for the E2 allele in the *APOE* gene and two others for the p.Leu21dup in exon 1 of the *PCSK9* gene. The presence of a single E2 allele is thought to be associated with a ≈ 10 mg/dL reduction in TC compared to people with other *APOE* allele combinations [35], and the presence of the p.Leu21dup polymorphism is associated with lower cholesterol levels in populations with normal to low LDL-cholesterol levels, but also in hypercholesterolemic patients [22]. While no other mutation in the *PCSK9* gene was detected, we observed that there was a significant decrease in PCSK9 levels in affected individuals of family 1 compared to the unaffected. These results are consistent with the work of Fazio et al., who studied the association between plasma PCSK9 levels and low LDL-C levels in subjects with FHBL due to truncations in the ApoB protein and found that PCSK9 levels were decreased in subjects harboring a truncating mutation [36].

The pathogenicity of this variant has been proven in both in vitro and in vivo functional studies [16,26]. It might be a result of an enhanced binding to MTP and a retention of the protein in the endoplasmic reticulum, causing a defective lipidation, assembly and secretion of ApoB-containing lipoproteins, resulting in the development of hypobetalipoproteinemia [3,4,16,26]. Mean values of TC, LDL-C, HDL-C, and TG in FHBL heterozygous patients carrying the p.(Arg490Trp) variant included in this study, as well as the presence of fatty liver, were comparable to those reported in the literature in patients harboring the same variant [3,16,17,26,31,32]. In fact, it is known that subjects with FHBL caused by truncating variants in the *APOB* gene are at increased risk to develop fatty liver because of a defective synthesis and export of VLDL from the liver, which causes an accumulation of TG in the hepatocytes [1]. In the present study, four carriers of the p.(Arg490Trp) variant suffered from fatty liver disease and the uncle of one carrier had died from cirrhosis. Other cases of liver disease in carriers of the p.(Arg490Trp) variant were reported in the literature with either a significant increase in liver enzymes when liver ultrasonography was not performed or hepatic steatosis [3,16,26,32–34], with mild to severe forms reported in children aged 9 and 15 years [26]. Moreover, a case of NASH and liver cirrhosis with esophageal varices had been reported in a FHBL patient and his sister respectively, both harboring this variant. Interestingly, the sister who also presented hypobetalipoproteinemia suffered from type 2 diabetes [32]. Relationships between these two latest conditions have been largely investigated. A review article which was looking for a relationship between diabetes and FHBL found that the latter condition resulting from *APOB* gene variants does not seem to cause an increase in the risk of diabetes mellitus (DM) [37]. Moreover, many studies aimed to assess the relationship between hepatic steatosis caused by FHBL and insulin resistance and concluded that these two factors are not linked, even in animal models [38–40]. In our study, five individuals carrying the p.(Arg490Trp) variant were diabetic. It is uncertain whether the high frequency of diabetes among the present FHBL cohort harboring the p.(Arg490Trp) variant is due to the variant itself or to the high incidence of diabetes in the Lebanese population [41]. Therefore, in patients with FHBL, liver enzymes should be regularly monitored, and liver ultrasonography should be performed if these were elevated [42].

Another interesting observation is that three individuals from the present cohort carrying the p.(Arg490Trp) suffered from a neurological manifestation ranging from neuropathies to Parkinson's disease and multiple system atrophy. It is not clear whether the neurological disorders developed by these individuals are caused by FHBL or by other factors. In fact, Parkinson's disease [43] and a case of a severe late onset neurological disorder had been described in patients with hypobetalipoproteinemia [44], although neurological disorders and central nervous system deterioration occur mainly with abetalipoproteinemia and homozygous or compound heterozygous FHBL [3,12]. Thus, it may be essential to perform a neurological clinical evaluation on a regular basis, even in heterozygous FHBL patients, in order to instore the early appropriate treatment, and in some cases to recommend a moderate-dose vitamin E supplementation in individuals with low serum vitamin E concentration. The early diagnosis of these forms of serious late onset

complications is necessary because these latter are usually impossible to stop, once they have been developed by the patient [11,12,44].

4. Materials and Methods

4.1. Study Participants

Three unrelated families and four unrelated probands from different regions in Lebanon were recruited in collaboration with endocrinologists and gastroenterologists at the Endocrinology and Gastroenterology Clinics of Hôtel Dieu de France hospital in Beirut upon perceiving permanent low LDL-C levels (Table 1). Inclusion criteria were LDL-C levels below 1.55 mmol/L, without any secondary causes such as lipid-lowering medications, malnutrition, hepatic problems, cancer, hyperthyroidism or others [45]. For each patient, we collected the clinical and familial history. On the other hand, 60 Lebanese adult volunteers were recruited as a control group to assess the presence of the variation in the general population. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hôtel Dieu de France Hospital and Saint Joseph University of Beirut (CEHDF140).

4.2. Laboratory and Biochemical Tests

Blood samples were obtained after the subjects had fasted overnight, plasma and serum were prepared. Lipid measurements were determined on a COBAS INTEGRA[®] analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

4.3. DNA Analysis and Variant Detection

Genomic DNAs of all the participants were extracted from peripheral blood leukocytes using Flexigene[®] DNA Kit from Qiagen (Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The exon 11 of the *APOB* and all exons of the *PCSK9* genes and their flanking exon-intron boundaries, as well as the region containing the two SNPs for genotyping the *APOE* gene [46] were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced using the Sanger method. All the primers' sequences and PCR conditions are available upon request. For DNA sequence assembly and variant detection, we used the CodonCode Aligner[®] Software.

4.4. In Silico Analysis of the Variant

For frequency determination of the variant, we used the Genome Aggregation database (gnomAD; <http://gnomad.broadinstitute.org/>, accessed on 7 April 2021), and for pathogenicity prediction we used Polymorphism Phenotyping version 2 (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, accessed on 7 April 2021), Protein Variation Effect Analyzer (Provean; <http://provean.jcvi.org/index.php>, accessed on 7 April 2021), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>, accessed on 7 April 2021), and the Combined Annotation Dependent Depletion score (CADD score; <https://cadd.gs.washington.edu/snv>, accessed on 7 April 2021).

4.5. Haplotype Analysis

We conducted a haplotype analysis using a set of diallelic markers described in the literature [28]. Six common polymorphisms within the *APOB* gene caused by single base substitutions in various exons and introns distributed all over the gene [28] were amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. All the primers' sequences and PCR conditions are available upon request.

These diallelic markers resulted from the following substitutions in *APOB* gene (according to the present nomenclature of the apolipoprotein B) that modify a recognition site by a specific restriction enzyme: p.Ala618Val (AluI), p.Thr2515 (XbaI), p.Arg3638Gln (MspI), p.Glu4181Lys (EcoRI), and two occurring in intron 4 (HincII and PvuII) [28].

4.6. PCSK9 Measurements

We measured plasma and serum PCSK9 levels using a commercial ELISA kit (Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 DuoSet catalogue no. DY3888; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and the Bio-Plex Pro assay technology (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) as previously described [47].

5. Conclusions

In this article, we highlight the presence of a pathogenic variant, p.(Arg490Trp), in exon 11 of the *APOB* gene, in several Lebanese families and probands presenting with FHBL (in approximately 70% of the probands), presumably because of a founder mutation. Therefore, in the case of a patient presenting with primary hypobetalipoproteinemia or with a hepatic steatosis without any risk factors and low LDL-C levels, family investigation should be conducted in order to identify a familial aspect of the hypobetalipoproteinemia. Molecular diagnosis should be implemented by searching firstly for the p.(Arg490Trp) variant in exon 11 of the *APOB* gene. Moreover, these patients and their families should be advised on the risk of consanguineous marriage, especially that its prevalence in Lebanon was of 35.5% [48], knowing that homozygous FHBL can lead, among other complications, to serious central nervous system injuries that can lead to death if not treated early [12]. In conclusion, genetic investigation of FHBL as well as dyslipidemia in Lebanon and the Middle East is crucial in order to improve patient care, ensure an early management of the disease, and prevent its complications.

Author Contributions: Conceptualization: M.A., P.E.K.; methodology: C.A., Y.A., Y.A.-K., Y.G., S.E., P.E.K., M.A.; investigation: G.H., S.J., M.-H.G.-Y., C.Y., C.S.R., R.E.K., J.-P.R., C.A., P.E.K., M.A.; writing—original draft preparation: C.A., Y.A., Y.A.-K., Y.G., S.E., P.E.K., M.A.; writing—review and editing: C.A., P.E.K., S.E., Y.G., Y.A., Y.A.-K., M.V., C.B., J.-P.R., M.A.; supervision: M.A., P.E.K.; funding acquisition: M.A., M.V., C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; and Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Program franco-libanais CEDRE. This work was also supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); and the national project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007). Carine Ayoub, Yara Azar and Yara Abou-Khalil are supported by grants from Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon; Yara Azar is supported by a grant from an AMGEN funding. Yara Abou-Khalil is supported by a grant from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Technologie (France), and a grant from Nouvelle Société Francophone de l'Athérosclérose (France). Youmna Ghaleb is supported by a grant by the International Atherosclerosis Society (IAS).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hôtel Dieu de France Hospital and Saint Joseph University of Beirut (CEHDF140- 27 March 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the data have been included in article.

Acknowledgments: We thank all the probands and their family members for participating in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Di Costanzo, A.; Di Leo, E.; Noto, D.; Cefalù, A.B.; Minicocci, I.; Polito, L.; D'Erasmus, L.; Cantisani, V.; Spina, R.; Tarugi, P.; et al. Clinical and Biochemical Characteristics of Individuals with Low Cholesterol Syndromes: A Comparison between Familial Hypobetalipoproteinemia and Familial Combined Hypolipidemia. *J. Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 1234–1242. [[CrossRef](#)]

2. Cariou, B.; Challet-Bouju, G.; Bernard, C.; Marrec, M.; Hardouin, J.-B.; Authier, C.; Bach-Ngohou, K.; Leux, C.; Pichelin, M.; Grall-Bronnec, M. Prevalence of Hypobetalipoproteinemia and Related Psychiatric Characteristics in a Psychiatric Population: Results from the Retrospective HYPOPSY Study. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 249. [CrossRef] [PubMed]
3. Tarugi, P.; Averna, M.; Di Leo, E.; Cefalù, A.B.; Noto, D.; Magnolo, L.; Cattin, L.; Bertolini, S.; Calandra, S. Molecular Diagnosis of Hypobetalipoproteinemia: An ENID Review. *Atherosclerosis* **2007**, *195*, e19–e27. [CrossRef] [PubMed]
4. Hooper, A.J.; Burnett, J.R. Update on Primary Hypobetalipoproteinemia. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2014**, *16*, 423. [CrossRef]
5. Samson-Bouma, M.-E.; Berriot-Varoqueaux, N.; Aparicio, T.; Schmitz, J.; Aggerbeck, L. Hypocholestérolémies Génétiques: Abêtalipoprotéïnémie, Hypobêtalipoprotéïnémie Familiale, Maladie d’Anderson. *EMC Gastro-Entérol.* **2009**, *4*, 1–8. [CrossRef]
6. Rimbart, A.; Pichelin, M.; Lecointe, S.; Marrec, M.; Le Scouarnec, S.; Barrak, E.; Croyal, M.; Krempf, M.; Le Marec, H.; Redon, R.; et al. Identification of Novel APOB Mutations by Targeted Next-Generation Sequencing for the Molecular Diagnosis of Familial Hypobetalipoproteinemia. *Atherosclerosis* **2016**, *250*, 52–56. [CrossRef]
7. APOB Gene: MedlinePlus Genetics. Available online: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/apob/> (accessed on 30 March 2021).
8. Abifadel, M.; Varret, M.; Rabès, J.-P.; Allard, D.; Ouguerram, K.; Devillers, M.; Cruaud, C.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Erlich, D.; et al. Mutations in PCSK9 Cause Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 154–156. [CrossRef]
9. Ramasamy, I. Update on the Molecular Biology of Dyslipidemias. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *454*, 143–185. [CrossRef]
10. OMIM Entry—+107730—APOLIPOPROTEIN B; APOB. Available online: <https://www.omim.org/entry/107730> (accessed on 20 July 2018).
11. Hooper, A.J.; van Bockxmeer, F.M.; Burnett, J.R. Monogenic Hypocholesterolaemic Lipid Disorders and Apolipoprotein B Metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2005**, *42*, 515–545. [CrossRef]
12. Welty, F.K. Hypobetalipoproteinemia and Abetalipoproteinemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 161–168. [CrossRef] [PubMed]
13. Schonfeld, G.; Lin, X.; Yue, P. Familial Hypobetalipoproteinemia: Genetics and Metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1372–1378. [CrossRef] [PubMed]
14. Elbitar, S.; Susan-Resiga, D.; Ghaleb, Y.; El Khoury, P.; Peloso, G.; Stitzel, N.; Rabès, J.-P.; Carreau, V.; Hamelin, J.; Ben-Djoudi-Ouadda, A.; et al. New Sequencing Technologies Help Revealing Unexpected Mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1943. [CrossRef]
15. Burnett, J.R.; Bell, D.A.; Hooper, A.J.; Hegele, R.A. Clinical Utility Gene Card for: Familial Hypobetalipoproteinaemia (APOB)—Update 2014. *Eur. J. Hum. Genet.* **2015**, *23*, 890. [CrossRef] [PubMed]
16. Burnett, J.R.; Shan, J.; Miskie, B.A.; Whitfield, A.J.; Yuan, J.; Tran, K.; McKnight, C.J.; Hegele, R.A.; Yao, Z. A Novel Nontruncating APOB Gene Mutation, R463W, Causes Familial Hypobetalipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13442–13452. [CrossRef] [PubMed]
17. Burnett, J.R.; Proos, A.L.; Koutts, J.; Burnett, L. Familial Hypobetalipoproteinaemia: A Rare Presentation to the Lipid Clinic. *Med. J. Aust.* **1993**, *159*, 272–274. [CrossRef] [PubMed]
18. Burnett, J.R.; Hooper, A.J. Vitamin E and Oxidative Stress in Abetalipoproteinemia and Familial Hypobetalipoproteinemia. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *88*, 59–62. [CrossRef]
19. Heeks, L.V.; Hooper, A.J.; Adams, L.A.; Robbins, P.; Barrett, P.H.R.; van Bockxmeer, F.M.; Burnett, J.R. Non-Alcoholic Steatohepatitis-Related Cirrhosis in a Patient with APOB L343V Familial Hypobetalipoproteinaemia. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *421*, 121–125. [CrossRef]
20. Al Rasadi, K.; Almahmeed, W.; AlHabib, K.F.; Abifadel, M.; Farhan, H.A.; AlSifri, S.; Jambart, S.; Zubaid, M.; Awan, Z.; Al-Waili, K.; et al. Dyslipidaemia in the Middle East: Current Status and a Call for Action. *Atherosclerosis* **2016**, *252*, 182–187. [CrossRef]
21. Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology* **2016**, *64*, 73–84. [CrossRef]
22. Abifadel, M.; Rabès, J.-P.; Jambart, S.; Halaby, G.; Gannagé-Yared, M.-H.; Sarkis, A.; Beaino, G.; Varret, M.; Salem, N.; Corbani, S.; et al. The Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia in Lebanon: Spectrum of LDLR Mutations and Role of PCSK9 as a Modifier Gene. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, E682–E691. [CrossRef]
23. Abifadel, M.; Jambart, S.; Allard, D.; Rabès, J.-P.; Varret, M.; Derré, A.; Chouery, E.; Salem, N.; Junien, C.; Aydénian, H.; et al. Identification of the First Lebanese Mutation in the LPL Gene and Description of a Rapid Detection Method. *Clin. Genet.* **2004**, *65*, 158–161. [CrossRef]
24. El Khoury, P.; Couvert, P.; Elbitar, S.; Ghaleb, Y.; Abou-Khalil, Y.; Azar, Y.; Ayoub, C.; Superville, A.; Guérin, M.; Rabès, J.-P.; et al. Identification of the First Tangier Disease Patient in Lebanon Carrying a New Pathogenic Variant in ABCA1. *J. Clin. Lipidol.* **2018**, *12*, 1374–1382. [CrossRef]
25. Abifadel, M.; Elbitar, S.; El Khoury, P.; Ghaleb, Y.; Chémaly, M.; Moussalli, M.-L.; Rabès, J.-P.; Varret, M.; Boileau, C. Living the PCSK9 Adventure: From the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2014**, *16*, 439. [CrossRef]
26. Noto, D.; Cefalù, A.B.; Cannizzaro, A.; Minà, M.; Fayer, F.; Valenti, V.; Barbagallo, C.M.; Tuttolomondo, A.; Pinto, A.; Sciumè, C.; et al. Familial Hypobetalipoproteinemia due to Apolipoprotein B R463W Mutation Causes Intestinal Fat Accumulation and Low Postprandial Lipemia. *Atherosclerosis* **2009**, *206*, 193–198. [CrossRef] [PubMed]
27. Yue, P.; Isley, W.L.; Harris, W.S.; Rosipal, S.; Akin, C.D.; Schonfeld, G. Genetic Variants of ApoE Account for Variability of Plasma Low-Density Lipoprotein and Apolipoprotein B Levels in FHBL. *Atherosclerosis* **2005**, *178*, 107–113. [CrossRef]

28. Ludwig, E.H.; McCarthy, B.J. Haplotype Analysis of the Human Apolipoprotein B Mutation Associated with Familial Defective Apolipoprotein B100. *Am. J. Hum. Genet.* **1990**, *47*, 712–720. [[PubMed](#)]
29. Al-Bustan, S.A.; Alnaqeeb, M.A.; Annice, B.G.; Ebrahim, G.A.; Refai, T.M. Genetic Association of APOB Polymorphisms with Variation in Serum Lipid Profile among the Kuwait Population. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 157. [[CrossRef](#)]
30. Dementieva, Y.; Green, T.L.; Primerano, D.A.; Wei, L.; Denvir, J.; Wehner, P.; Dodson, S.; Flood, M.R.; Pollock, B.A.; Huff, M.; et al. Identification of Genes Contributing to Cardiovascular Disease in Overweight and Obese Individuals from West Virginia. *W. Va. Med. J.* **2012**, *108*, 23–30.
31. Fouchier, S.W.; Sankatsing, R.R.; Peter, J.; Castillo, S.; Pocovi, M.; Alonso, R.; Kastelein, J.J.P.; Defesche, J.C. High Frequency of APOB Gene Mutations Causing Familial Hypobetalipoproteinaemia in Patients of Dutch and Spanish Descent. *J. Med. Genet.* **2005**, *42*, e23. [[CrossRef](#)]
32. Lam, M.C.W.; Singham, J.; Hegele, R.A.; Riazzy, M.; Hiob, M.A.; Francis, G.; Steinbrecher, U.P. Familial Hypobetalipoproteinemia-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *Case Rep. Gastroenterol.* **2012**, *6*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fasano, T.; Cefalù, A.B.; Di Leo, E.; Noto, D.; Pollaccia, D.; Bocchi, L.; Valenti, V.; Bonardi, R.; Guardamagna, O.; Averna, M.; et al. A Novel Loss of Function Mutation of PCSK9 Gene in White Subjects with Low-Plasma Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 677–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhong, S.; Magnolo, A.L.; Sundaram, M.; Zhou, H.; Yao, E.F.; Leo, E.D.; Loria, P.; Wang, S.; Bamji-Mirza, M.; Wang, L.; et al. Nonsynonymous Mutations within APOB in Human Familial Hypobetalipoproteinemia Evidence for feedback inhibition of lipogenesis and postendoplasmic reticulum degradation of apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6453–6464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Welty, F.K.; Lahoz, C.; Tucker, K.L.; Ordovas, J.M.; Wilson, P.W.F.; Schaefer, E.J. Frequency of ApoB and ApoE Gene Mutations as Causes of Hypobetalipoproteinemia in the Framingham Offspring Population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 1745–1751. [[CrossRef](#)]
36. Fazio, S.; Minnier, J.; Shapiro, M.D.; Tsimikas, S.; Tarugi, P.; Averna, M.R.; Arca, M.; Tavori, H. Threshold Effects of Circulating Angiopoietin-Like 3 Levels on Plasma Lipoproteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *102*, 3340–3348. [[CrossRef](#)]
37. Noto, D.; Arca, M.; Tarugi, P.; Cefalù, A.B.; Barbagallo, C.M.; Averna, M.R. Association between Familial Hypobetalipoproteinemia and the Risk of Diabetes. Is This the Other Side of the Cholesterol-Diabetes Connection? A Systematic Review of Literature. *Acta Diabetol.* **2017**, *54*, 111–122. [[CrossRef](#)]
38. Amaro, A.; Fabbrini, E.; Kars, M.; Yue, P.; Schechtman, K.; Schonfeld, G.; Klein, S. Dissociation between Intrahepatic Triglyceride Content and Insulin Resistance in Familial Hypobetalipoproteinemia. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 149–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Schonfeld, G.; Yue, P.; Lin, X.; Chen, Z. Fatty Liver and Insulin Resistance: Not Always Linked. *Trans. Am. Clin. Clim. Assoc.* **2008**, *119*, 217–224.
40. Tanoli, T.; Yue, P.; Yablonskiy, D.; Schonfeld, G. Fatty Liver in Familial Hypobetalipoproteinemia: Roles of the APOB Defects, Intra-Abdominal Adipose Tissue, and Insulin Sensitivity. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 941–947. [[CrossRef](#)]
41. Members. Available online: <https://idf.org/our-network/regions-members/middle-east-and-north-africa/members/39-lebanon.html> (accessed on 3 April 2021).
42. Welty, F.K. Hypobetalipoproteinemia and Abetalipoproteinemia: Liver Disease and Cardiovascular Disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2020**, *31*, 49–55. [[CrossRef](#)]
43. Welty, F.K.; Ordovas, J.; Schaefer, E.J.; Wilson, P.W.; Young, S. Identification and Molecular Analysis of Two ApoB Gene Mutations Causing Low Plasma Cholesterol Levels. *Circulation* **1995**, *92*, 2036–2040. [[CrossRef](#)]
44. Musialik, J.; Boguszewska-Chachulska, A.; Pojda-Wilczek, D.; Gorzkowska, A.; Szymańczak, R.; Kania, M.; Kujawa-Szewieczek, A.; Wojcieszyn, M.; Hartleb, M.; Więcek, A. A Rare Mutation in The APOB Gene Associated with Neurological Manifestations in Familial Hypobetalipoproteinemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Moutzouri, E.; Elisaf, M.; Liberopoulos, E.N. Hypocholesterolemia. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2011**, *9*, 200–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhong, L.; Xie, Y.-Z.; Cao, T.-T.; Wang, Z.; Wang, T.; Li, X.; Shen, R.-C.; Xu, H.; Bu, G.; Chen, X.-F. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Apolipoprotein E Gene Polymorphism. *Mol. Neurodegener.* **2016**, *11*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. El Khoury, P.; Roussel, R.; Fumeron, F.; Abou-Khalil, Y.; Velho, G.; Mohammedi, K.; Jacob, M.-P.; Steg, P.G.; Potier, L.; Ghaleb, Y.; et al. Plasma Proprotein-Convertase-Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) and Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2018**, *20*, 943–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Barbour, B.; Salameh, P. Consanguinity in Lebanon: Prevalence, Distribution and Determinants. *J. Biosoc. Sci.* **2009**, *41*, 505–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article 7

Identification of the first Tangier disease patient in Lebanon carrying a new pathogenic variant in ABCA1

Petra El Khoury, Philippe Couvert, Sandy Elbitar, Youmna Ghaleb, Yara Abou-Khalil, **Yara Azar**, Carine Ayoub, Alexandre Superville, Maryse Guérin, Jean-Pierre Rabès, Mathilde Varret, Catherine Boileau, Selim Jambart, Philippe Giral, Alain Carrié, Wilfried Le Goff, Marianne Abifadel

J Clin Lipidol. 2018 Nov-Dec;12(6):1374-1382. doi: 10.1016/j.jacl.2018.08.013. Epub 2018 Sep 1

Identification of the first Tangier disease patient in Lebanon carrying a new pathogenic variant in *ABCA1*



Petra El Khoury, PharmD, PhD¹, Philippe Couvert, MD, PhD¹, Sandy Elbitar, PharmD, PhD, Youmna Ghaleb, PharmD, PhD, Yara Abou-Khalil, PharmD, Yara Azar, PharmD, Carine Ayoub, PharmD, Alexandre Superville, PhD, Maryse Guérin, PhD, Jean-Pierre Rabès, MD, PhD, Mathilde Varret, PhD, Catherine Boileau, PharmD, PhD, Selim Jambart, MD, Philippe Giral, MD, Alain Carrié, MD, Wilfried Le Goff, PhD¹, Marianne Abifadel, PharmD, PhD^{*,1}

Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics, Faculty of Pharmacy, Pôle Technologie– Santé, Saint Joseph University, Beirut, Lebanon (Drs. El Khoury, Elbitar, Ghaleb, Abou-Khalil, Azar, Ayoub and Abifadel); INSERM LVTS U1148, Hôpital Bichat–Claude Bernard, Paris, France (Drs. El Khoury, Elbitar, Ghaleb, Abou-Khalil, Varret, Boileau and Abifadel); Hôpitaux Universitaires Pitié–Salpêtrière–Charles Foix, Pôle de Biologie Médicale et Pathologie, Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique, Paris, France (Drs. Couvert and Carrié); Sorbonne Université, Inserm, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), UMR_S1166, Paris, France (Drs. Couvert, Superville, Guérin, Giral and Le Goff); Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, HUPIFO, hôpital Ambroise–Paré, Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Boulogne–Billancourt et UVSQ, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny–le–Bretonneux, France (Dr. Rabès); Paris Diderot University, Paris, France (Dr. Boileau); Service de Génétique, Hôpital Bichat–Claude Bernard, Paris, France (Dr. Boileau); Saint Joseph University of Beirut Faculty of Medicine, Hôtel Dieu Hospital, Beirut, Lebanon (Dr. Jambart); and Department of Endocrinology–Metabolism, AP–HP, Hôpital de la Pitié, Paris, France (Dr. Giral)

KEYWORDS:

High-density lipoprotein cholesterol;
Tangier disease;
Hypoalphalipoproteinemia;
ABCA1 transporter;
Cholesterol efflux;
Cytokines;
Lebanon

BACKGROUND: The Middle East region is characterized by low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). To date, no genetic study has investigated the cause of low HDL-C in the Lebanese population.

OBJECTIVE: Our objective was to study the genetic causes for hypoalphalipoproteinemia in a Lebanese family with extremely low HDL-C levels.

METHODS: We sequenced the *ABCA1* gene and evaluated cholesterol efflux, inflammatory, and metabolic profiles in the proband and his family.

RESULTS: We identified the first Lebanese pathogenic variant in *ABCA1* gene causing Tangier disease in a consanguineous family. The proband carried a novel homozygous pathogenic variant p.Gly592Asp in exon 14 of *ABCA1*, which segregated with the disease in the family. Functional study

¹ Those authors have equally contributed to this work.

* Corresponding author. Professor, Dean of the Faculty of Pharmacy of Saint-Joseph, University of Beirut, Laboratory of Biochemistry and Molecular Therapeutics (LBTM), Beirut, Lebanon, LVTS, INSERM U1148, CHU

Xavier Bichat Secteur Claude Bernard, 46, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

E-mail address: marianne.abi-fadel@inserm.fr

Submitted May 17, 2018. Accepted for publication August 29, 2018.

of the p.Gly592Asp pathogenic variant revealed that lipid-free apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux was completely abolished in cholesterol-loaded human monocytes-derived macrophages isolated from the proband when compared to controls. Systemic inflammatory and metabolic assessments showed that plasma cytokines (MCP-1, MIP-1 α , IL-6, CRP, TNF- α), adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin), inflammatory soluble receptors (sIL-6r, sTNFR1, sTNFR2), and metabolic markers (Insulin, C-peptide) were elevated in the proband when compared to controls. Noninvasive cardiovascular investigation revealed the presence of premature artery lesions in the proband.

CONCLUSIONS: It is the first case of Tangier disease reported in Lebanon harboring a novel pathogenic variant in *ABCA1*. Further genetic research is needed in the Middle East where the consanguinity rate is elevated, to understand the cause of the highly prevalent dyslipidemia. This will help guiding the early diagnosis, management, and prevention of cardiovascular complications.

© 2018 National Lipid Association. All rights reserved.

Introduction

The Middle East (ME) region is characterized by a high prevalence of metabolic syndrome, diabetes, familial hypercholesterolemia (FH), consanguineous marriages, and a pattern of dyslipidemia with low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and high levels of triglycerides (TG).¹ Several gaps in the management of dyslipidemia in the ME region constitute huge concern to prevent cardiovascular diseases (CVD). Lebanon is known for its high frequency of FH due to a mutation in the low-density lipoprotein (LDL) receptor with a founder effect.^{2–4} The frequency of homozygous (Ho) FH is more than 10-fold higher in Lebanon than in other populations.^{2–4} This is likely attributable to a high prevalence of heterozygous (He) FH among Lebanese people, coupled with a high incidence of consanguinity. The genetic cause of FH has been well documented;^{2,4} nevertheless, to date, no genetic study has investigated the cause of low HDL-C levels in the Lebanese population, knowing that these low HDL-C levels have been noticed in few studies.⁵

Epidemiological studies have consistently demonstrated an inverse association between plasma HDL-C levels and coronary heart disease.^{6–9} HDL particles play a key role in the reverse cholesterol transport from peripheral cells to the liver for biliary excretion.¹⁰ *ABCA1* or ATP-binding cassette transporter A1, a major determinant of HDL-C levels in plasma, is abundantly expressed in arterial wall macrophages and plays a crucial role in mediating cholesterol and phospholipid (PL) efflux to lipid-poor apolipoprotein A-I (ApoA-I) or pre β -HDL particles.^{11–14} Indeed, in an initial step of HDL biogenesis, lipid-free ApoA-I interacts with the extracellular loops of *ABCA1*.¹⁵

Tangier disease (TD), a rare autosomal recessive disorder, is caused by mutations in *ABCA1* encoding the ATP-binding cassette subfamily A member 1 protein that lead to extreme low levels of HDL-C and ApoA-I.¹⁶ Typical yellow orange tonsils caused by accumulation of cholesterol esters in macrophages characterize TD patients. Some TD patients also exhibit peripheral neuropathy,¹⁷ splenomegaly, anemia, thrombocytopenia,¹⁸ and corneal opacification.¹⁹ *ABCA1* deficiency impairs cholesterol efflux to ApoA-I and prevents their

conversion into pre β -HDL and maturation into larger HDL particles.^{20,21} Cholesterol efflux assays in primary fibroblast cell lines, heterozygote for *ABCA1* mutations, display levels between 35% and 75% of wild-type cholesterol efflux.^{22,23}

To date, more than 180 mutations in *ABCA1* gene have been reported and they have been associated with various molecular, biochemical, and clinical phenotypes.^{24–26} Remarkably, not all patients with TD developed an increase in tonsils size or a change in their color^{27–29} and not all of them experienced premature CVD. Studies that have investigated the association between single nucleotide polymorphisms in the *ABCA1* gene and the susceptibility to atherosclerosis led to conflicting results.^{24,30–32} Hence, studies of rare inherited disorders provide an excellent strategy to discover new mechanisms in complex disorders such as the atherosclerotic disease.

In this article, we identified the first Lebanese pathogenic variant in the *ABCA1* gene causing TD in a consanguineous family and explored its functional impact by evaluating macrophage cholesterol efflux, systemic inflammatory, and metabolic profiles. The proband was recruited as part of a molecular study aiming to identify the genetic causes for low HDL-C levels in Lebanese families.

Methods

Laboratory and biochemical tests

Blood samples were obtained after the subjects had fasted overnight; plasma and serum were prepared. The lipid (TG, PL, total cholesterol (TC), free cholesterol, HDL-C) and protein (total protein, ApoA-I, ApoA-II, ApoB, and ApoE) contents in plasma were quantified with an Autoanalyzer (Konelab 20). Reagent kits from Roche Diagnostics and ThermoElectron were used for determination of TC and TG levels, respectively. The levels of unesterified cholesterol and PL were determined with commercial reagent kits (Diasys). Cholesteryl ester mass was calculated as (TC-free cholesterol) \times 1.67, and thus represents the sum of the esterified cholesterol and fatty acid moieties. The Bicinchoninic acid assay reagent (Pierce) was utilized for protein quantification.

Fasting plasma LDL-C was calculated using the Friedwald formula. HDL-C levels were determined after dextran sulfate magnesium precipitation of apoB-containing lipoproteins. Plasma ApoA-I, ApoB, and ApoA-II concentrations were determined using immunoturbidimetric assays (ThermoElectron reagents and calibrators; Diasys reagents and calibrators).

Analysis of circulating biomolecules

Adhesion molecules and inflammatory cytokines in plasma from controls and patients were quantified using a semiautomated Biochip Array Technology analyzer (Evidence Investigator, Randox) as previously described.³³ Quantification of the circulating biomolecules from each plasma sample obtained from a single carrier was tested in duplicate or triplicate when a sufficient amount of plasma was available. A group of 18 normolipidemic healthy control individuals (9 males and 9 females, aged 23 to 78 years with a mean age: 63 ± 13 years) was included as a reference group for the quantification of circulating biomolecules.

DNA analysis and variant detection

DNA of the index case and his family members was extracted from peripheral blood leukocytes by a standard procedure.³⁴ The 4 exons of *APOA1*, 6 exons of *LCAT*, and 50 exons of *ABCA1* genes were amplified by polymerase chain reaction using intronic primers (Supplemental Table 1) and sequenced by Dye Terminator method. Furthermore, 50 Lebanese healthy normolipidemic volunteers (23 males, 27 females) were investigated as a control group for DNA study. All patients and controls gave informed consent for the study.

Monocytes isolation

Monocytes were isolated from the blood of one control individual or from the proband (IV-1) by Ficoll gradients (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and subsequently differentiated into human macrophages (human monocytes-derived macrophages [HMDM]) by adhesion on plastic Primaria plates (Falcon) over a period of 10 days of culture in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated human serum, 2 mmol/L glutamine, 100 μ g/mL penicillin/streptomycin, and 20 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor.³⁵

Radioisotopic cholesterol efflux assays

Assessment of macrophage cholesterol efflux was performed as previously described.³⁵ More details are given in [supplementary material and methods](#).

IMT measurements and plaque assessment

Intima-media thickness measurements and plaque assessment were made using ultrasound according to previously published methods.³⁶

Coronary artery calcification assessment

Each patient underwent a multidetector computed tomography (CT) scan (Siemens syngo.CT CaScoring). Coronary artery calcification was quantified by means of the previously described Agatston scoring method.³⁷

Results

Clinical characteristics of the index case and his family members

The proband, born on 1968, is a Lebanese male (80 kg, 1m74), who has been referred to the lipid clinic at Hôtel Dieu de France hospital in Beirut, in 2003, with very low/undetectable levels of HDL-C and ApoA-I. His TC, LDL-C, and TG levels were 2.26 mmol/L (88 mg/dL), 0.84 mmol/L (32.7 mg/dL), and 3.11 mmol/L (275.2 mg/dL), respectively (Fig. 1). These very low HDL-C levels are confirmed in several measurements (Supplemental Table 2). Fasting glucose levels of the proband were of 5 mmol/L (90 mg/dL), and his HbA1c was of 4.4%. He showed thrombocytopenia (platelets count varying from 71,000 to 112,000 per mm^3 of blood) and a hearing impairment (puretone audiometry revealed moderate sloping to severe mixed hearing loss, bilaterally) due to bilateral otosclerosis. He was a nonsmoker. He has been diagnosed with TD in 2003 at 35 years old but he did not show the typical TD phenotype, in particular he had no tonsillar abnormality, no lymphadenopathy, and no signs of hepatosplenomegaly by abdominal ultrasound or evidence of motor and sensory neuropathy.

The family at large was investigated and its pedigree (Fig. 1) was drawn. This study showed that the proband's father and mother were first cousins. Seven family members were also investigated. No history of CVD was noted in the family except for the uncle III-3 who died from stroke at 55 years old.

Biochemical analysis

The proband (IV-1, Fig. 1) was diagnosed with TD at 35 years old, with very low HDL-C and ApoA-I levels at several independent measurements at separate times, thrombocytopenia and hearing impairment.

Biochemical analysis (Table 1) revealed extreme low levels of HDL-C (0.05 mmol/L or 1.95 mg/dL) and low levels of TC (2.32 mmol/L or 90.34 mg/dL), LDL-C (0.90 mmol/L or 35.05 mg/dL), and PL (1.44 mmol/L) in the proband (IV-1). Levels of TG were elevated in the proband IV-1 (3.00 mmol/L or 265.49 mg/dL). He had as well undetectable levels of ApoA-I (0.10 g/L) and ApoA-II (0.05 g/L). As shown in Table 1, levels of ApoA-I were also reduced in the proband's father III-4 (ApoA-I: 0.88 g/L) and mother III-5 (ApoA-I: 1.13 g/L), whereas

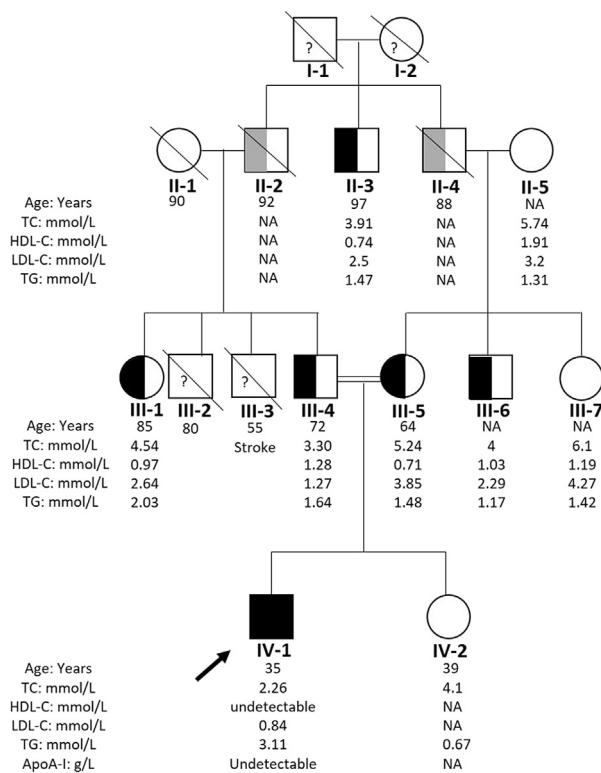


Figure 1 Pedigree of the family with low HDL-C levels and segregation of the pathogenic variant in the family. The proband IV-1, indicated by a black arrow, was identified at the Lipid Clinic at Hôtel Dieu de France hospital. The family at large was investigated, and a pedigree was drawn. One homozygous carrier (IV-1) and 5 heterozygous carriers (II-3, III-1, III-4, III-5, III-6) of the p.Gly592Asp variation were identified. Blackened symbols indicate affected homozygous carrier, half blackened symbols indicate heterozygous carriers, unblackened symbols indicate noncarrier of the p.Gly592Asp. Gray symbols indicate (nongenotyped) obligate carriers. Age is given in years, at lipid measurements, when available. TC, HDL-C, LDL-C, and TG levels are given in mmol/L when available. NA = not available. “?” unknown status, not genotyped. HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; TC, total cholesterol.

those of HDL-C were reduced in the proband’s mother III-5 (HDL-C: 0.72 mmol/L or 28.04 mg/dL) and aunt III-1 (HDL-C: 0.98 mmol/L or 38.16 mg/dL). Unfortunately, not all lipid measurements of the proband’s sister IV-2 are available. TC level was of 4.1 mmol/L (163 mg/dL) and TG levels were of 0.68 mmol/L (60 mg/dL).

Genetic analysis

Familial hypoalphalipoproteinemia with an autosomal recessive inheritance pattern was suspected on the basis of the combination of a very low HDL-C and a family history of consanguinity. Hence, we performed a molecular diagnosis of TD by sequencing the 50 exons of *ABCA1* gene. We identified in the proband a novel homozygous c.1775 GC > AT variation in exon 14 resulting in a

substitution at position 592, p.Gly592Asp the glycine, being a nonpolar neutral amino acid well conserved among species, whereas aspartic acid is a polar ionizable amino acid (NP 005493.2) (Fig. 2), negatively charged at physiological pH.

Sequencing of exon 14 in the proband’s family members (Fig. 1) revealed that both parents (III-4, III-5) were heterozygous for the same c.1775 GC > AT variation, whereas, the proband’s sister (IV-2) did not carry this variation. Further investigation of the family reveals that other siblings (II-3, III-1, III-6) of the index case were heterozygous carriers of c.1775 GC > AT variation.

To ascertain whether the c.1775 GC > AT was a rare pathogenic variant or a common polymorphism in the Lebanese population, we sequenced exon 14 of the *ABCA1* gene in 50 normolipidemic controls. None of them were found to be a carrier of this variation. Furthermore, this variation was not reported before in the literature or in genetic databases. Interestingly, *in silico* prediction tools revealed that this is a deleterious variation (SIFTv6.2.0-score: 0, median: 4.32) with probably damaging (polyphen-2, sensitivity: 0.36; specificity: 0.97) consequences on the functionality of the protein. Indeed, physicochemical difference between glycine and aspartic acid is important (Grantham distance: 94 [0-215]), and the glycine at position 592 of *ABCA1* is a highly conserved amino acid among species (12 species, Fig. 2A). Therefore, it is likely that p.Gly592Asp is a novel pathogenic variant in *ABCA1* potentially responsible of TD in the proband. It is noteworthy that *APOA1* and *LCAT* genes have been sequenced and no variant was identified.

Functionality analysis: cholesterol efflux measurement

As p.Gly592Asp is likely a novel pathogenic variant, its functional impact on cholesterol homeostasis in macrophages has never been assessed before. Therefore, peripheral monocytes were isolated from the total blood of the proband and from a control individual and were differentiated into macrophages (HMDM). We examined cholesterol efflux to ApoA-I and HDL from patient’s and control’s HMDM labeled with [³H] cholesterol (Fig. 3). Interestingly, lipid-free ApoA-I-dependent cholesterol efflux after 4 hours or 24 hours of incubation was almost completely abolished in the proband’s HMDM as compared to the control’s HMDM. In addition, cholesterol efflux to HDL was lower in *ABCA1*-mutated HMDM than in control HMDM as previously observed in fibroblasts³⁸ and macrophages from TD patients.³⁵

Inflammatory phenotype and metabolic assessment

Recent study has demonstrated that *ABCA1* mutation carriers have a systemic inflammatory phenotype.³⁹ Thus, we aimed to assess the inflammatory profile in the patient

Table 1 Lipid parameters of the proband IV-1, his parents (III-4-father; III-5-mother), his paternal aunt (III-1), as well as normolipidemic controls

Lipid parameters	IV-1	III-4	III-5	III-1	Controls (n = 6) Mean ± SD	Usual concentrations
HDL-C (mmol/L)	0.05	1.28	0.72	0.98	1.71 ± 0.36	1.02–1.60
TC (mmol/L)	2.32	3.31	5.25	4.55	5.37 ± 0.77	4.10–6.60
LDL-C (mmol/L)	0.90	1.28	3.86	2.65	3.26 ± 0.55	1.70–3.50
TG (mmol/L)	3.00	1.64	1.48	2.03	0.90 ± 0.13	0.50–2.10
PL (mmol/L)	1.44	1.75	2.61	1.71	2.78 ± 0.42	1.68–3.35
ApoA-I (g/L)	0.10	0.88	1.13	1.53	1.67 ± 0.23	1.20–1.70
ApoA-II (g/L)	0.05	0.49	0.35	0.34	0.38 ± 0.07	0.32–0.54
Apo-B (g/L)	1.10	0.80	1.38	1.18	1.00 ± 0.14	0.60–1.30
Apo-E (mg/dL)	3.10	3.33	4.10	5.45	4.48 ± 0.82	2.30–6.30
ApoC-III (mg/dL)	8.00	3.30	9.10	7.60	9.70 ± 1.47	7.50–20.50

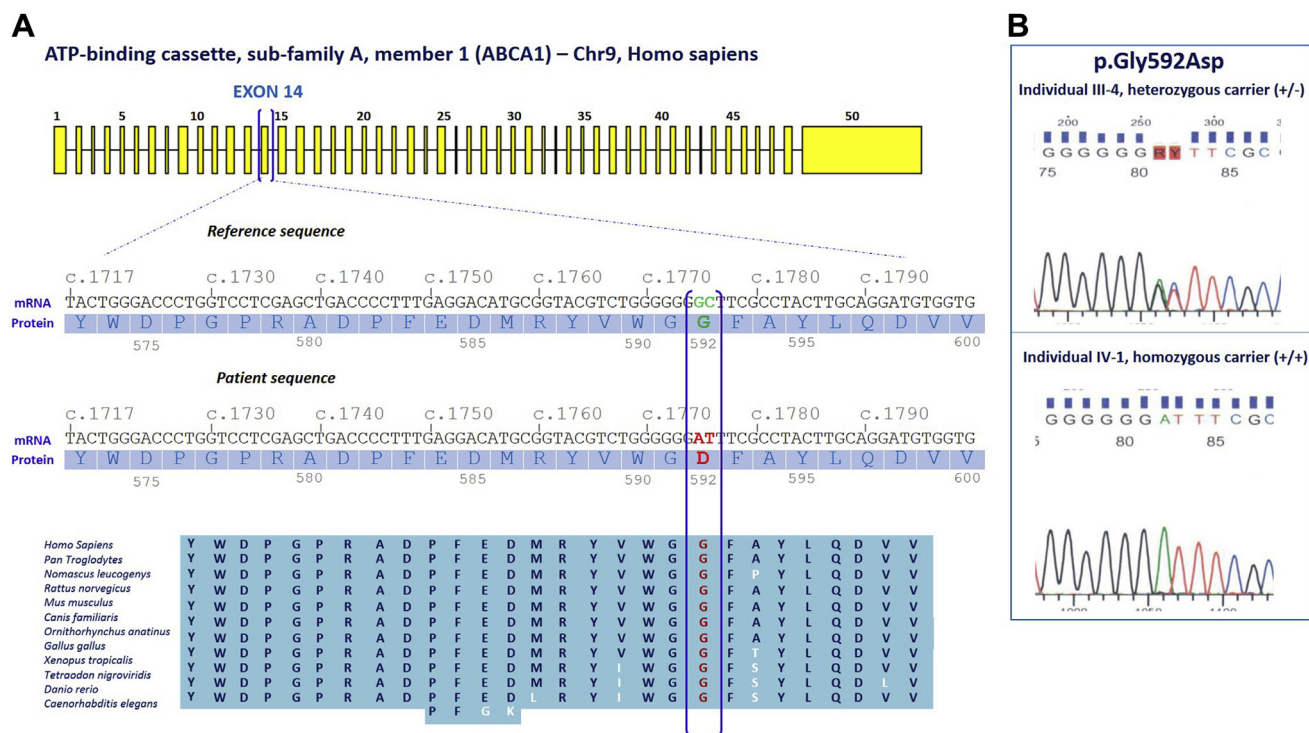
ApoA-I, apolipoprotein A-I; ApoA-II, apolipoprotein A-II; Apo-B, apolipoprotein (B); HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; PL, phospholipids.

and his family. Plasma cytokines, adhesion molecules, as well as soluble receptors were measured in the homozygous patient (Proband: IV-1) as well as in three heterozygous siblings (Father: III-4, mother: III-5, and aunt: III-1) (Supplemental Table 3). We observed a variable cytokine profile in the proband and his family. As a whole, the proband (IV-1) appeared however to exhibit higher circulating amounts of inflammatory cytokines (MCP-1, MIP-1 α , IL-6, CRP, TNF- α), adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin), and soluble receptors (sIL-6r, sTNFR1, sTNFR2) than control individuals.

Serum markers of metabolic syndrome were measured in the index case (IV-1) and his relatives (III-1, III-4, III-5) (Supplemental Table 4). A marked increase of insulin and C-peptide together with a reduction of leptin and adiponectin was detected in the index case in comparison to controls.

Cardiovascular investigation

The proband had subclinical premature atherosclerotic lesions. On one hand, carotid ultrasound investigation led to the identification of bilateral bulbar 2.5-3 mm thickness



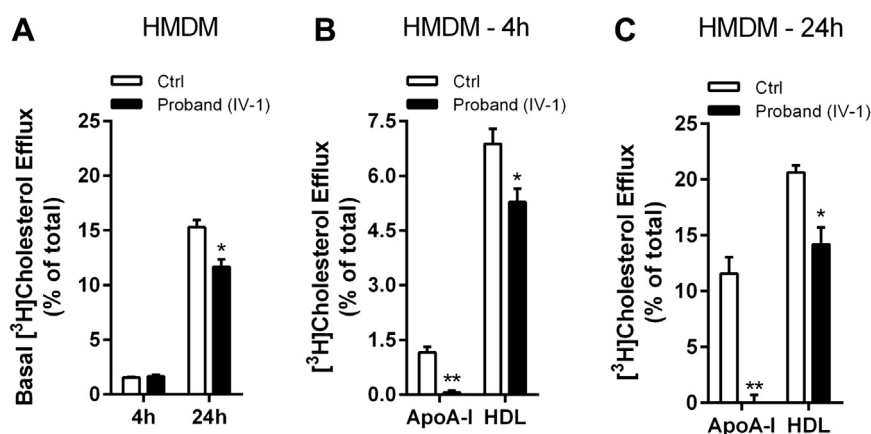


Figure 3 Lack of cholesterol efflux to ApoA-I from ABCA1-mutated macrophages. Cholesterol efflux in the absence of exogenous cholesterol acceptors (A) or to lipid-free ApoA-I or HDL for 4 hours (B) or 24 hours (C) chase period in HMDM from the proband (IV-1) or from one normolipidemic control (Ctrl) individual. Values are mean \pm S.E.M. * $P < .05$ and ** $P < .005$ versus Ctrl. HMDM, human monocytes-derived macrophages.

hypocholesterolemia plaques ($\geq 25\%$ diameter narrowing). On the other hand, cardiac CT revealed the presence of premature artery lesions above the 90th percentile of below 50-years-old men and allowed the determination of a coronary calcium score of 185. Other CV tests such as rest electrocardiography were normal.

Discussion

In this report, we describe the first case of TD kindred in Lebanon harboring a novel variation in the *ABCA1* gene, the p.Gly592Asp. Further explorations showed that this pathogenic variant occurs in the first extracellular domain (ECD) of ABCA1, a region known to be functionally critical for the transporter. Human ABCA1 is composed of 2261 amino acids (aa) containing 2 transmembrane domains, each consisting of 6 transmembrane (TM) helix followed by a cytoplasmic region²⁵ comprising one nucleotide-binding domain and one small regulatory domain (R).^{40,41} The nucleotide-binding domains and R domains are the most conserved elements among the ABCA subfamily.⁴² ABCA1 has two large ECDs, ECD1 between TM1 and TM2 and ECD2 between TM7 and TM8,^{42,43} and it is suggested that these ECDs are responsible for binding to ApoA-I. The ECD1 of ABCA1 consists of 583 aa (residues 47-629),⁴¹ pointing out that the novel pathogenic variant p.Gly592Asp we identified is located in this region as many other missense mutations previously described.²⁴ A recent study by Qian H et al.⁴¹ has characterized the cryo-electron microscopy structure of human ABCA1. Interestingly, they showed that ECD1 and ECD2 together enclose an elongated tunnel that is predominantly hydrophobic. As ECD is responsible for the interaction with ApoA-I,^{12,44} the authors suggest that this tunnel may serve as a potentially temporary storage or delivery passage for lipids such as cholesterol and PL. Structural mapping of p.Trp590Ser, a single point mutation that reduces PL translocation,^{45,46} reveals that Trp590 is in the vicinity of the

bottom of the extracellular tunnel suggesting a potential involvement of this residue in the translocation of lipids from transmembrane domain to ECD.⁴¹ This newly identified pathogenic variant p.Gly592Asp is located 2 aa away from the p.Trp590Ser, and both mutations have a high Grantham score. Then, the p.Gly592Asp pathogenic variant is very likely also located in the hydrophobic tunnel of the ECDs and might also impair lipid delivery to ApoA-I. Its proximity to the p.Trp590Ser mutation suggests that our newly identified pathogenic variant may be classified among the second group of *ABCA1* mutations, which is defined as the lipid translocation defective mutants, as proposed by Wang and Smith.⁴⁷ In agreement with this model, functional testing of the p.Gly592Asp pathogenic variant in the proband's macrophages confirmed that the mutant ABCA1 failed to mediate cholesterol efflux to ApoA-I. However, a structure mapping and further functional studies are needed to confirm the exact location of the p.Gly592Asp and its impact on ABCA1 function.

Interestingly, our results showed that beyond the almost complete abolishment of cholesterol efflux to ApoA-I, a significant reduction of cholesterol efflux from ABCA1-mutated macrophages to HDL particles was also observed. These findings are in agreement with previous studies indicating that ABCA1 is also an important mediator of macrophage cholesterol efflux to HDL³⁵ demonstrating most marked efficiency with small, dense HDL subfractions (HDL3b and HDL3c).⁴⁸ As liver and intestine expressions of ABCA1 were reported to be the major contributors to HDL biogenesis,¹¹ the quasi absence of ApoA-I and HDL observed in the proband suggests that the p.Gly592Asp pathogenic variant is equally functional in these tissues.

HDL particles possess multiple biological activities among which a potent anti-inflammatory property as illustrated by the negative correlation between HDL-C and systemic markers of inflammation.⁴⁹ In the present study, we observed that circulating levels of MCP-1, MIP-1 α , ICAM-1, VCAM-1, and E-SEL were elevated in the patient

and his family suggesting a proatherogenic status. Bochem et al.³⁹ have demonstrated that heterozygous and homozygous *ABCA1* pathogenic variant carriers displayed an increased proinflammatory plasma cytokine profile characterized by an elevation in TNF- α , MCP-1, and IL-6 levels. Interestingly, both the homozygous proband and the heterozygous family members exhibited higher systemic inflammation despite distinct plasma HDL-C concentrations ranging from total deficiency (Proband, IV-1) to normal plasma level (Proband's father, III-4). These observations clearly indicate that the proinflammatory status of *ABCA1*-mutated patients does not only result from the arithmetic value of HDL-C. Similar results were obtained by Bochem et al.³⁹ who proposed that the increased inflammation in *ABCA1*-mutated patients may be the consequence of *ABCA1* defect both at the cellular (macrophage lipid raft formation) and the plasma (HDL-C) levels.

Evaluation of cardiovascular risk in patients carrying biallelic *ABCA1* mutations is subject of debate mostly because of the low number of available patients. Interestingly, the proband described in the present study does not present any coronary artery disease risk factor except a very low plasma HDL-C level; plasma LDL-C level being even also very low (Table 1). Nevertheless, the TD patient has premature atherosclerotic lesion in carotid arteries as shown by the carotid ultrasound and a very premature coronary artery lesion above the 90th percentile of below 50-years-old men.⁵⁰ This increase in baseline subclinical atherosclerosis in young adults as observed in the patient reported in our study would likely translate into substantial differences in lifetime risk for CVD. Indeed, it has been shown that among individuals ≤ 50 years of age, those with low 10-year but high lifetime predicted risk have a greater burden and progression of subclinical atherosclerosis such as coronary artery calcification and carotid intima-media thickness compared to those with low 10-year and low predicted lifetime risk.^{50–52}

In our study, *ABCA1* homozygous patient had high fasting insulin and peptide C levels, whereas fasting glycemia was within the normal values. A recent study has demonstrated that the oral glucose tolerance test was enhanced in the *ABCA1* homozygous subjects compared with the control subjects, a finding associated with higher insulin levels.⁵³ However, the impact of the *ABCA1* deficiency on the insulin secretion is still matter of debate.^{54–56} The mechanism for the higher insulin levels with *ABCA1* loss of function in our study is unknown and evaluation of insulin resistance and secretion in the proband would be useful to determine the impact of this novel pathogenic variant on β -cell activity.

Finally, the proband also exhibited bilateral hearing impairment and probably angiomyolipoma in the kidney, and these two symptoms have been recently reported in a TD patient.⁵⁷

Conclusions

In this report, we describe the first case of TD in Lebanon harboring a novel pathogenic variant in the

ABCA1 gene, the p.Gly592Asp, and subclinical atherosclerosis. The CVD-associated mortality rate in the ME is one of the highest in the world.⁵⁸ Patients in the ME who present with heart attacks are 10–12 years younger than those in Western countries.^{59,60} There are few studies regarding the prevalence of dyslipidaemia in the ME.^{61–63} In this report, we describe the first pathogenic variant in *ABCA1* in the Lebanese population. It is the first case of TD reported in Lebanon and in the neighboring countries, whereas very few have been reported in Turkey.^{64,65} Few studies have evaluated the dyslipidemic profile in the Lebanese population. A study performed by Aydenian et al.⁵ in 1999 showed that the Lebanese population has a significant percentage of subjects with lipid levels higher than those recommended by the NCEP, 19% for TC, 27% for LDL cholesterol, and 20% for Lp(a). Importantly this study showed that 57% of women and 73% of men showed HDL-C levels below 1.4 mmol/L and 1.15 mmol/L, respectively. This is one of the rare studies performed in Lebanon highlighting the magnitude of dyslipidemia. Therefore, genetic screening of individuals with very low HDL-C levels in Lebanon is very important to search for the new pathogenic variant identified in this article as well as identifying other mutations in genes known to be implicated in hypoalphalipoproteinemia such as *APOA1* and *LCAT*.

Identification and characterization of new mutations in CVD is highly important in the ME region because the consanguinity rate is very elevated. Genetic research is needed to understand the cause of the highly prevalent dyslipidemia and to guide its management. Early screening of those mutations, as well as education of patients to adopt a healthy lifestyle, can lead to installation of prevention and rapid treatment strategies, to reduce the risk of premature CVD in the ME.

Acknowledgments

Authors' contributions: M.A.F. conceived and designed the study; M.A.F., P.C., A.C., J.P.R., and Y.G. performed the molecular analysis; P.G. and S.J. performed the clinical assessments; W.L.G., A.S., and M.G. performed the functional studies. M.A.F., P.E.K., Y.G., M.V., S.E.B., C.A., Y.A., and Y.A.K. participated in the validation of the molecular results; P.E.K., M.A.F., C.B., and W.L.G. analyzed the data and wrote the article. All authors reviewed and approved the present article.

Financial disclosures

This work was supported by Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; and Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L) and Program franco-libanais CEDRE. This work was also supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); and the national project CHOPIN (CHolesterol Personalized Innovation) granted by

the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007). S Elbitar, Y Ghaleb, and Y Abou-Khalil are supported by grants from Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS-L); Council of Research of Saint-Joseph University of Beirut, Lebanon; Institut Français du Liban; and Leducq Foundation [FLQ # 13 CVD 03] through the Transatlantic Networks of Excellence in Cardiovascular Research program (For travel or research). Y Abou-Khalil is a recipient of a Research Fellowship from the French Ministry of Research and Technology.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.08.013>.

References

- Al Rasadi K, Almahmeed W, AlHabib KF, et al. Dyslipidaemia in the Middle East: Current status and a call for action. *Atherosclerosis*. 2016;252:182–187.
- Abifadel M, Rabès JP, Jambart S, et al. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Lebanon: spectrum of LDLR mutations and role of PCSK9 as a modifier gene. *Hum Mutat*. 2009;30:E682–E691.
- Khachadurian AK, Uthman SM. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab*. 1973;15:132–140.
- Lehrman MA, Schneider WJ, Brown MS, et al. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1987;262:401–410.
- Aydenian H, Fadel MA, Baddoura R. Epidemiological study of hyperlipemia in a Lebanese population. *Ann Biol Clin*. 1999;57:697–703.
- Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105:310–315.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009;302:1993–2000.
- Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD, Glennon WE, Mcnamara PM. Risk factors in coronary heart disease. an evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; the framingham study. *Ann Intern Med*. 1964;61:888–899.
- Vitali C, Khetarpal SA, Rader DJ. HDL Cholesterol Metabolism and the Risk of CHD: New Insights from Human Genetics. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19:132.
- Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:176–185.
- Singaraja RR, Van Eck M, Bissada N, et al. Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation*. 2006;114:1301–1309.
- Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem*. 2000;275:33053–33058.
- Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:712–719.
- Zhao Y, Van Berkel TJ, Van Eck M. Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:441–453.
- Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, Rigneault H, Rosseneu M, Chimini G. Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem*. 2001;276:9955–9960.
- Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*. 1999;22:347–351.
- Zyss J, Béhin A, Couvert P, et al. Clinical and electrophysiological characteristics of neuropathy associated with Tangier disease. *J Neurol*. 2012;259:1222–1226.
- Lhermusier T, Severin S, Van Rothem J, et al. ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) deficiency decreases platelet reactivity and reduces thromboxane A2 production independently of hematopoietic ABCA1. *J Thromb Haemost*. 2016;14:585–595.
- von Eckardstein A. Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis*. 2006;186:231–239.
- Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest*. 1995;96:78–87.
- Remaley AT, Schumacher UK, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HB. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1813–1821.
- Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, et al. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest*. 2000;106:1263–1270.
- Suetani RJ, Sorenson B, Tyndall JDA, Williams MJA, McCormick SPA. Homology modeling and functional testing of an ABCA1 mutation causing Tangier disease. *Atherosclerosis*. 2011;218:404–410.
- Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:105–129.
- Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1322–1332.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Med*. 2009;1:13.
- Guan J-Z, Tamasawa N, Brunham LR, et al. A case of Tangier disease with a novel mutation in the C-terminal region of ATP-binding cassette transporter A1. *Am J Med Genet A*. 2004;130-A:398–401.
- Kuburovic V, Vekic J, Zeljkovic A, et al. The usefulness of advanced lipid and oxidative stress testing for diagnosis and management of low HDL-cholesterol phenotype: A case report. *Clin Biochem*. 2017;50:1323–1325.
- Negi SI, Brautbar A, Virani SS, et al. A novel mutation in the ABCA1 gene causing an atypical phenotype of Tangier disease. *J Clin Lipidol*. 2013;7:82–87.
- Brunham LR, Kastelein JJP, Hayden MR. ABCA1 gene mutations, HDL cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease. *J Am Med Assoc*. 2008;300:1997–1998author reply 1998.
- Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:180–186.
- Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Stene MCA, et al. Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *JAMA*. 2008;299:2524–2532.
- Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, et al. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem*. 2011;286:30926–30936.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
- Larrede S, Quinn CM, Jessup W, et al. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1930–1936.

36. Rosenbaum D, Giral P, Chapman J, et al. Radial augmentation index is a surrogate marker of atherosclerotic burden in a primary prevention cohort. *Atherosclerosis*. 2013;231:436–441.
37. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:827–832.
38. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2150–2160.
39. Bochem AE, van der Valk FM, Tolani S, Stroes ES, Westerterp M, Tall AR. Increased Systemic and Plaque Inflammation in ABCA1 Mutation Carriers With Attenuation by Statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1663–1669.
40. Bungert S, Molday LL, Molday RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem*. 2001;276:23539–23546.
41. Qian H, Zhao X, Cao P, Lei J, Yan N, Gong X. Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell*. 2017;169:1228–1239.e10.
42. Peelman F, Labeur C, Vanloo B, et al. Characterization of the ABCA transporter subfamily: identification of prokaryotic and eukaryotic members, phylogeny and topology. *J Mol Biol*. 2003;325:259–274.
43. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:510–524.
44. Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*. 2002;277:33178–33187.
45. Nagao K, Zhao Y, Takahashi K, Kimura Y, Ueda K. Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1: effects of W590S mutation on lipid translocation and apolipoprotein A-I dissociation. *J Lipid Res*. 2009;50:1165–1172.
46. Quazi F, Molday RS. Differential phospholipid substrates and directional transport by ATP-binding cassette proteins ABCA1, ABCA7, and ABCA4 and disease-causing mutants. *J Biol Chem*. 2013;288:34414–34426.
47. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors*. 2014;40:547–554.
48. Du XM, Kim MJ, Hou L, et al. HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ Res*. 2015;116:1133–1142.
49. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011;17:594–603.
50. Berry JD, Liu K, Folsom AR, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults study and multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119:382–389.
51. Raggi P, Callister TQ, Cooil B, et al. Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation*. 2000;101:850–855.
52. Wilson PW, Hoeg JM, D'Agostino RB, et al. Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1997;337:516–522.
53. Rickels MR, Goeser ES, Fuller C, et al. Loss-of-function mutations in ABCA1 and enhanced β -cell secretory capacity in young adults. *Diabetes*. 2015;64:193–199.
54. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, et al. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med*. 2007;13:340–347.
55. Koseki M, Matsuyama A, Nakatani K, et al. Impaired insulin secretion in four Tangier disease patients with ABCA1 mutations. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:292–296.
56. Vergeer M, Brunham LR, Koetsveld J, et al. Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33:869–874.
57. Ceccanti M, Cambieri C, Frasca V, et al. A Novel Mutation in ABCA1 Gene Causing Tangier Disease in an Italian Family with Uncommon Neurological Presentation. *Front Neurol*. 2016;7:185.
58. Ramahi TM. Cardiovascular disease in the Asia Middle East region: global trends and local implications. *Asia Pac J Public Health*. 2010;22:83S–89S.
59. Gehani AA, Al-Hinai AT, Zubaid M, et al. INTERHEART Investigators in Middle East. Association of risk factors with acute myocardial infarction in Middle Eastern countries: the INTERHEART Middle East study. *Eur J Prev Cardiol*. 2014;21:400–410.
60. Zubaid M, Rashed WA, Almahmeed W, et al. Management and outcomes of Middle Eastern patients admitted with acute coronary syndromes in the Gulf Registry of Acute Coronary Events (Gulf RACE). *Acta Cardiol*. 2009;64:439–446.
61. Alhyas L, McKay A, Balasanthiran A, Majeed A. Prevalences of overweight, obesity, hyperglycaemia, hypertension and dyslipidaemia in the Gulf: systematic review. *JRSM Short Rep*. 2011;2:55.
62. Alsheikh-Ali AA, Omar MI, Raal FJ, et al. Cardiovascular risk factor burden in Africa and the Middle East: the Africa Middle East Cardiovascular Epidemiological (ACE) study. *PLoS One*. 2014;9:e102830.
63. Kheirandish M, Asgari S, Lotfaliany M, et al. Secular trends in serum lipid levels of a Middle Eastern adult population; 10 years follow up in Tehran lipid and glucose study. *Lipids Health Dis*. 2014;13:20.
64. Lackner KJ, Dieplinger H, Nowicka G, Schmitz G. High density lipoprotein deficiency with xanthomas. A defect in reverse cholesterol transport caused by a point mutation in the apolipoprotein A-I gene. *J Clin Invest*. 1993;92:2262–2273.
65. Sahiner N, Kocak M, Demircelen F, Kisa U, Ayva S, Kazkayasi M. Tangier disease in a Turkish family. *Pediatr Int*. 2014;56:777–779.