

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Biologie*

Par

« Damien GARÇON »

« Rôle intestinal et au-delà du métabolisme du cholestérol de PCSK9 »

« Focus sur la lipémie postprandiale et l'allergie alimentaire »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 02 Juillet 2020 »

Unité de recherche : Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291 l'institut du thorax

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Sophie Lestavel Professeur universitaire à Lille 2 / U1011
Laurent Yvan-Charvet Directeur de Recherche à Nice U1065

Composition du Jury :

Président : René Valéro Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier à Marseille UMR 1062 INSERM/1260
INRA

Examineurs : Sandrine Ménard Chargé de Recherche à Toulouse UMR 1331 TOXALIM
Catherine Martel Professeur Universitaire à Montréal à l'Institut de cardiologie

Dir. de thèse : Bertrand Cariou Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier à Nantes L'institut du thorax
UMR 1087/CNRS UMR 6291

Co-dir. de thèse : Cédric Le May Chargé de Recherche à Nantes L'institut du thorax UMR 1087/CNRS UMR
6291

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe IV « dyslipidémies et lipotoxicité » de l'U1087 à l'institut du thorax dirigé par le Dr Richard Redon, que je remercie pour m'avoir accueilli dans son unité.

Aux membres de mon jury de thèse

Je remercie le Pr René Valéro de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci au Dr Sophie Lestavel et au Dr Laurent Yvan-Charvet d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Dr Sandrine Ménard et le Dr Catherine Martel de tenir le rôle d'examineurs durant ma soutenance.

Je remercie également le Dr Gwenola le Dréan ainsi que le Dr Annik Prat pour leur implication en tant que membre de mon comité de thèse.

A mes co-directeurs de thèse

Bertrand, mon directeur de thèse. Je suis fier d'être le dernier « garçon » que tu co-encadreras avec Cédric. En tant que chef d'équipe, tu as toujours le mot juste pour rassembler et motiver tes troupes. J'ai toujours su que je pouvais compter sur toi à toute heure du jour et de la nuit. Ta bonne humeur, ton esprit de compétition et ta jovialité nous ont permis de passer de très bons moments lors des congrès et des sorties d'équipe. D'ailleurs, et je terminerai sur ces mots, il me semble que durant ces quatre dernières années tu as dû faire face à un adversaire redoutable notamment au bowling. Merci pour tout.

Cédric, mon mentor, tu seras pour toujours mon père scientifique, mon "papa spirituel". Tu m'as fait confiance dès le premier jour - quand nous nous sommes rencontrés lors de l'entretien pour le Master 1. Depuis, nous avons développé ensemble une vraie ambiance de partage au sein de l'équipe et de ton groupe de recherche. C'est le cœur gros que j'écris ces lignes qui me rapprochent et m'éloignent de toi en même temps. La fin de cette thèse sonne la fin de six belles années passées à tes côtés à apprendre et comprendre les ficelles de ce beau métier qu'est le nôtre. Je pèse mes mots en disant que notre relation est allée au-delà de la relation doctorant-directeur, tu es aujourd'hui un véritable ami et j'ai un profond respect pour toi. Continue de t'entraîner au laser game et aux différentes activités qui t'ont fait défaut durant nos affrontements épiques. J'espère connaître le jour où nous pourrons dire que l'élève a dépassé le maître.

Aux membres de l'équipe IV « Dyslipidémies et Lipotoxicité »

Audrey, mon pilier, j'ai trouvé en toi un véritable soutien plus que crucial et déterminant durant toutes ces années. Au-delà de ton incroyable compétence en expérimentation animale, c'est surtout ton tempérament et ta présence qui m'ont le plus soutenu. Même si tu es au moins autant râleuse que moi, c'est cette « bonne humeur » qui fait ton charme. Fidèle et bienveillante, tu es rapidement devenue une confidente recueillant mes doutes, mes craintes et mes faiblesses. Tu as toujours su me reconforter et m'apporter énormément de joie durant ces six années entre le master et la thèse. J'espère que tu continueras à faire vivre la SBEE (Structure du Bien Être en Équipe) que nous avons fondée afin de maintenir cette belle ambiance qui règne au sein de l'équipe IV. Nous nous retrouverons où que nous soyons dans les années à venir.

Jocelyne, ta bonne humeur, ton franc-parler et ton expérience font de toi une personne adorable. Tu as toujours su distiller tes conseils concernant la thèse et la carrière scientifique avec joie. Tu as eu un rôle majeur durant ma thèse et notamment Je te remercie pour la re-lecture de mon manuscrit. Sache que l'équipe sera amputée d'un membre capital lorsque tu prendras ta retraite. Encore une fois merci beaucoup Jo.

Claire, le fantôme de l'institut. Tu n'as pas été beaucoup présente physiquement à l'institut mais nos échanges, lorsque tu n'étais pas en train de soigner ou de travailler à l'hôpital, m'ont fait extrêmement plaisir. Nous avons souvent des moments pour parler des potins dans le dos de tout le monde (Audrey n'est pas en reste non plus). Ton aide à l'animalerie lorsque j'étais en master m'a rapidement montré à quel point tu es une personne gentille et chaleureuse. Pour tout cela je te remercie.

Lucie, tu es une vraie preuve de courage au jour le jour. Je suis content de t'avoir rencontré et d'avoir pu travailler avec toi. Je te remercie pour tout.

Matthieu W., j'ai trouvé en toi une personne extrêmement gentille et bienveillante bien que tout comme Claire, tu n'as pas été beaucoup présent physiquement à l'institut - d'ailleurs je crois que vous partagez le même bureau vide non ? Quoiqu'il en soit tu es une personne extrêmement gentille et bienveillante. Nos sessions d'entraînement à vélo pour ce magnifique triathlon auquel nous avons participé ont été de vrais moments de plaisir. Merci pour tout.

Samy, ta joie, ton sourire et ta bonne humeur permanente contribue fortement à l'ambiance générale de l'équipe. Malgré des citations et des références (sportives) que je ne saisis pas toujours discuter avec toi est un vrai plaisir. Merci pour cela.

Gilliane, ta venue dans l'équipe a été un bol d'air frais. Ta jovialité, ta sagesse et ton tempérament très objectif m'ont aidé à trancher sur de nombreuses questions.

Ton expertise technique est une grande qualité qui m'a dépatouillé de nombreuses situations dramatiques. Tu as toujours un mot gentil, parfois sous la forme d'un simple bonjour qui permet de mettre de bonne humeur pour une journée entière. Merci pour tout cela.

Matthieu P., nous avons eu l'occasion d'apprendre à nous connaître lors des nombreux congrès auxquels nous avons participé ensemble. Distant au premier abord, tu t'es assez vite révélé être une personne très accueillante et pleine d'humour. Je me souviendrai longtemps de ce premier congrès de la NSFA qui restera gravé dans le marbre. Pour ton soutien lors de ces congrès à Marseille, Maastricht, Biarritz, Québec et à Nantes, je te dis un grand merci.

Antoine, tu es arrivé tardivement au cours de ma thèse, mais ta bonne humeur, ta sensibilité et ton humilité font de toi un modèle. Je suis admiratif de ton travail et de ta capacité à conduire des études génétiques. Tu es toujours à l'écoute et de bonne humeur, ne change rien. Pour tout cela, merci beaucoup.

Xavier, si l'équipe IV était une grande famille tu serais sûrement le tonton un peu excentrique ! Tes compétences scientifiques, tes remarques et questions toujours pertinentes durant les réunions de laboratoire m'ont énormément aidé à parfaire et améliorer mon point de vue scientifique. En plus de cela, je ne doute pas un seul instant que le 1^e étage de l'institut sera toujours plus animé que le 2^e étage rien que par ta présence. Garde cette inconstance qui te qualifie et qui fait de toi un personnage haut en couleur. Un grand merci.

Simon, mon colosse. Tu es arrivé dans l'équipe tout timide mais plein d'idées en tête. J'ai rapidement trouvé un véritable compagnon de sport et de soirée en toi. Notre entraînement (encore pour ce triathlon) sera pour toujours ancré chez Scarlett et dans les côtes de Martin. Ton esprit anticonformiste, ton tee-shirt et ton short vont beaucoup me manquer. Je ne parlerai pas de tes chansons ni de tes envolées lyriques en italien... Reste le même en toutes circonstances, merci énormément.

Aurélie, toujours très sérieuse lors des expériences, ta rigueur fait de toi une excellente scientifique. Tu m'as énormément étonné lors des soirées ou des congrès lorsque cette rigueur se transformait en folie. Tu es une personne souriante et amicale. Je te remercie pour tes conseils notamment pour la cytométrie en flux.

Wieneke, nous avons commencé par partager un bureau, ces échanges à longueur de journée m'ont permis de grandir scientifiquement. Tu es une personne toujours assidue et d'humeur égale. Jamais à te plaindre, tu enchaînes les expériences et les rédactions. Tu es un véritable exemple pour ma future carrière. Merci pour tout.

Amandine, nous n'avons pas eu l'occasion de travailler ensemble mais seulement de partager les paillasses. J'ai toujours pris du plaisir à discuter avec toi. Merci pour ta bonne humeur.

Karim, ton expertise dans les IPS et ta curiosité naturelle font de toi un véritable scientifique. Nous avons longuement échangé sur les nouvelles technologies, tu as toi aussi toujours été de bon conseil sur de nombreux sujets. Merci énormément.

Karine, nous n'avons pas eu beaucoup d'occasions de parler, mais nos rares échanges ont toujours été plaisants et agréables. Merci pour ton organisation parfaite des différents événements auxquels j'ai eu la chance de participer - merci pour ces réunions CHOPIN et le DHU 2020.

Florian, malgré ton apparence souvent endormie je sais que tu restes à l'écoute et attentif à ce qui se passe autour de toi. Tu m'as prodigué aussi bien des conseils précieux que des cauchemars avec les expériences de rythme circadien. Merci pour tout.

Méryl, mon compagnon de thèse, nous avons grandement échangé et nous avons partagé des moments forts durant nos années de thèse. Nous avons partagé nos doutes, nos espoirs et nos déceptions. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière que je ne doute pas sera fructueuse et remplie de YES !

Yoann, merci pour les débats et les discussions que nous avons eu ensemble (au cours de ces quelques années de thèse) même si nos avis étaient souvent discordants. Je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse, ne lâche rien, tu tiens le bon bout.

Je remercie également tous les stagiaires de master 2 qui sont, maintenant, en thèse ou qui le seront bientôt (je l'espère). Je pense particulièrement à Alexia qui m'a aidé lors des expériences de rythme circadien, Thibaud qui, à deux reprises, a fait un stage avec moi et Victoria qui arrivera avec brio à reprendre le projet allergie, je n'en doute pas. J'ai une pensée également pour les stagiaires de l'équipe de chirurgie bariatrique, Lucas, Maxime et Alessia – vous avez su maintenir une excellente ambiance au sein du groupe et même à créer des moments de franche rigolade. Merci d'avoir été là.

Aux autres membres de l'institut du thorax

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de la plateforme de spectrométrie de masse. Mikaël, tu as été un appui incroyable grâce à ton expertise en chimie en plus de ta bonne humeur et de tes bavardages incessants. Stéphanie, tu m'as énormément aidé et tu contribues beaucoup à la bonne ambiance du 5^e étage. Audrey, tu es devenue une amie avec qui j'aime travailler et discuter. J'espère que tu

pourras concrétiser ton rêve de travailler à l'étranger en qualité d'ingénieur, je sais à quel point tu es douée. Merci à vous tous pour tout ce que vous avez fait durant ma thèse.

Je remercie également les membres de l'animalerie qui fournissent un travail remarquable au quotidien pour que nous puissions mener nos expériences *in vivo* dans les meilleures conditions. Merci pour cela.

Grégory, mentor de Martin, tu as su être présent et me donner de précieux conseils lors de la mise en place du projet sur l'allergie. Tu m'as aussi aidé à améliorer mon écrit sur ce sujet. Pour tout cela, je tiens à te remercier.

Maxim et Laure, vous avez été pour moi des modèles de doctorants. J'ai toujours été admiratif de votre capacité à mener votre thèse et votre vie sociale en même temps. Aujourd'hui encore, j'aime vous retrouver et discuter devant un bon repas et du bon vin. Votre vision de la vie et vos conseils font de vous de très bons amis. J'espère pouvoir vous accueillir de nouveau et venir vous voir un jour quel que soit votre pays d'adoption.

Je remercie également tous les membres de l'institut et des autres unités que j'ai eu la chance de côtoyer durant ma thèse : Aurélie, Martine, Marie-France, Romain, Céline, Agnès, Maud, Vimla, Virginie, Maxime, Luc, Carole et bien d'autres encore.

Aux membres de l'IRCM de Montréal

Je remercie fortement Nabil Seidah et Annik Prat de m'avoir accueilli à l'IRCM de Montréal dès mes débuts en master 2 et de m'avoir suivi durant ces années de thèse. Cette expérience qui restera un socle solide de ma formation scientifique m'a fait grandir aussi bien professionnellement que personnellement. Je ne saurais retranscrire toute ma gratitude en quelques lignes. Vous êtes de véritables inspirations pour les futures générations de chercheurs. Merci pour tout, j'espère avoir l'occasion de travailler à nouveau avec vous deux.

Je remercie également toutes les personnes de l'IRCM que j'ai pu rencontrer : Edwige, Anna, Anne, et d'autres encore.

A ma famille

Papa, Maman, vous ne comprenez pas tout à fait ce que j'ai pu réaliser pendant ces quatre années de thèse. Un peu inquiets sur mon parcours et la finalité de mes études, vous avez toujours cru en moi et pas une seule seconde, je n'ai senti un doute concernant ma réussite. Vous m'avez permis d'arriver aussi loin, non seulement par votre présence, mais aussi par votre confiance. Vous avez réussi à me laisser partir du cocon familial dès mon Master 2 afin que je me consacre à 100% à l'obtention de

ma bourse de thèse alors que nous n'habitions pas très loin du laboratoire. Ce « caprice » que vous avez consenti à me faire m'a aidé, tous les jours durant ces années, à me rappeler à quel point vous me soutenez. Si je suis arrivé jusque-là aujourd'hui, c'est avant tout grâce à vous. Merci beaucoup.

Lorène, je pourrais m'étendre sur des pages et des pages tant tu m'as apporté depuis que j'ai eu la chance de te rencontrer. Toi aussi, tu n'as pas toujours compris pourquoi et comment je pouvais passer autant de temps sur mes projets et mes expériences pour « pas grand-chose ». Tu étais présente lorsque je rentrais dépité par des résultats négatifs à répétition. Tu as au moins dû détester autant que moi ce modèle d'intestin KO qui ne montrait aucune différence avec les contrôles. Nos heures passées à table à discuter de mon travail et de notre avenir à l'étranger ainsi que ta bienveillance, ta gentillesse et ton amour m'ont permis de tenir bon et d'aller au bout de l'un des plus beaux succès de ma vie. Je suis heureux et fier que tu aies été à mes côtés durant ces années de thèse.

Maximilien et Aymeric, mes chers frères, vous n'y alliez pas de main morte pour vous moquez de moi et de mon travail. Eh non ! je n'ai pas inventé un remède au cancer en mélangeant « de l'eau et de l'huile ». Vous avez, vous aussi, su être présents durant toutes ces années, au-delà de la thèse, pour m'aider à me construire. J'ai toujours pu compter sur au moins l'un d'entre vous pour m'accompagner dans mes projets délirants. Nos moments passés avec toi, Maximilien, durant nos années lycée sur scène avec notre groupe de musique m'ont permis de me sentir à l'aise en face d'un public. Ce tract que j'ai appris à contenir et maîtriser me permet d'aborder les congrès et les présentations orales sereinement. Aymeric, ces moments passés devant mon écran à regarder tes streams de jeux vidéo me détendaient et me faisaient penser à autre chose. J'ai aussi énormément aimé nos moments passés lors de ma dernière année à la salle de sport où j'ai pu renouer avec le coaching privé. Pour tout cela et tout ce qui arrivera par la suite, je vous dis merci. J'en profite pour remercier également Tanaïs qui m'a permis d'être toujours impeccablement coiffé durant toutes ces années.

A mes amis

Franck, mon meilleur ami de toujours. Tu n'as pas beaucoup été présent physiquement durant ma thèse et mes études en général. Cependant, nos heures, jours, mois, années ? passés devant notre écran d'ordinateur et par micro ont été pour moi un grand bol d'air frais. Même si la distance est aujourd'hui une composante de notre relation, je sais que nous continuerons toujours à parler de tout et de rien. Tes monologues sur tel ou tel sujet font de tous les moments passés avec toi un vrai plaisir. Nous pourrions nous promener, comme dans le temps, dans les forêts, cette fois canadiennes, lorsque tu viendras nous voir. Tu as toujours su avoir la parole juste et objective lorsque j'avais un souci à régler. Ton point de vue « scientifique » est crucial, ne le perd jamais. Merci mon ami de toujours.

Martin, mon compagnon. J'ai envie de dire que rien ne nous rassemblait lorsque nous nous sommes rencontrés dans le bocal en master 1, mais en même temps, tout nous rassemblait. En effet, très sportif tous les deux (à l'époque), nous nous sommes vite inscrits ensemble dans une salle de sport. Geek tous les deux, nous avons vite trouvé un terrain d'entente pour des soirées et même certaines journées entières devant l'ordinateur. Nous avons même poussé le vice à lier nos domaines de recherche en une seule et même étude. C'est avec une énorme fierté que je présente nos travaux sur AllergoP9 dans ma thèse. Tu es un véritable ami sur qui je peux compter. La preuve, lorsque j'ai parlé d'aller au Canada, tu t'es empressé de trouver un post-doc dans le même pays, jusque dans la même province. Tu seras toujours mon compagnon de thèse. Merci pour tous ces moments passés ensemble (PS : je ne parlerai pas des nuits au laboratoire).

Enfin, je remercie mes chères amis Geoffroy, Mélody, Valentin, Annaëlle et Louison. Vous avez été présents durant toutes ces années et continué de l'être. Pour tout cela et plus encore, un énorme merci.

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES	4
INDEX DES TABLEAUX	5
LISTES DES ABREVIATIONS	6
PARTIE 1 : INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES	1
I) DEFINITION ET PREVALENCE	1
1) <i>Définition et symptômes</i>	1
2) <i>Données de prévalence et études cliniques</i>	3
3) <i>Augmentation des maladies cardiovasculaires</i>	4
4) <i>Facteurs de risque modifiables</i>	5
4.1) Le tabagisme	5
4.2) L'inactivité physique	6
4.3) L'hypertension artérielle	6
4.4) Le diabète	7
4.4.a) Le diabète de type 1	7
4.4.b) Le diabète de type 2	8
4.5) Les dyslipidémies	8
4.5.a) La dyslipidémie diabétique	9
4.5.b) L'hypercholestérolémie familiale	15
4.6) L'inflammation	17
4.7) Inter-relation des facteurs de risque cardiovasculaires	18
5) <i>Utilisation du SCORE en pratique clinique</i>	20
6) <i>Historique des traitements hypolipémiants avant l'émergence des inhibiteurs de PCSK9</i>	21
6.1) Statines	21
6.2) Ézétimibe	22
CHAPITRE 2 : METABOLISME DU CHOLESTEROL ET DECOUVERTE DE PCSK9	24
I) CONTROLE DE L'HOMEOSTASIE DU CHOLESTEROL PAR LE FOIE	24
1) <i>Rôle du cholestérol</i>	24
2) <i>Origine du cholestérol</i>	27
2.1) voie endogène	27
2.2) voie exogène	29

2.3) Voies d'élimination du cholestérol	30
II) DECOUVERTE ET ROLE HEPATIQUE DE PCSK9	32
1) <i>Du gène à la fonction</i>	32
1.1) Découverte de PCSK9	32
1.2) Mode d'action de PCSK9	32
1.3) Mutants de PCSK9	36
1.3.a) Gain de fonction (GOF)	37
1.3.b) Perte de fonction (LOF)	38
1.4) Régulation de PCSK9	40
1.4.a) Régulation transcriptionnelle	40
1.4.b) Modification post-traductionnelle	42
1.5) Autres cibles de PCSK9	44
2) <i>Développement d'inhibiteurs anti-PCSK9</i>	45
1) Anticorps anti-PCSK9	45
2) siRNA PCSK9	46
III) ACTION EXTRA-HEPATIQUE DE PCSK9 ET AU-DELA DU METABOLISME DU CHOLESTEROL	47
1) <i>Action intestinale</i>	48
1.1) Absorption intestinale du cholestérol	48
1.2) Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)	49
2) Action sur les triglycérides	50
3) Action sur la Lipémie postprandiale	53
4) Autres actions extra-hépatiques	54
4.1) Rôle de PCSK9 dans le pancréas endocrine	55
4.2) Rôle de PCSK9 dans le rein	57
4.3) Rôle de PCSK9 dans la plaque d'athérosclérose	58
5) Action de PCSK9 sur le développement	60
6) Action de PCSK9 sur les canaux lymphatiques	62
IV) RELATION ENTRE LIPIDES ET SYSTEME IMMUNITAIRE	63
V) ACTION INFLAMMATOIRE DE PCSK9	69
CHAPITRE 3 : L'ALLERGIE ALIMENTAIRE	71
I) DEFINITION ET PREVALENCE	71
1) <i>Définition et symptômes</i>	71
1.1) Allergies alimentaires IgE médiées	73
1.2) Allergies alimentaires IgE non médiées	73
1.3) Allergies alimentaires mixtes	73
1) <i>Données de prévalence et études cliniques</i>	75
3) <i>Augmentation des allergies</i>	76

4) <i>Facteurs de risque des allergies alimentaires</i>	77
4.1) Facteurs génétiques	77
4.2) Microbiote	78
4.3) Voies d'exposition aux allergènes	83
II) <i>ROLE DE LA BARRIERE INTESTINALE</i>	86
1) <i>Structure de l'intestin : organe immunitaire</i>	86
2) <i>Induction de la tolérance</i>	88
III) <i>MECANISMES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE</i>	90
1) <i>La sensibilisation</i>	90
2) <i>Le challenge</i>	93
IV) <i>TRAITEMENT DES ALLERGIES ALIMENTAIRES</i>	93
1) <i>Eviction</i>	94
2) <i>L'immunothérapie orale</i>	94
3) <i>La prévention par les pro et prébiotiques</i>	95
PARTIE 2 : OBJECTIFS ET RÉSULTATS	97
Article 1 : Circulating rather than intestinal PCSK9 regulates postprandial lipemia in mice.	97
Article 2 : PCSK9 deficiency and inhibition protect against food allergy symptoms	100
PARTIE 3 : DISCUSSION	102
BIBLIOGRAPHIE	108
ANNEXE	144

Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine	9
Figure 2 : Effet du diabète sur la production de VLDL	11
Figure 3 : Effet du diabète sur la production de chylomicron	13
Figure 4 : Mutations conduisant à l'hypercholestérolémie familiale	16
Figure 5 : Exemple de table de SCORE pour l'évaluation du risque sur 10 ans de la survenue des MCV (adapté de European guidelines 2016)	21
Figure 6 : Structure 2D de la molécule de cholestérol	24
Figure 7 : Dérivés du cholestérol et leurs fonctions	26
Figure 8 : Schéma de la synthèse endogène du cholestérol	28
Figure 9 : Principales voies du métabolisme du cholestérol dans une cellule polarisée (adapté de Luo et al. 2019)	31
Figure 10 : Structure de PCSK9 (d'après Sarkar et al. 2020)	33
Figure 11 : Effet de PCSK9 (adapté de Bergeron et al. 2015)	35
Figure 12 : Schéma des mutations de PCSK9 (adapté de Dron et al. 2017)	36
Figure 13 : Schéma des modifications post-traductionnelles de PCSK9	44
Figure 14 : Mécanisme du transport inverse du cholestérol et sa régulation par les réponses immunitaires innées (adapté de Tall et al. 2015)	64
Figure 15 : Activation des mastocytes par les récepteurs (adapté de Shi et al. 2015)	66
Figure 16 : Formation de cellules spumeuses par l'activation des mastocytes dans l'intima de la paroi artérielle	68
Figure 17 : Prévalence de l'allergie alimentaire dans le monde (adapté de Renz et al. 2018)	76
Figure 18 : Induction de la tolérance par le microbiote	80
Figure 19 : Induction de l'allergie alimentaire par le microbiote	83
Figure 20 : Hypothèse de la double exposition et pathogénèse de l'allergie alimentaire (adapté de Du Toit et al. 2016)	85
Figure 21 : Schéma de la structure de l'intestin en tant qu'organe immunitaire	87
Figure 22 : Mise en place de la tolérance au niveau intestinal	89
Figure 23 : Mise en place de la sensibilisation allergique	92

Index des tableaux

Tableau I : Exemples d'avancées majeures dans la prévention et le traitement des MCV (adapté de Mensah et al. 2017)	4
Tableau II : Composition protéique et lipidique des grandes classes de lipoprotéines	9
Tableau III : Facteurs influençant la lipémie postprandiale	15
Tableau IV : Objectifs des facteurs de risque et niveaux à atteindre pour les principaux facteurs de risque cardiovasculaire (adapté de Piepoli et al. 2020)	19
Tableau V : Essais cliniques et effets des anticorps anti-PCSK9	46
Tableau VI : Prévalence des allergies alimentaires chez les enfants et les adultes	72
Tableau VII : Classification des allergies alimentaires (adapté de Yu et al. 2016)	75

Listes des abréviations

ABCB1 : ATP-Bindin Cassette sub-family

ABCG5 : ATP-Bindin Cassette sub-family G 5

ABCG8 : ATP-Bindin Cassette sub-family G 8

ACAT : Acyl-Coenzyme A cholesterol Acyltransferase

AGL : Acide Gras Libre

APC : Antigen Presenting Cell

ApoA1 : Apolipoprotéine A1

ApoB100 : Apolipoprotéine B100

ApoB48 : Apolipoprotéine B48

ApoER2 : Apolipoprotein E Receptor 2

ARNr : ARN ribosomal

AVC : Accident Vasculaire Cérébrale

CA : Cholic Acid

CCR : Chemokine Receptor

CDCA : Chenodeoxycholic Acid

CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein

CMpri : Chylomicron primaire

COPII : Coat Protein complex II

CREBH : Cyclic adenosine monophosphate-Responsive Element-Binding protein H

CRP : C Reactive Protein

CYP7A1 : Cytochrome P450 7A1

DC : Dendritic Cell

EBBINGHAUS : Evaluating PCSK9 Binding Antibody Influence on Cognitive Health in High Cardiovascular Risk Subjects

EGFA : Epidermal Growth Factor A

ENAC : Epithelial sodium Channel

FCεR1 : Fragment Constant epsilon Receptor 1

FOURIER : Further cardiovascular OUtcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated Risk

FXR : Farnesoid X Receptor

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue

GF : Germ Free

GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Peptide

GLP1 : Glucagon Like Peptide 1

GLP2 : Glucagon Like Peptide 2

GOF : Gain Of Function

GPR : G Protein receptor

GWAS : Genome Wide Association Study

HDL : High Density Lipoprotein

HF : Hypercholestérolémie Familiale

HINFP : Histone H4 transcription Factor

HMGCOA : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A

HMGCOAS : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A Synthase

HMGOCAR : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A Reductase

HNF1 : Hepatic Nuclear Factor 1

HSL : Hormone Sensible Lipase

HYPERGEN : the Hypertension Genetic Epidemiology Network

IDL : Intermediate Density Lipoprotein

IDO : Indoleamine 2,3-Dioxygenase

IFN : Interferon

IgE : immunoglobuline E

IgG : immunoglobuline G

IL : Interleukine

IL-4R: Interleukine 4 Receptor

iLC : innate lymphoid cell

IMPROVE-IT : Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial

INSIG : Insulin Induced Gene 1

LCAT : Lecithin Cholesterol Acyltransferase

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : Low Density Lipoprotein
LDL-C : LDL-Cholestérol
LDLR-R : Low Density Lipoprotein Receptor
LOF : Loss Of Function
LPP : Lipémie PostPrandiale
LPS : Lipopolysaccharide
LRP1 : LDLR Related Protein 1
LXR : Liver X Receptor
MCV : Maladies Cardiovasculaires
MTP : Microsomal Transfer Protein
NARC-1 : Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1
NLRP3 : NOD-Like Receptor family Pyrin domain containing 3
NO : Nitric Oxyde
NPC1L1 : Niemann-Pick C1 Like 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OX40L : Ox40 Ligand
PCSK9 : ProProtein Convertase Subtilisin Kexin type 9
PCTV : PréChylomicron Transport Vesicle
PL : Phospholipides
PPAR : Peroxysome Proliferator-activated Receptor
préCM : préChylomicron
PSD : Pression Sanguine Diastolique
RCT : Reverse Cholesterol Transport
RE : Réticulum Endoplasmique
REGARDS : REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke
ROR : RAR Related Orphan Receptor
S1P : Serine 1 Protease
S2P : Serine 2 Protease
SCAP : SREBP Cleavage Activating Protein
SCFA : Short Chain Fatty Acid
SCORE : Systematic Coronary Risk Evaluation
siRNA : small interfering RNA

SIRT1/6 : Sirtuin 1/6

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SRB1 : Scavenger Receptor class B 1

SRE : Sterol Regulatory Element

SREBP1c : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c

SREBP2 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2

Stat6 : Signal transducer and activator of transcription 6

T reg : T régulateur

TG : Triglycérides

TGF : Transforming Growth Factor

Th : T Helper

TICE : Trans Intestinal Cholesterol Excretion

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis factor

TRL : Triglyceride-Rich Lipoprotein

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

VLDLR : Very Low Density Lipoprotein Receptor

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Les maladies cardiovasculaires

I) Définition et Prévalence

1) Définition et symptômes

Les maladies cardiovasculaires (MCV) regroupent les pathologies affectant les vaisseaux sanguins et l'activité cardiaque. La plupart de ces pathologies font suite au développement de l'athérosclérose. D'après la première définition donnée en 1958 par l'organisation de la santé (OMS) « L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Ces modifications sont fréquemment accompagnées d'un réarrangement de la média. Les troubles cardiovasculaires se présentent sous les formes suivantes : les cardiopathies coronariennes qui touchent les artères qui alimentent le cœur; les accidents vasculaires cérébraux (AVC) qui affectent les vaisseaux du cerveau; les artériopathies périphériques qui altèrent principalement les vaisseaux des membres inférieurs, les cardiopathies rhumatismales affectant le muscle et les valves cardiaques suite à une infection d'une bactérie streptocoque; les malformations cardiaques congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires.

Il est fréquent qu'une maladie cardiovasculaire touchant les vaisseaux sanguins soit asymptomatique. Un infarctus ou un AVC se caractérise parfois de manière aiguë. Quelques signes de déclenchement peuvent cependant être détectés, pour un

infarctus par exemple : douleur ou gêne dans la partie centrale de la poitrine, au niveau des bras, de l'épaule gauche, des coudes, de la mâchoire ou du dos. De plus, le patient peut ressentir un essoufflement voire des difficultés à respirer, éprouver un malaise ou vomir, avoir des sensations vertigineuses ou s'évanouir, être pris de sueurs froides ou pâlir.

Pour l'AVC le symptôme le plus répandu est une sensation de faiblesse soudaine au niveau de la face, du bras ou de la jambe, le plus souvent sur un seul côté du corps. Lors de la survenue d'un AVC, les symptômes suivants peuvent apparaître : confusion, difficultés à parler ou à comprendre un discours ; difficultés visuelles touchant un œil ou les deux ; difficultés à marcher, étourdissement, perte d'équilibre ou de coordination ; céphalées sévères sans cause connue et syncope ou perte de conscience.

La cardiopathie rhumatismale se définit comme une atteinte des valves et du muscle cardiaques résultant de l'inflammation et des lésions cicatricielles laissées par un rhumatisme articulaire aigu. Ce processus est provoqué par une infection causée par une bactérie streptocoque et commence habituellement par une angine ou une amygdalite chez l'enfant.

La thrombose veineuse se caractérise par la formation d'un thrombus (caillot sanguin) dans une veine. La plupart du temps, elle survient dans les membres inférieurs bloquant partiellement ou totalement la circulation sanguine. La thrombose veineuse profonde se définit selon la localisation du thrombus, ce dernier doit se situer dans une veine de gros calibre proche des artères au cœur du muscle. Le détachement de ce caillot peut conduire à la délocalisation jusqu'à l'artère pulmonaire provoquant ainsi une embolie pulmonaire. Les symptômes peu spécifiques (Rougeur, œdème, douleur au niveau de la jambe ou du mollet) rendent le dépistage difficile.

2) Données de prévalence et études cliniques

Selon l'OMS, en 2015 environ 17,7 millions de décès sont imputables aux MCV, soit 31% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions à un AVC [1]. Même si ce chiffre reste très élevé, il a nettement diminué depuis la création des premières études cliniques sur les MCV. La création en 1948 de la cohorte « Framingham Heart Study » a débuté la compréhension des mécanismes et surtout permis d'introduire la notion de facteurs de risque modifiables permettant une meilleure prise en charge des patients [2]. A partir de cette période d'autres études ont mis en évidence et apporté des indications sur l'amélioration des facteurs de risques modifiables favorisant les MCV. Ces études sont répertoriées dans la Table I [3][4][5][6][7].

Avancées	Année ou période	Impact sur la prévention ou le traitement des MCV et les facteurs de risques
La « Framingham Heart Study » identifie le tabagisme, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie comme des facteurs de risques majeurs	1960s	Nouvelles cibles pour la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires
Surgeon General's Report on Smoking and Health	1964	Publicité mettant en garde contre les dangers de la cigarette
Hypertension Detection and Follow-up Program (HDFP)	Début 1970s	Démonstration des bénéfices à traiter l'hypertension même modérée
Découverte du Récepteur aux Lipoprotéines de faible densité (LDL-R)	1970s	Michael Brown et Joseph Goldstein ouvrent la voie vers les statines
Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (LRC-CPPT)	1984	Avantage avéré de la réduction du cholestérol
Directives nationales de pratique clinique en cas de tension artérielle et de cholestérol sanguin élevé	1987	Établissement de normes et d'objectifs pour la pression artérielle et le cholestérol

Développement des statines, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de bloqueurs des canaux calciques	1987-1988	De nouveaux médicaments puissants pour gérer le cholestérol et la pression artérielle
Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)	1994	Le premier essai sur les statines a montré une réduction de la mortalité. De nombreux autres essais de statines ont suivi.
Systolic Hypertension in the Elderly (SHEP)	1996	A établi l'intérêt de traiter l'hypertension systolique isolée chez les personnes âgées. De nombreux autres essais sur la tension artérielle ont suivi.
Systolic Blood Pressure Intervention Trial (SPRINT)	2015	A établi l'avantage d'un contrôle intensif de la tension artérielle (pour cibler une tension systolique < 120 mmHg) chez les patients à haut risque sans diabète

Tableau I : Exemples d'avancées majeures dans la prévention et le traitement des MCV (adapté de Mensah et al. 2017)

3) Augmentation des maladies cardiovasculaires

La diminution de la prévalence des MCV est aujourd'hui ralentie dans certaines populations, notamment chez les plus jeunes. L'étude de Sidney et al. en 2016 révèle qu'entre 2000 et 2011, la baisse des MCV était de l'ordre de -4% par an, alors qu'entre 2011 et 2014 la tendance est de l'ordre de -0,6% par an [8]. Ce fort ralentissement du déclin des MCV peut même aller vers une augmentation dans les populations les plus jeunes. En effet, plusieurs études montrent, notamment aux États-Unis, que la mortalité prématurée chez les jeunes (25-50 ans) s'accroît. Par exemple, l'étude de Shiels et al. en 2017 met en évidence que les décès imputables aux MCV décroissent

pour toutes les catégories d'âges excepté pour les 25-49 ans où une hausse (0,1 - 2,1%) des décès dus aux MCV est enregistrée, notamment chez les jeunes femmes [9]. Cette augmentation de la survenue des événements cardiovasculaires s'explique par la recrudescence de certains facteurs de risque notamment le tabagisme chez les jeunes femmes, l'inactivité physique, l'obésité et le diabète, qui touchent de plus en plus d'individus dès l'enfance.

4) Facteurs de risque modifiables

Le tabagisme, l'inactivité physique, l'hypertension, le diabète, le cholestérol, les lipides, et l'inflammation, entre autres, sont autant de facteurs de risque modifiables des maladies cardiovasculaires.

4.1) Le tabagisme

En 1964, après le rapport du « General Surgeon », le lien entre les MCV et le tabagisme a été révélé au public [3]. Cette prise de conscience a initié le début de la prévention contre le tabagisme. Malgré tout cela, on estime que d'ici 2025, il y aura 1,6 milliard de fumeurs dans le monde et que 10 millions de personnes mourront chaque année des suites du tabagisme [10]. De plus, le nombre de fumeurs parmi les femmes et les adolescents ne cesse d'augmenter en Europe [11][12]. Concernant les risques, il est connu que les personnes fumant à vie ont 50% de risque de mourir de maladies liées au tabagisme (MCV, cancer). Ils perdent, de plus, en moyenne 10 ans d'espérance de vie [13]. Le risque de développer une MCV sur 10 années est doublé chez les fumeurs [14]. Au-delà du tabagisme dit actif, le tabagisme passif augmente le risque de MCV, il a été montré qu'avoir un fumeur dans son entourage familial direct ou un lieu de travail exposant au tabagisme passif augmente les risques de MCV

d'environ 30% [15][16][17][17][17][17]. Les services de santé recommandent l'absence d'exposition au tabagisme sous toutes ces formes.

4.2) L'inactivité physique

L'inactivité physique ou la sédentarité est un facteur de risque des MCV, mais aussi du développement d'un certain nombre d'autres maladies chroniques. En pratique les recommandations prescrivent 30 minutes d'activité physique modérée par jour. Aujourd'hui, environ 60 % de la population mondiale n'atteint pas le minimum recommandé. Le risque de MCV est multiplié par 1,5 chez les personnes ayant un mode de vie sédentaire. Ce manque d'activité physique est à l'origine de 2 millions de décès par an et de 22 % des cardiopathies ischémiques [18]. Cette propension à l'inactivité physique est d'autant plus forte chez les jeunes, ce facteur explique, en partie, l'augmentation des MCV dans cette catégorie d'âge [9]. L'activité physique régulière est protectrice et a de nombreux avantages : elle diminue les lésions vasculaires déjà existantes et réduit d'autres facteurs de risque (réduction du poids corporel, des niveaux circulants de lipides, de la glycémie, de la pression artérielle) et diminue ainsi l'incidence des MCV [18]. Elle réduit la progression de l'athérosclérose, protège du stress oxydatif, augmente la sensibilité à l'insuline, diminue l'incidence des arythmies malignes et équilibre le système végétatif [19].

4.3) L'hypertension artérielle

L'hypertension est le facteur de risque modifiable le plus commun chez les patients atteints de MCV [20]. Environ 1 adulte sur 4 souffre d'hypertension, cette prévalence a augmenté de 10% entre 1990 et 2015 [21]. L'hypertension est généralement définie comme une pression artérielle supérieure ou égale à 140 mmHg

en systole et 90 mmHg en diastole. Le risque de MCV double à chaque augmentation de la pression artérielle systolique de 20 mmHg et diastolique de 10 mmHg [22]. De plus, chez les patients hypertendus l'évènement cardiovasculaire survient en moyenne 5 ans plus tôt que chez les patients normotendus. Aujourd'hui, au-delà des recommandations d'hygiène de vie, il existe 8 familles de médicaments permettant de lutter contre l'hypertension artérielle. Ces médicaments sont : les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les inhibiteurs de la rénine, les bêta-bloquants, les diurétiques thiazidiques, les antagonistes calciques, les anti-hypertenseurs centraux et les alpha-bloquants [23]. Tous ces médicaments sont en prise quotidienne et plusieurs de ces classes de médicaments peuvent être combinées afin d'atteindre la cible d'une pression artérielle inférieure à 140/90 mmHg.

4.4) Le diabète

4.4.a) Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est défini comme le diabète juvénile ; cette pathologie survient, le plus souvent, à la suite d'une maladie auto-immune d'origine lymphocytaire. Les lymphocytes vont progressivement détruire les cellules bêta du pancréas qui produisent et sécrètent l'insuline. Ce défaut d'insuline fait de ce diabète un diabète appelé « insulino-dépendant » [24]. Une étude de 2006 a montré que les patients atteints d'un diabète de type 1 ont une augmentation du risque cardiovasculaire de 4 fois chez les hommes et 8 fois chez les femmes. L'augmentation de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) est une des raisons majeures de l'accroissement des MCV chez ces patients [25].

4.4.b) Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, le plus fréquent, est lui défini comme une insulino-résistance périphérique qui entraîne une altération progressive de la fonction liée à une diminution de la masse des cellules bêta du pancréas et un défaut de réponse insulinique au glucose. En 2011, 52 millions d'Européens âgés de 20 à 79 ans souffraient du diabète de type 2. En 2030, on estime que 64 millions de personnes en Europe souffriront du diabète de type 2. Ce chiffre est inquiétant car la plupart des diabétiques meurent de MCV [26]. Le risque d'un patient diabétique de type 2 à développer une MCV est 2 voire 3 fois supérieur à celui d'une personne non diabétique [27]. Ce risque est largement corrélé au niveau d'hémoglobine glyquée ; il est rapporté que chaque 1% d'augmentation de cette valeur au-dessus de 6,5% accroît de 11% les risques de MCV [28]. Ce qui fait du contrôle de la glycémie un facteur pour la lutte contre les MCV chez les diabétiques. Au-delà de la glycémie, d'autres facteurs de risque sont à surveiller chez ces patients, notamment les dyslipidémies.

4.5) Les dyslipidémies

Les dyslipidémies sont caractérisées par un changement dans la qualité et la quantité des lipides et lipoprotéines circulantes. Les lipoprotéines sont des structures sphériques composées d'un compartiment hydrophobe, situé au cœur de la sphère, qui est composé de lipides non polaires tels que les esters de cholestérol et les triglycérides (TG). L'enveloppe externe est hydrophile et se compose de cholestérol libre et de phospholipides (PL) (Figure 1). En plus de ces lipides la couche externe se caractérise par la présence d'apolipoprotéine (Apo). Chaque classe de lipoprotéines est définie par une combinaison différente d'apolipoprotéines et une concentration variable en cholestérol, TG et PL (Table II).

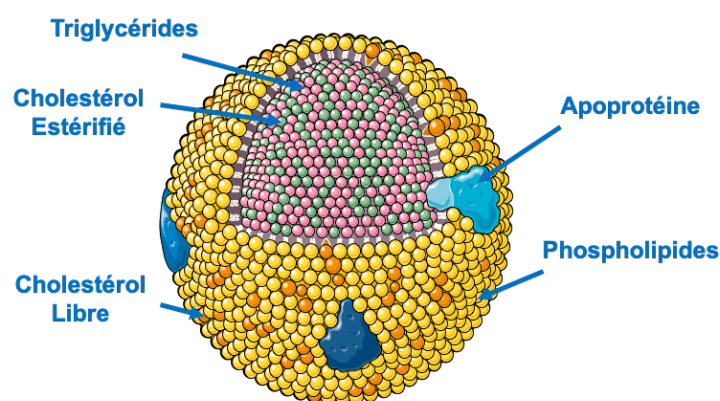


Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine

					
	HDL	Lp(a)	LDL	VLDL	Chylomicron
Diamètre (nm)	5-12	25	18-25	30-80	>75
Protéine (%)	50	36	21	8	1
Apoprotéines	ApoA1, A2, C1, C2, C3, D, E	ApoB100, a	ApoB100, C3, E	ApoB100, C1, C2, C3, E	ApoB48, A1, A4, E
Lipides (%)	TG 4% Chol 20% PL 26%	TG 9% Chol 37% PL 18%	TG 11% Chol 46% PL 22%	TG 54% Chol 22% PL 16%	TG 88% Chol 4% PL 7%

Tableau II : Composition protéique et lipidique des grandes classes de lipoprotéines

4.5.a) La dyslipidémie diabétique

Chez certains patients diabétiques un contrôle agressif de la glycémie n'est pas nécessairement associé à une baisse du risque des MCV [29]. En effet, d'autres facteurs de risque des MCV sont à prendre en compte. C'est le cas d'un facteur couramment associé au diabète : la dyslipidémie diabétique. Cette forme de dyslipidémie est caractérisée par une hypertriglycémie, une réduction des

concentrations de HDL (High Density Lipoprotein) et une augmentation de la présence des particules petites et denses de LDL (Low Density Lipoprotein) [30]. Ce phénomène peut être détecté des années avant le diagnostic du diabète de type 2, chez des patients insulino-résistants ou même pré-diabétiques avec des concentrations en glucose normales [31]. Cette dernière observation permet de conclure que l'hyperglycémie n'explique pas à elle seule les anomalies lipidiques, c'est plus l'insulino-résistance qui est tenue pour responsable de l'apparition des dyslipidémies diabétiques.

L'hypertriglycémie est considérée comme la principale aberration lipidique dans l'insulino-résistance et joue un rôle essentiel dans la détermination du profil lipidique caractéristique de la dyslipidémie diabétique. Les niveaux élevés de triglycérides sont le résultat d'une production accrue et d'une diminution de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL), à la fois à jeun et en période postprandiale [32]. En effet, L'insulino-résistance conduit à une baisse de l'inhibition des lipases, notamment de la lipase hormono-sensible (HSL), au niveau du tissu adipeux entraînant une lipolyse accrue et un relargage d'acide gras libre (AGL) dans la circulation [33]. Cette augmentation d'AGL conduit à une augmentation des AG dans le foie favorisant la lipodation de l'ApoB-100 inhibant sa dégradation par le protéasome ou le lysosome [34]. De plus une concentration élevée d'AGL peut perturber directement l'activité de la lipoprotéine lipase en la détachant de la surface endothéliale. Cette diminution d'activité de la lipoprotéine lipase diminue le catabolisme des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) induisant une élévation de leur niveau plasmatique. L'insulino-résistance empêche l'insuline d'inhiber la transcription de la MTP (Microsomal Transfer Protein) qui permet d'assembler les triglycérides et l'ApoB-100 [35]. Enfin, l'hyperglycémie entraîne une augmentation de la transcription

de l'ApoC-III connue pour inhiber les lipoprotéines lipases conduisant à une augmentation de la concentration de particules VLDL1 (caractérisées par la présence de l'ApoB100 et de l'ApoC-III) [36]. Tous ces phénomènes favorisent la production des VLDL tout en inhibant leur catabolisme chez les patients diabétiques (Figure 2).

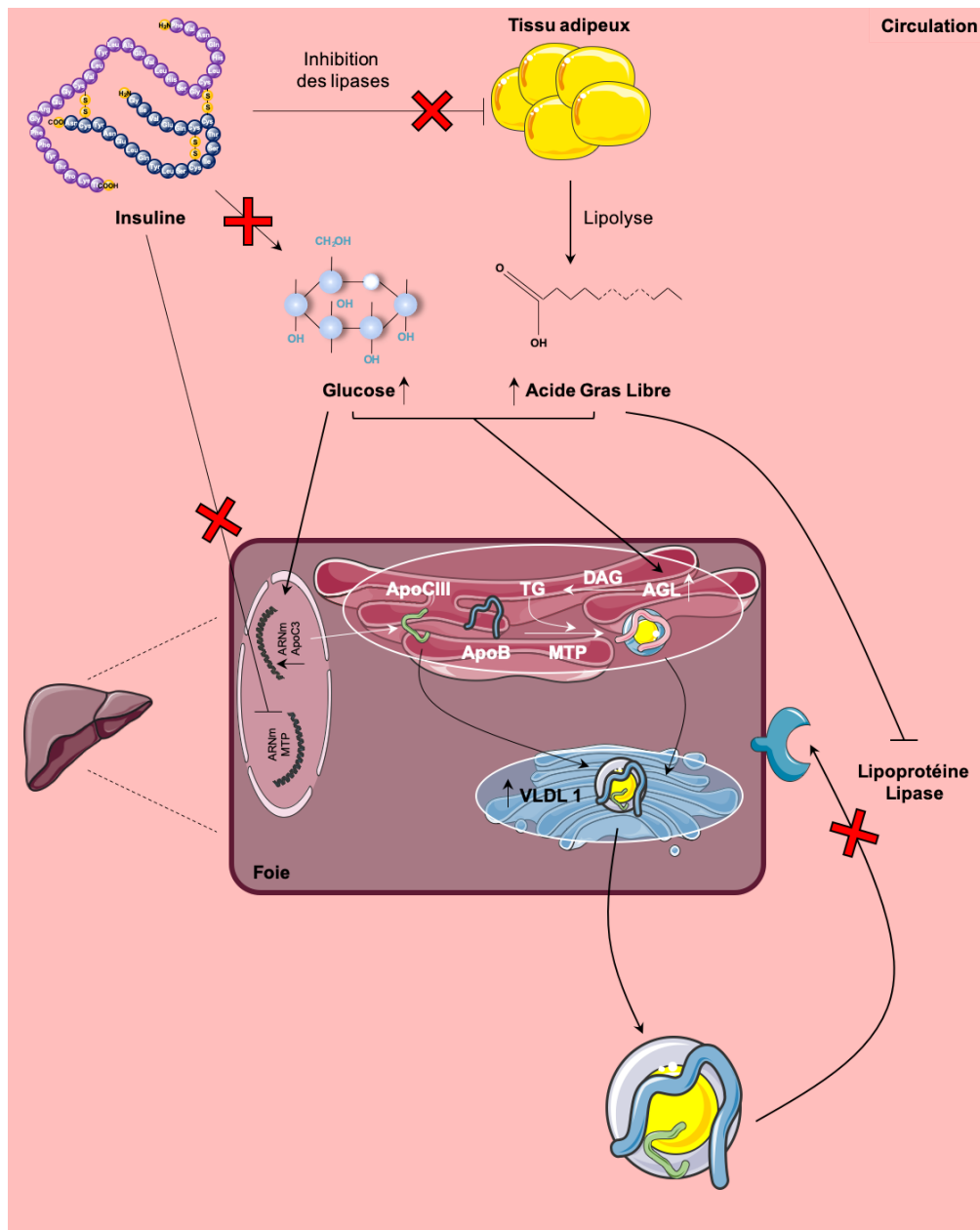


Figure 2 : Effet du diabète sur la production de VLDL

Lors du diabète l'insuline n'exerce plus ses rôles d'inhibition des lipases, de régulation de la glycémie et d'acteur de la transcription. L'augmentation du glucose circulant

entraîne l'augmentation de la lipogénèse hépatique et la disponibilité des AGL pour la formation des VLDL. De même la lipolyse du tissu adipeux entraîne une augmentation des AGL circulant, qui une fois capté par le foie augmente le stock des AGL disponible pour la formation des VLDL. En plus de ces effets les AGL circulant vont inhiber la lipoprotéine lipase et diminuer le catabolisme des VLDL.

Les patients diabétiques présentent aussi une hyperlipémie postprandiale causée par une production excessive des TRL hépatiques et intestinales. Chez les patients diabétiques de type 2, la production de l'ApoB-48 s'accroît et corrèle avec les niveaux d'insuline [37]. Les principaux facteurs de régulation de la sécrétion intestinale d'apoB-48 sont liés à l'augmentation du pool d'acides gras à conditionner sous forme de chylomicrons. Les lipides alimentaires sont émulsifiés et hydrolysés dans la lumière intestinale et sont transportés dans l'entérocyte par un certain nombre de transporteurs de lipides. CD36 facilite l'absorption des acides gras à longue chaîne [38]. En plus des AGL de l'alimentation, les AG circulants peuvent fournir un substrat pour l'assemblage des lipoprotéines. Une fois absorbés, les lipides sont estérifiés dans le RE avant de lipider le polypeptide apoB-48 naissant formant le chylomicron primaire (CMpri). L'apoA-IV est ajoutée à la particule de pré-chylomicron (preCM) dans le RE, ce qui permet l'expansion du noyau lipidique. La particule d'apoB-48 est exportée sous forme de PCTV (PreChylomicron Transport Vesicle) [38]. La particule d'apoB-48 subit une maturation supplémentaire dans le Golgi, l'ajout de l'apoA-I, avant d'être sécrétée au niveau de la membrane basolatérale [39]. Il a aussi été montré que les monosaccharides (le glucose en particulier) peuvent augmenter la production de lipoprotéines intestinales [40]. En plus de tout cela, des anomalies de sécrétion et de concentrations des incrétines (GLP-1, GLP-2 et GIP) chez les patients insulino-résistants peut induire une augmentation de la lipémie postprandiale [41]. GLP-1 supprime la sécrétion du chylomicron en partie grâce à son activité insulino-

une action directe sur les entérocytes. D'autre part, GLP-2 favorise indirectement la sécrétion du chylomicron en induisant une glycosylation post-traductionnelle de CD36 pour faciliter son expression au niveau de la membrane apicale, favorisant ainsi l'absorption des acides gras alimentaires [42]. Enfin, les chylomicrons entrent en compétition avec les VLDL afin d'être catabolisés par le foie conduisant à une prolongation de la présence des VLDL dans la sang et vice versa (Figure 3) [32].

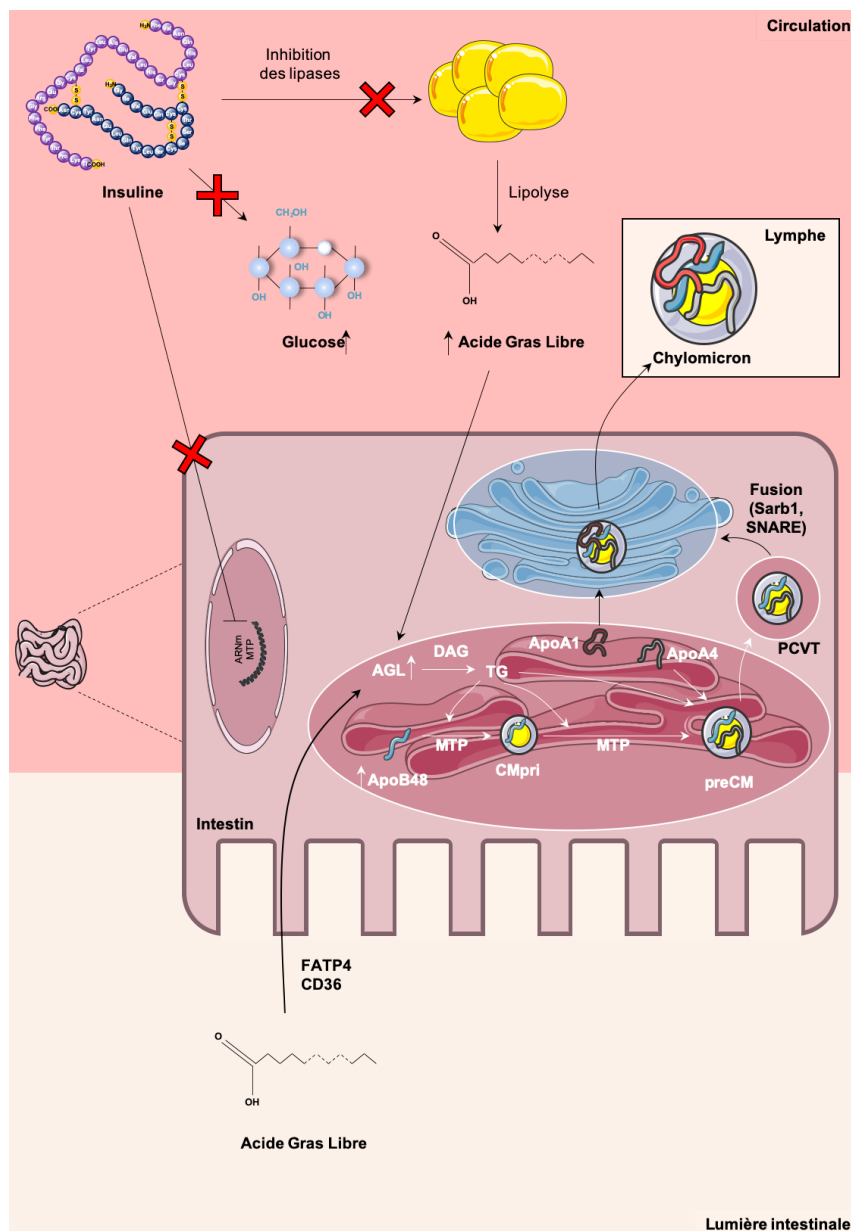


Figure 3 : Effet du diabète sur la production de chylomicron

Lors du diabète l'insuline n'exerce plus ses rôles d'inhibition des lipases et d'acteur de la transcription. La lipolyse du tissu adipeux entraîne une augmentation des AGL

circulant, qui une fois capté par l'intestin augmente le stock des AGL disponible pour la formation des chylomicrons. De plus, l'augmentation de la production d'ApoB-48 entraîne une augmentation de la formation des CMpri puis de la sécrétion des CM.

Tous ces phénomènes augmentent la production et diminuent la clairance des TRL provenant du foie et de l'intestin notamment en période postprandiale faisant de ce dernier événement un risque direct et majeure de la survenue des MCV chez les patients diabétiques. La table III répertorie les facteurs influençant la lipémie postprandiale (LPP) (Table III).

Facteurs	Effet sur la lipémie postprandiale	Références
Quantité de lipide ingéré	Augmentation de la LPP Augmentation de chylomicron-TG	[43][44] [45]
Composition en macronutriment	Diminution de la LPP lors d'un repas gras associée à la quantité de glucose	[46]
	Augmentation de la LPP lors d'un repas riche en glucide et protéine associée à l'augmentation des glucides	[47]
	Augmentation de la LPP en lien avec la quantité de fructose	[48]
Composition en micronutriment	Diminution de la LPP par les polyphénols Pas d'effet des polyphénols	[49] [50][51]
Consistance du repas	Retard de la LPP après un repas solide comparé à un repas liquide	[52][53]
Activité physique	L'activité physique avant un repas diminue la LPP	[54][55]
Tabagisme	Augmentation de la LPP due à une diminution de l'élimination des chylomicrons	[56][57]
Traitement anti lipidique	Diminution de la LPP par les statines et les fibrates	[58][59][60]
Alcool	Augmentation de LPP après l'ingestion d'alcool, effet atténué par l'activité physique régulière	[50][61]
Genre	Les femmes ont une LPP moins importante que les hommes	[62][63][64]
Âge	La LPP augmente avec l'âge	[65][66]

Ménopause	Les femmes ménopausées présentent une augmentation de leur LPP comparé aux femmes en pré-ménopause	[67][68]
Insulino résistance et diabète	Augmentation de LPP chez les patients diabétiques Le traitement à l'insuline peut réduire l'amplitude de la LPP	[69] [70]
Pression artérielle	Augmentation de la LPP chez les patients hypertendus	[71]
Obésité	Augmentation de la LPP chez les patients obèses	[72][73]

Tableau III : Facteurs influençant la lipémie postprandiale

4.5.b) L'hypercholestérolémie familiale

Le lien entre MCV et cholestérol n'est plus à faire, en effet dès le début des études visant à réduire l'incidence des MCV sur la mortalité générale, le cholestérol est apparu comme un facteur de risque majeur [2]. Les études épidémiologiques ont rapidement mis en lumière le lien direct du LDL cholestérol dans le développement des MCV [74]. Ainsi, les études interventionnelles ont montré qu'une réduction de 38 mg/dL de cholestérol permet de réduire le risque de survenue des MCV de 20-25% [75]. D'après les recommandations actuelles, les patients à très haut risque de MCV doivent avoir un niveau de LDL cholestérol inférieur à 50 mg/dL [76].

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est la maladie héréditaire autosomique dominante la plus fréquente dans le monde. Elle est principalement due à des mutations du gène du LDLR, mais aussi des gènes de l'apolipoprotéine B, ou de la proprotéine convertase subtilisine kexine de type 9 (PCSK9) (Figure 4). Cette maladie est associée à un niveau élevé de LDL-cholestérol (LDL-C) et à un risque important d'athérosclérose prématurée. La prévalence de cette maladie est de 1/250 pour les formes hétérozygotes [77]. Le risque de coronaropathie prématurée est environ 20 fois

plus élevé chez les hommes hétérozygotes, le risque le plus élevé étant observé chez les jeunes hommes non traités [78]. Les patients atteints de HF homozygote développent généralement une coronaropathie au cours de la deuxième décennie de leur vie. Le diagnostic clinique de la HF est basé sur un niveau élevé de LDL-C supérieur à 190 mg/dL, des symptômes physiques, par exemple, des xanthomes des tendons ou l'existence de ces signes chez des parents et des antécédents personnels ou familiaux de maladies coronariennes prématurées.

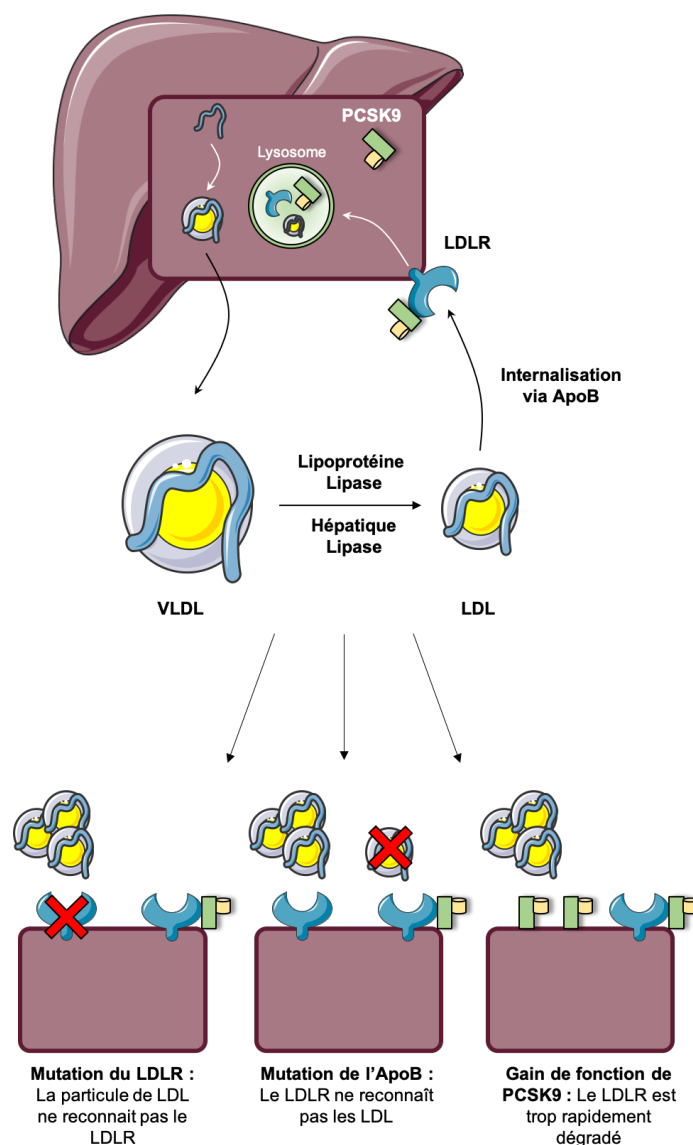


Figure 4 : Mutations conduisant à l'hypercholestérolémie familiale

L'apoB-100 est la protéine principale des lipoprotéines produites par le foie (VLDL, IDL, LDL). Une fois les VLDL sécrétés, l'apoB-100 est reconnue par le LDLR permettant

l'internalisation et le catabolisme des LDL de la circulation. PCSK9 est un inhibiteur du LDLR favorisant sa dégradation. Les mutations du LDLR empêchent la reconnaissance de l'ApoB-100. De même les mutations de l'ApoB-100 contrecarrent sa reconnaissance par le LDLR. Enfin, les mutations gain-de-fonction pour PCSK9 augmentent la dégradation du LDLR diminuant le catabolisme des LDL. Toutes ces mutations entraînent une augmentation des LDL circulants et conduisent à l'hypercholestérolémie familiale.

4.6) l'inflammation

La CRP (C Reactive Protein) n'était pas considérée comme un facteur de risque traditionnel, elle a en effet plutôt été considérée comme un prédicteur des MCV. Plus récemment, il a été montré que la CRP est un facteur de risque indépendant, après correction des autres facteurs de risque [79]. Un niveau de CRP circulante inférieur à 1mg/mL représente un risque faible, entre 1 – 3 mg/mL un risque moyen et au-dessus de 3mg/mL, un risque élevé pour les patients. Cette protéine découverte en 1930 est produite par le foie en réponse à une forte concentration d'IL-6 (Interleukine-6). Le rôle de la CRP reste un sujet de débat, notamment son implication directe ou non dans le développement de l'athérosclérose [80]. La CRP aurait un rôle sur la fonction endothéliale en augmentant les molécules d'adhésion sur le site de la plaque d'athérome [81], en atténuant les effets vasodilatateurs du NO (Nitric Oxyde) [82].

En plus de la CRP, d'autres facteurs inflammatoires jouent un rôle dans le développement des MCV. C'est le cas de l'interleukine-1 β (l'IL-1 β) qui joue de multiples rôles dans le développement de la plaque d'athérome notamment par l'induction de l'activité pro-coagulante, l'adhésion des monocytes et des leucocytes aux cellules endothéliales vasculaires et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires. Chez les souris, la déficience en IL-1 β réduit la formation de lésions, alors que chez les porcs nourris avec un régime enrichi en cholestérol, l'exposition à l'IL-1 β augmente l'épaississement de l'intima média. De plus, la protéine 3 du récepteur de

type NOD (NLRP3) de l'inflammasome active L'IL-1 β , un processus favorisé par les cristaux de cholestérol, les neutrophiles piégés, et l'hypoxie tissulaire qui sont connus pour favoriser le développement de l'athérosclérose [83]. Cette activation de l'IL-1 β stimule la voie de signalisation du récepteur de l'IL-6, qui a été mise en cause par des études de randomisation mendélienne dans le développement de l'athérosclérose [84]. Plus récemment, des études sur des souris parabiotiques et sur l'hématopoïèse clonale ont mis en cause l'IL-1 β dans les processus d'activation de la moelle osseuse qui accélèrent l'athérosclérose [85].

Enfin le système adaptatif participe au recrutement des monocytes et à l'activation des macrophages, notamment par la production d'IFN γ (Interferon) au niveau de la plaque. Les lymphocytes Th1 (T Helper 1) sont la population des lymphocytes CD4+ la plus représentée au sein de la plaque. Le rôle des autres lymphocytes semble moins prédominant (pour revue [86]).

4.7) Inter-relation des facteurs de risque cardiovasculaires

Dans les paragraphes précédents, nous avons discuté des facteurs de risque modifiables de manière indépendante. Il est très important de noter que tous ces facteurs de risque des MCV sont liés entre eux. En effet, le tabagisme augmente l'incidence de l'hypertension artérielle et du diabète [87]. Pendant que le diabète augmente la survenue de l'hypertension artérielle et que l'inactivité physique provoque un risque de surpoids voire d'obésité qui augmente à son tour l'incidence du diabète et des dyslipidémies. Tous ces facteurs ne sont pas additifs au regard du risque mais multiplicatifs ce qui fait que la lutte contre un facteur de risque peut s'avérer efficace contre un autre type de risque et vice versa. La table II récapitule les objectifs thérapeutiques des différents risques évoqués plus haut (Table IV).

Tabagisme	Aucune exposition au tabac
Alimentation	Faible teneur en graisses saturées, l'accent étant mis sur les produits à base de céréales complètes, les légumes, les fruits et le poisson.
Activité physique	Au moins 150 minutes par semaine d'activité aérobie modérée ou 75 minutes par semaine d'activité aérobie vigoureuse
Poids	IMC compris entre 20-25 kg/m ² . Tour de taille <94 cm (hommes) ou <80 cm (femmes).
Pression artérielle	<140/90 mmHg
Lipides Le LDL-cholestérol est la première cible	Risque très élevé : <1,8 mmol/L (<70 mg/dL), ou une réduction d'au moins 50 % si le niveau de référence est compris entre 1,8 et 3,5 mmol/L (70 et 135 mg/dL) Risque élevé : <2,6 mmol/L (<100 mg/dL), ou une réduction d'au moins 50 % si le niveau de référence est compris entre 2,6 et 5,1 mmol/L (100 et 200 mg/dL) Risque faible à modéré : <3,0 mmol/L (<115 mg/dL).
HDL-C	Pas de cible mais >1,0 mmol/L (>40mg/dL) chez les hommes et >1,2 mmol/L (>45 mg/dL) chez les femmes indiquent un risque plus faible.
Triglycérides	Aucun objectif, mais <1,7 mmol/L (<150 mg/dL) indique un risque plus faible et des niveaux plus élevés indiquent la nécessité de rechercher d'autres facteurs de risque.
Diabète	HbA1c <7% (<53 mmol/mol)
Inflammation	Risque élevé : CRP > 3mg/mL Risque modéré : CRP 1 – 3 mg/mL Risque faible : CRP < 1 mg/mL

Tableau IV : Objectifs des facteurs de risque et niveaux à atteindre pour les principaux facteurs de risque cardiovasculaire (adapté de Piepoli et al. 2020)

5) Utilisation du SCORE en pratique clinique

En pratique clinique, l'utilisation de tables d'évaluation permet d'apprécier le risque d'un patient de développer une MCV. Le SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) est une table d'évaluation du risque de MCV utilisée afin d'estimer le risque d'un patient de développer une MCV fatale dans les 10 années à venir (Figure 5). Ainsi, pour calculer le risque de MCV fatale et non fatale, il faut multiplier le résultat du SCORE par 3 pour les hommes et 4 pour les femmes (ex : un SCORE de 5% représente 15% de risque de développer une MCV fatale et non fatale chez un homme dans les 10 ans et 20% chez une femme) [75].

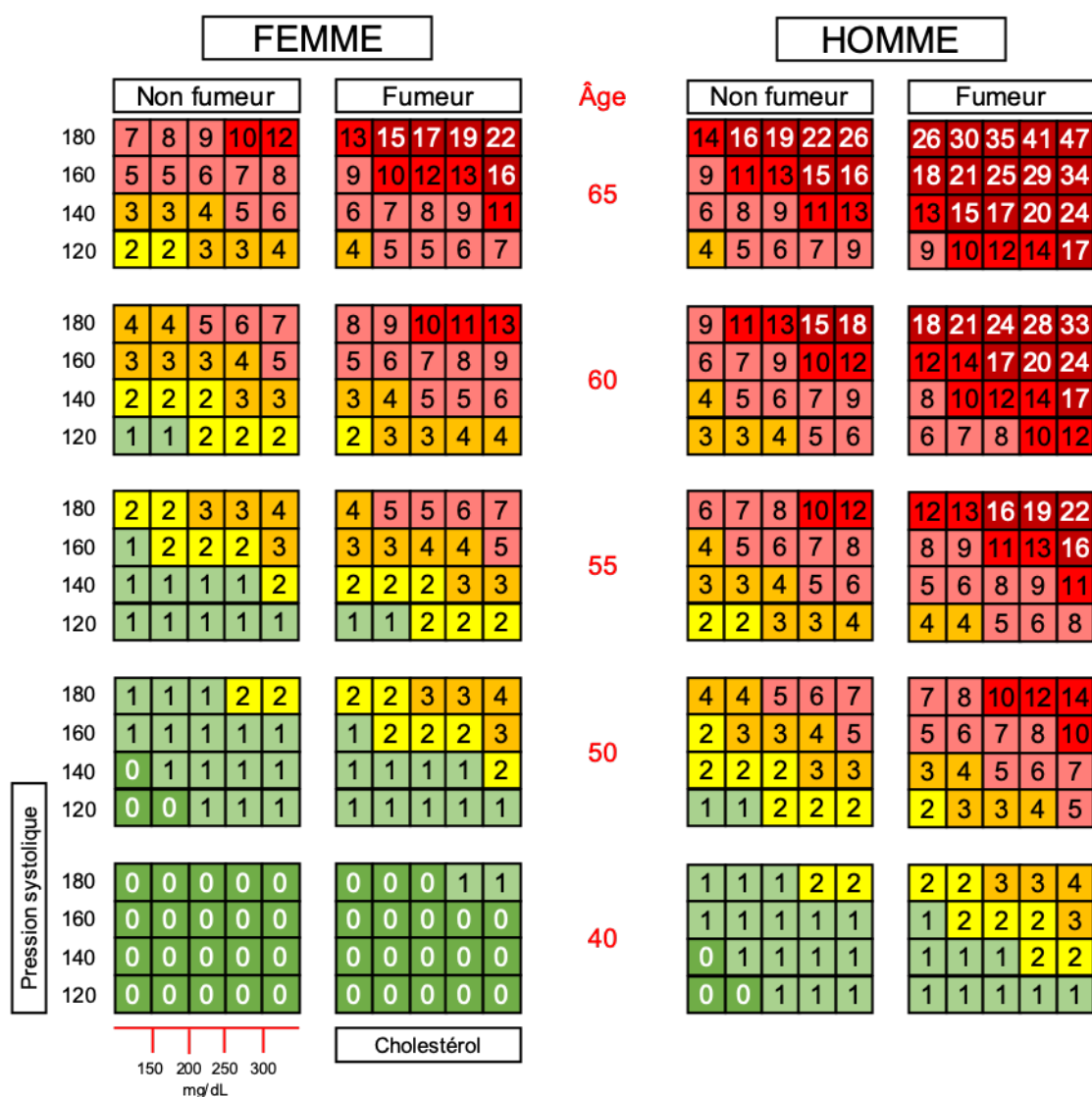


Figure 5 : Exemple de table de SCORE pour l'évaluation du risque sur 10 ans de la survenue des MCV (adapté de European guidelines 2016)

6) Historique des traitements hypolipémiants avant l'émergence des inhibiteurs de PCSK9

6.1) Statines

Dans les années 1970s, les traitements de l'hypercholestérolémie n'étaient pas optimaux, de par leurs effets modestes sur les lipides et leurs effets secondaires nombreux [88]. Les études de la voie de synthèse du cholestérol ont révélé que

l'HMGCoA reductase est l'enzyme limitante de la production de cholestérol [88]. La découverte, en 1971 par l'équipe au Japon de Akira Endo et Masao Kuroda, des statines a permis de révolutionner le traitement de l'hypercholestérolémie [89].

Les statines font partie aujourd'hui des médicaments les plus consommés au monde. Les statines permettent de réduire drastiquement les niveaux circulants de LDL-cholestérol et de diminuer efficacement la survenue des MCV chez les patients traités (revue dans [90]). Toutefois, en dépit de ces atouts, environ 50% des patients traités n'atteignent pas les recommandations cliniques après 2 ans de traitement [91]. Afin de renforcer la réduction de la cholestérolémie chez ces patients, des traitements complémentaires ont été recommandés, c'est notamment le cas de l'ézétimibe.

6.2) Ézétimibe

La découverte de l'ézétimibe a été initiée dans le cadre de développement d'inhibiteurs de l'ACAT (acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase) qui est une protéine importante dans l'estérification du cholestérol intracellulaire. Malheureusement, cette stratégie thérapeutique, malgré des résultats concluants *in vitro*, s'est montrée décevante *in vivo* sur le modèle d'hamster nourri au cholestérol [92]. Seule une molécule, l'azétidinone, a montré un effet significatif sur la cholestérolémie. En fait, il est apparu que l'azétidinone n'inhibe pas l'activité de l'ACAT mais reste localisé au niveau de la lumière intestinale empêchant l'absorption du cholestérol. C'est lors d'études plus poussées sur les métabolites de l'azétidinone qu'une deuxième classe de molécules, l'ézétimibe, fut mise au point. La découverte de cette molécule s'est donc effectuée sans connaître la cible ni le transporteur du cholestérol présent au niveau de la bordure apicale des entérocytes. L'étude de Altmann en 2004 montre que l'ézétimibe n'a pas d'effet sur l'absorption intestinale du

cholestérol chez des souris totalement déficientes en transporteur Npc1l1 démontrant pour la première fois que l'ézétimibe agit via NPC1L1 (Niemann-Pick C1 like 1) [93]. La limite des études sur l'ézétimibe est que cette molécule est responsable d'une réduction de la cholestérolémie uniquement chez les modèles animaux nourris avec un régime enrichi en cholestérol. A l'inverse, les souris nourries sous régime standard ne présentent aucune réduction de leur cholestérolémie lors du traitement par l'ézétimibe. Davis et al. ont utilisé les statines et l'ézétimibe en co-thérapie à des doses inactives séparément et observé un effet significatif de la co-administration. Ce fut le cas chez le chien sous régime standard après 14 jours d'un traitement par la lovastatine (5mg/kg) et l'ézétimibe (0,007 mg/kg) permettant de réduire les niveaux de cholestérol. D'autres études similaires ont montré le même effet chez d'autres modèles (revue dans [94]).

La première étude clinique conduite chez l'Homme en 2002 montre que l'ézétimibe réduit de 54% l'absorption du cholestérol comparé aux patients contrôles [95]. Au-delà de la baisse d'absorption, les auteurs ont remarqué une augmentation de la synthèse endogène de cholestérol. Ces deux phénomènes s'accompagnent néanmoins d'une réduction des niveaux circulants de LDL-C de 22,3% [95]. Par la suite, de nombreuses études ont établi l'efficacité de la combinaison thérapeutique des statines et de l'ézétimibe sur différentes populations (revue dans [96]). Enfin, l'étude IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes : Vytorin Efficacy International Trial) montre une réduction significative de 13% du risque d'incidence d'un infarctus du myocarde et de 21% d'un AVC chez les patients traités avec la simvastatine et l'ézétimibe comparé à une monothérapie à la simvastatine [97]. L'étude IMPROVE-IT est la première étude à mettre en évidence un bénéfice thérapeutique de l'ajout d'un agent hypolipidémiant (ézétimibe) aux statines sur les MCV.

Chapitre 2 : Métabolisme du cholestérol et découverte de PCSK9

1) Contrôle de l'homéostasie du cholestérol par le foie

1) Rôle du cholestérol

Depuis son isolement des calculs biliaires en 1789, la molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$, MW : 386,65 kDa) a fait l'objet de nombreuses études. Le cholestérol est composé de 4 cycles carbonés formant le noyau stérol et possède un groupement hydroxyle sur le carbone 3. Ce groupement chimique contribue aux fonctions particulières du cholestérol vis-à-vis des autres lipides car il constitue la tête polaire hydrophile (Figure 6).

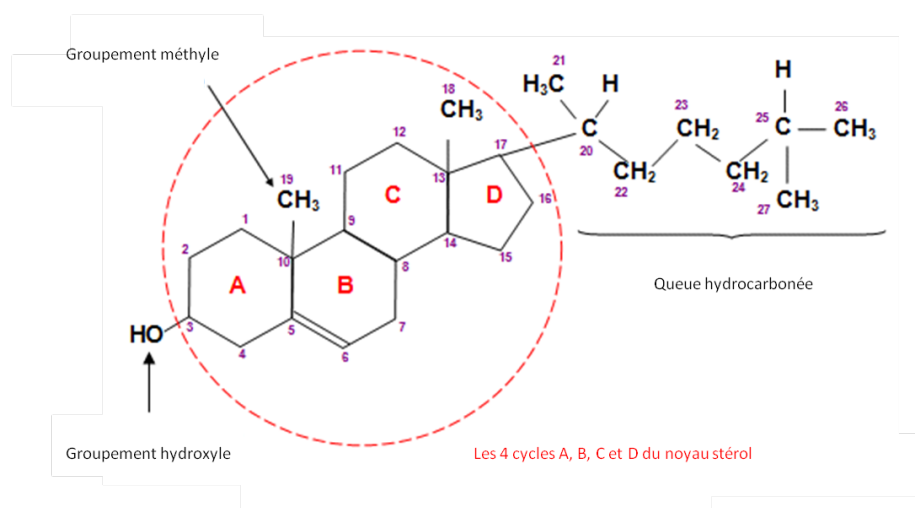


Figure 6 : Structure 2D de la molécule de cholestérol

Le cholestérol participe à de nombreux processus au sein de la cellule. Tout d'abord le cholestérol est un constituant essentiel de la membrane plasmique des cellules. La structure chimique du cholestérol permet de rigidifier la membrane plasmique et de la rendre moins perméable aux molécules polaires permettant ainsi l'existence de concentrations différentes en ions et solutés de part et d'autre de la membrane cellulaire [98].

Le cholestérol est le précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes. La synthèse des acides biliaires a lieu dans les hépatocytes où le cholestérol peut subir une suite de modifications afin de produire de l'acide cholique (CA) ou de l'acide chénodéoxycholique (CDCA). La voie principale, permettant la synthèse de CA, est médiée par la CYP7A1 (Cytochrome P 450 7A1) et ajoute un groupement hydroxyle sur le 7 carbone du cholestérol [99][100]. La voie alternative, permettant la synthèse de CDCA, est médiée par la CYP27A1 [101]. La synthèse des hormones stéroïdiennes a lieu au niveau des gonades (testostérone, œstrogène et progestérone), des glandes surrénales (cortisol et aldostérone) et du placenta. Le cholestérol va subir une série de modifications par des enzymes de la famille du cytochrome P450 et de l'hydroxystéroïde déhydrogénase [102]. Ces modifications vont entraîner un raccourcissement de la chaîne carbonée en position C17 et une hydroxylation du noyau stéroïde [102].

En outre, non seulement le cholestérol ou l'excès de cholestérol est important dans la pathogenèse des MCV, mais est également impliqué dans la démence, le diabète et le cancer [103][104][105]. L'importance biomédicale incontestée du cholestérol alimente la recherche biologique moléculaire et cellulaire sur cette molécule (Figure 7).

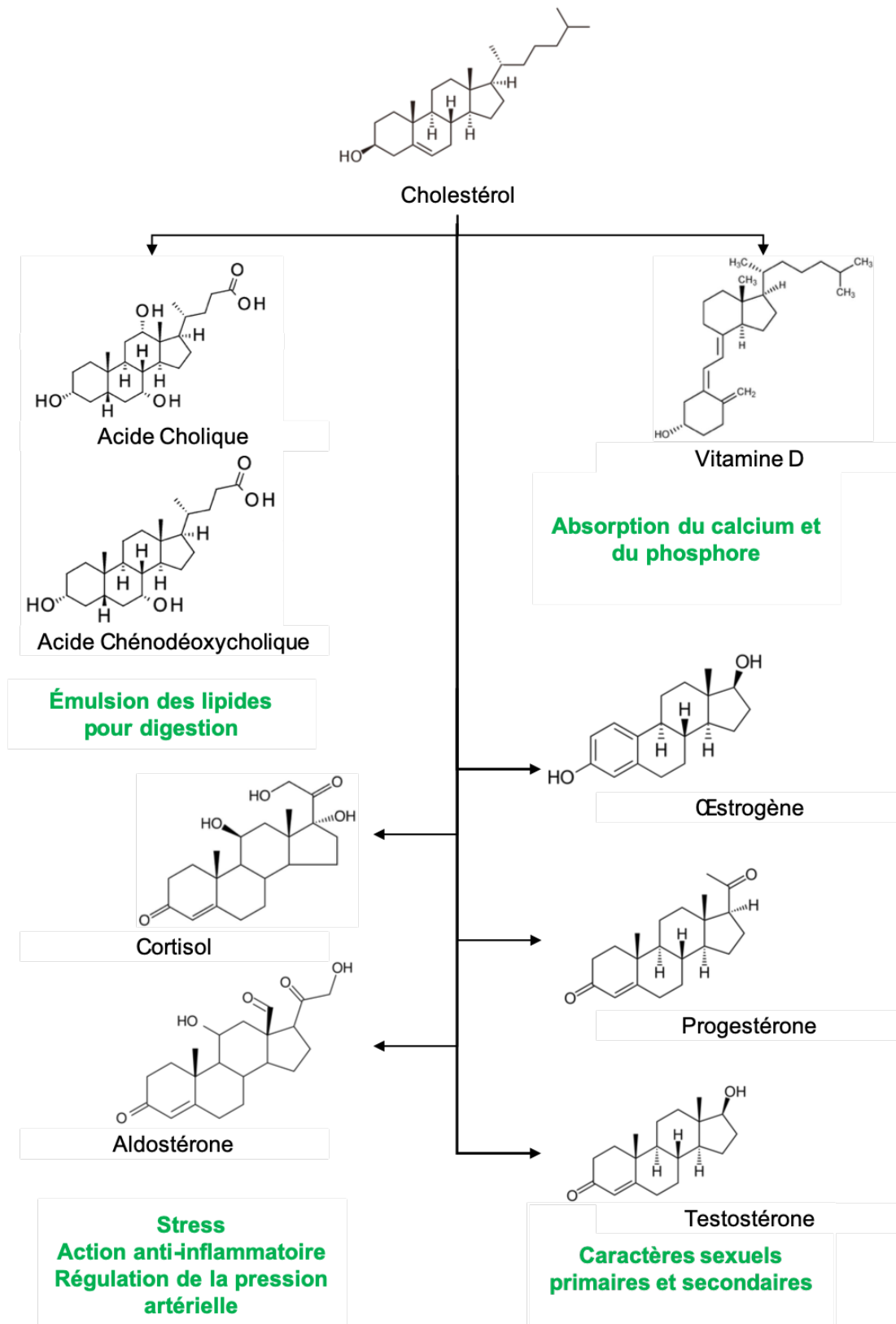


Figure 7 : Dérivés du cholestérol et leurs fonctions

2) Origine du cholestérol

Le cholestérol peut provenir de deux sources distinctes : endogène et exogène.

2.1) voie endogène

Quantitativement, le foie est l'organe majeur de synthèse endogène du cholestérol. La voie de biosynthèse du cholestérol est un processus biochimique complexe. En général, cette voie peut être divisée en deux étapes : la condensation des unités isoprénoïdes pour donner la molécule de squalène à 30 atomes de carbone et ensuite la cyclisation du squalène pour produire du lanostérol, qui est finalement converti en cholestérol. La voie commence par la formation du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA (HMG-CoA) à six carbones à partir d'une molécule d'acétyl-CoA, formée de 2 carbones, et d'une molécule d'acétoacétyl-CoA catalysée par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA synthase (HMGCoAS). L'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA réductase (HMGCoAR), liée à la membrane, convertit l'HMG-CoA en mévalonate. Cette étape est l'étape limitante de la synthèse du cholestérol et est ciblée par les statines (Figure 8).

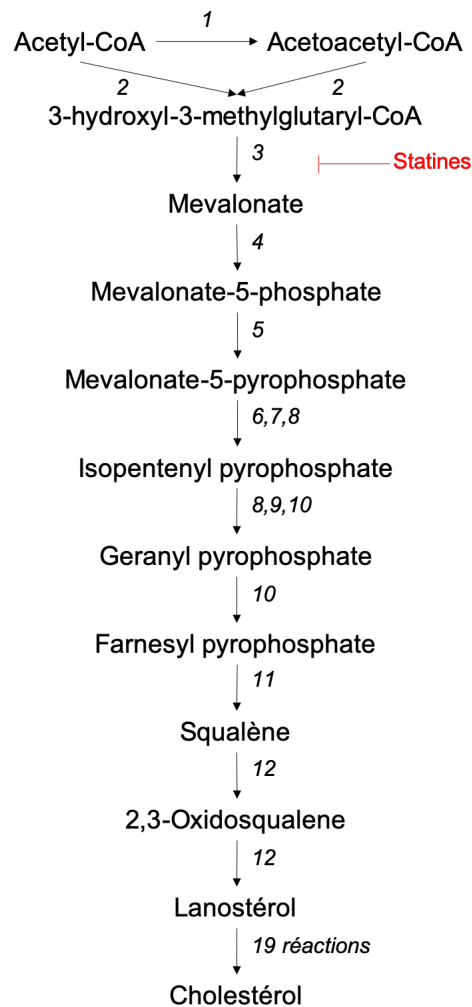


Figure 8 : Schéma de la synthèse endogène du cholestérol

(1) Thiolases ou acétyl-coenzyme A acétyltransférases, (2) hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase, (3) hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase, (4) mévalonate-3-kinase ou mévalonate-5-kinase, (5) mévalonate-3-phosphate-5-kinase ou phosphomévalonate kinase, (6) mévalonate-5-phosphate décarboxylase, (7) mévalonate pyrophosphate décarboxylase, (8) isopentényl phosphate kinase, (9) isopentényl pyrophosphate isomérase, (10) farnésyl-diphosphate synthase, (11) squalène synthase, (12) squalène monooxygénase ou squalène époxydase, et 19 réactions sont incluses : déméthylations, désaturations, isomérisations et réductions multiples.

2.2) *voie exogène*

Le cholestérol exogène vient de l'apport alimentaire. C'est l'intestin qui va permettre son entrée dans l'organisme. Les différences interindividuelles d'absorption du cholestérol alimentaire ont orienté la recherche vers la découverte des protéines impliquées dans l'influx et l'efflux du cholestérol par les entérocytes [106][107]. La découverte de mutations dans des protéines transmembranaires modulant l'absorption du cholestérol au niveau intestinal a permis d'étayer l'hypothèse d'absorption active et non passive [108][109][110]. A ce jour trois protéines clefs sont responsables de l'absorption et de l'efflux du cholestérol dans l'entérocyte : NPC1L1, ABCG5 et ABCG8 (ATP-Binding Cassette sub-family G 5/8) (Figure 9).

L'absorption est médiée par le transporteur NPC1L1 et les flotillines associées présentes à la surface apicale des entérocytes [93]. Les souris déficientes en NPC1L1 présentent une diminution d'environ 70% de l'absorption du cholestérol marqué donné par voie orale [93]. De plus, comme décrit dans le paragraphe 6.2 du chapitre 1, l'ézétimibe est capable d'inhiber NPC1L1 et ainsi réduit l'absorption du cholestérol et la cholestérolémie [95]. La régulation de l'expression de NPC1L1 montre également que l'inhibition de cette protéine réduit la cholestérolémie. Par exemple, les fénofibrates activent le facteur de transcription PPAR α (Peroxisome Proliferator-activated Receptor) qui à son tour réduit l'expression de NPC1L1 réduisant ainsi l'absorption du cholestérol [111]. De plus, l'activation de PPAR δ induit une baisse de 43% de la cholestérolémie impliquant une réduction de l'expression de NPC1L1 [112]. Le facteur de transcription CREBH (Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein H) semble, lui aussi, impliqué dans la régulation de NPC1L1. En effet, sa sur-expression chez la souris est associé à une baisse de la cholestérolémie accompagnée par une réduction de l'expression de NPC1L1 [113].

Les protéines ABCG5 et ABCG8 fonctionnent en hétérodimères et partagent un promoteur commun [114]. Le transporteur ABCG5/8 est responsable de l'efflux du cholestérol de l'entérocyte vers la lumière intestinale. En effet, une sur-expression d'ABCG5/8 chez la souris diminue l'absorption du cholestérol lorsque son inhibition augmente l'absorption [115]. Ce transport est aussi, extrêmement important, dans la régulation de l'absorption des sitostérols. En effet, ces stérols d'origine végétale sont excrétés par ABCG5/8 et des mutations d'ABCG5/8 entraînent l'apparition d'une pathologie appelée sitostérolémie. Cette pathologie est associée à une augmentation de l'absorption des sitostérols qui participent au développement des MCV [116].

2.3) Voies d'élimination du cholestérol

L'élimination du cholestérol s'effectue en 2 étapes. La première est le transport inverse du cholestérol (Reverse Cholesterol Transport, RCT). Ce phénomène consiste au « retour » du cholestérol périphérique, notamment des macrophages, vers le foie via les lipoprotéines de haute densité (détaillé dans le paragraphe IV du chapitre 2). La seconde étape consiste en l'excrétion du cholestérol dans la lumière intestinale qui peut s'effectuer par deux mécanismes distincts. Le premier mécanisme se déroule au niveau du foie. En effet, le cholestérol sera transformé en acides biliaires via les enzymes CYP7A1 et CYP27A1 puis excrété dans la vésicule biliaire par les transporteurs ABCG5/ABCG8 [117]. Le second mécanisme se déroule au niveau intestinal. En effet, la mise en évidence d'une excrétion non biliaire du cholestérol remonte à 1927 grâce aux expériences de Sperry révélant la présence de cholestérol dans les fèces de chien chez qui la voie biliaire était préalablement dérivée [118]. Ce n'est qu'en 2007 suite aux travaux de Van der Velde et al. [119] que l'intestin est placé au centre de cette voie d'élimination du cholestérol. Ce phénomène est appelé TICE

(Trans Intestinal Cholesterol Excretion) (détaillé dans le paragraphe III 1.2 du chapitre 2).

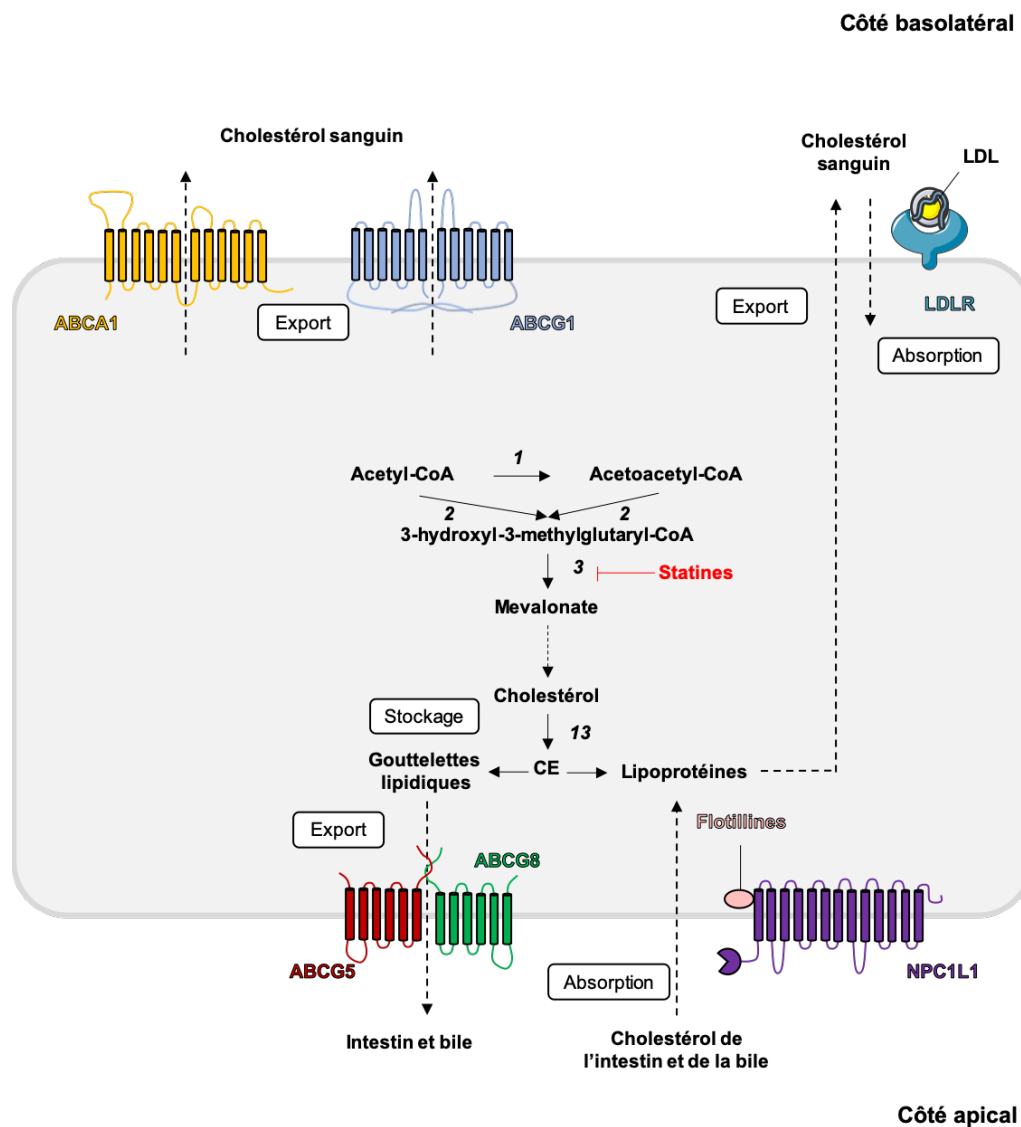


Figure 9 : Principales voies du métabolisme du cholestérol dans une cellule polarisée (adapté de Luo et al. 2019)

Le cholestérol transporté par les particules de LDL dans le sang peut être absorbé par le LDLR à la surface basale des cellules polarisées (telles que les entérocytes ou les hépatocytes). Le cholestérol libre peut également être absorbé à partir de sources alimentaires par les entérocytes dans l'intestin et à partir de la bile dans les voies biliaires par les hépatocytes dans le foie. Cette absorption est médiée par NPC1L1 et les flotillines associées présentes sur la surface apicale de ces cellules. L'excès de cholestérol est exporté dans le sang par ABCA1 ou ABCG1, ou dans la lumière intestinale et les canaux biliaires par l'hétérodimère ABCG5 et ABCG8.

II) Découverte et rôle hépatique de PCSK9

1) Du gène à la fonction

1.1) Découverte de PCSK9

En 2003, Nabil Seidah et son équipe identifient le neuvième membre de la famille des proprotéines convertases, PCSK9 [120]. La même année, l'équipe française dirigée par Catherine Boileau identifie deux mutations S127R et F216L pour *PCSK9* chez deux familles françaises ayant un diagnostic clinique d'hypercholestérolémie familiale sans mutations dans les gènes *LDLR* ou *APOB* faisant de *PCSK9* un gène impliqué dans le métabolisme du cholestérol [121]. Un mécanisme gain-de-fonction (GOF) de PCSK9 a été suspecté comme étant à l'origine des niveaux élevés de LDL-C chez les porteurs, ce qui a été rapidement confirmé par l'étude de Maxwell et al. en 2004, qui montre que la surexpression de PCSK9 dans le foie des souris entraîne une hypercholestérolémie en réduisant le nombre ou l'activité du LDLR [122]. A l'inverse, des données génétiques suggèrent un rôle de l'inhibition de PCSK9 dans la réduction des concentrations de LDL-C. En effet, en 2005, l'équipe d'Helen Hobbs a identifié des mutations perte-de-fonction (LOF), Y142X et C679X dans une population d'Afro-Américains associées à une réduction de 28% du LDL-C et à une réduction de 88% du risque des MCV [123].

1.2) Mode d'action de PCSK9

La structure de la PCSK9 est caractérisée par un peptide signal, un pro-domaine et un domaine catalytique, suivis d'une région C-terminale. PCSK9 est synthétisée sous la forme d'une pro-enzyme inactive de 75 kDa qui subit un clivage

auto-catalytique dans le réticulum endoplasmique (RE) produisant un fragment d'environ 60 kDa. Le clivage auto-catalytique du zymogène dans le RE est essentiel pour la maturation et la sécrétion de la protéine. En effet, le segment clivé du pro-domaine s'associe de manière non covalente avec le domaine catalytique et agit comme une chaperonne de repliement et un inhibiteur du site catalytique (Figure 10) [124].

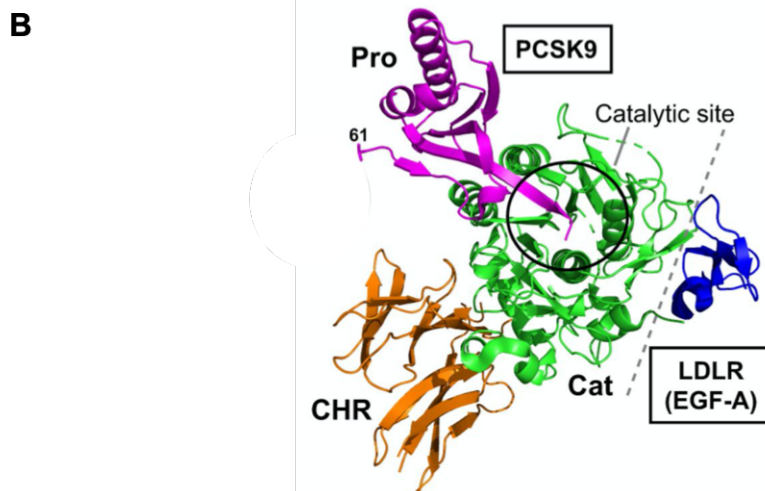
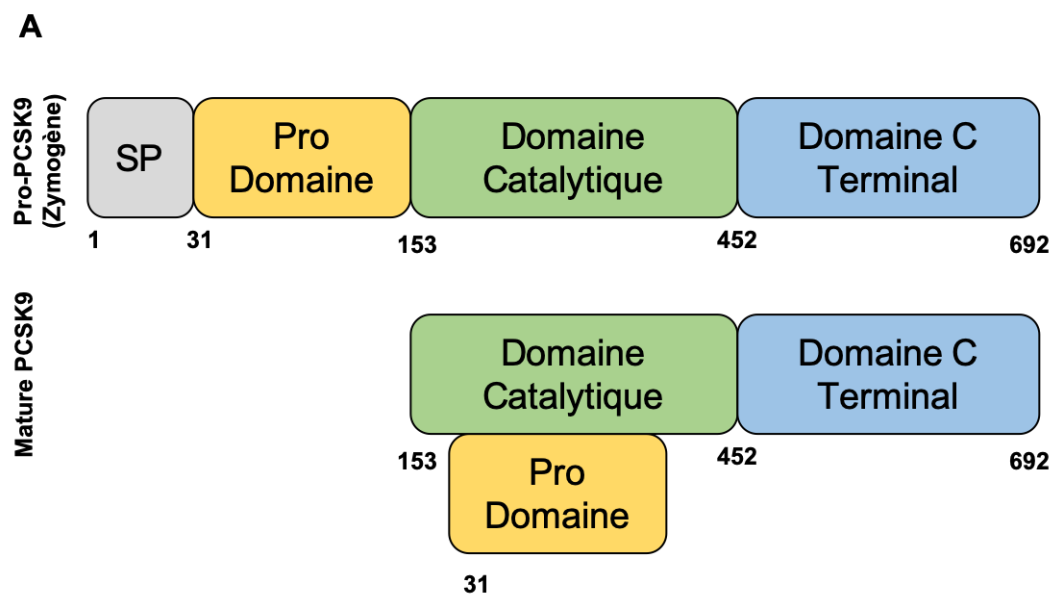


Figure 10 : Structure de PCSK9 (d'après Sarkar et al. 2020)

Les études mécanistiques ont identifié une voie extracellulaire et éventuellement intracellulaire de l'action de PCSK9. Au niveau intracellulaire, la PCSK9 naissante peut se lier au LDLR et le diriger du trans-Golgi vers le lysosome pour dégradation [126]. Au niveau extracellulaire, la PCSK9 sécrétée se lie au domaine EGF-A (Epidermal Growth Factor-A) du LDLR à la surface de la cellule, et le complexe PCSK9/LDLR est internalisé dans les compartiments endosomaux/lysosomaux [127]. L'affinité du complexe PCSK9-LDLR est augmentée dans l'endosome en raison d'une acidité plus élevée [128]. L'absence de libération de PCSK9 entrave le recyclage du LDLR et réduit son abondance à la surface des cellules [129], le LDLR étant alors redirigé de l'endosome vers le lysosome où il est dégradé [127]. Ainsi PCSK9 agit, indépendamment de son activité catalytique, comme une chaperonne du LDLR conduisant à sa dégradation [130][131] (Figure 11).

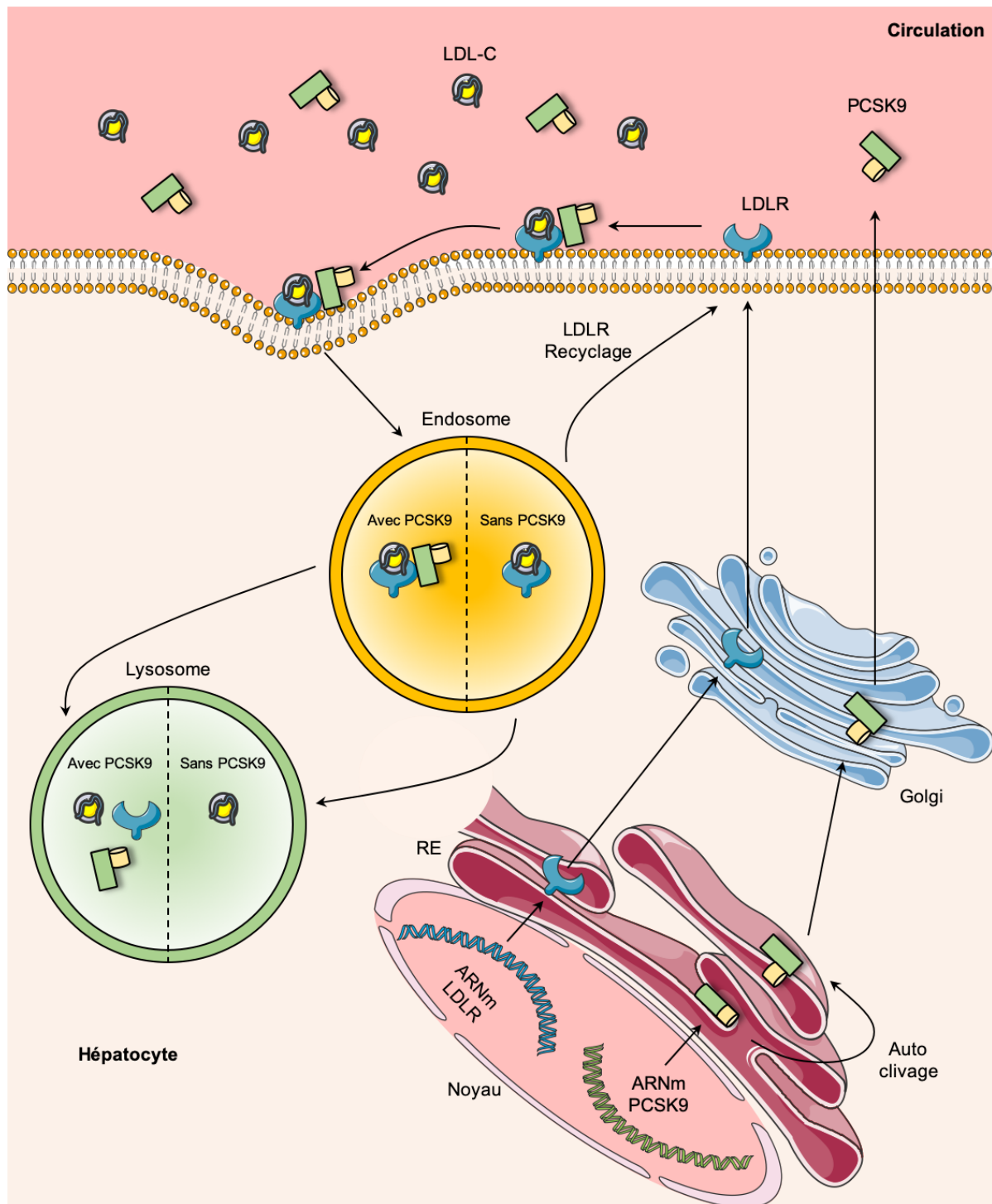


Figure 11 : Effet de PCSK9 (adapté de Bergeron et al. 2015)

PCSK9 est synthétisée au niveau du RE où elle s'auto-clive permettant sa maturation et son transport dans l'appareil de Golgi via le complexe COPII. Une fois dans l'appareil de Golgi PCSK9 subit des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations, permettant sa sécrétion dans la circulation sanguine. Une fois dans le sang, PCSK9 se lie au domaine EGF-A du LDLR entraînant son internalisation et inhibant le recyclage du LDLR à la membrane plasmique. Ce phénomène conduit à la dégradation du LDLR.

1.3) Mutants de PCSK9

Aujourd'hui de nombreuses mutations gain ou perte-de-fonction ont été référencés pour *PCSK9*. Leurs mécanismes d'actions ont permis de mieux comprendre la fonction de PCSK9. En effet, les mutations sont situées sur différents domaines de PCSK9 altérant ou augmentant son activité (Figure 12). Au final, les mutations GOF diminuent l'expression du LDLR à la surface des cellules (détaillé dans le paragraphe 1.3.a du chapitre 2). A l'inverse, les mutations LOF induisent toutes une augmentation de la présence du LDLR à la surface des cellules (détaillé dans le paragraphe 1.3.b du chapitre 2)

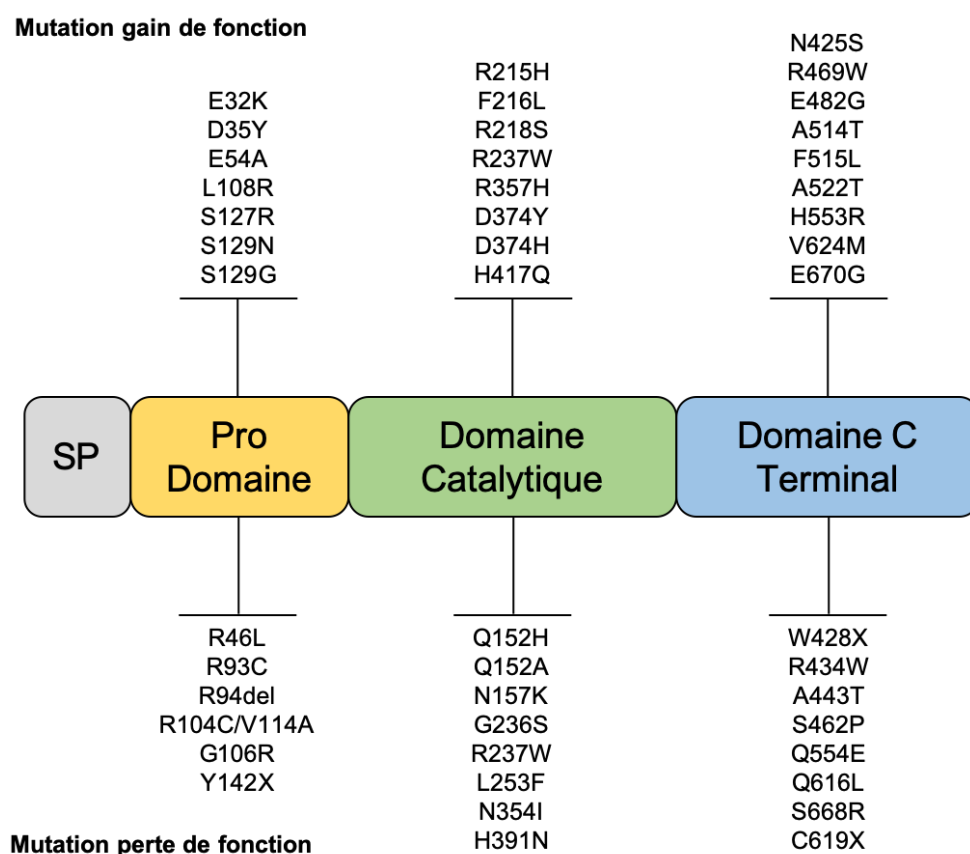


Figure 12 : Schéma des mutations de PCSK9 (adapté de Dron et al. 2017)

1.3.a) Gain de fonction (GOF)

Les mutations GOF de *PCSK9* constituent la troisième cause d'hypercholestérolémie familiale, et représente moins de 1 % des cas dans la plupart des cohortes cliniques. En revanche, les mutations LOF du *LDLR* et les mutations de l'*APOB* affectant la liaison au LDLR représentent respectivement 80-90% et 5-10% des cas dans la plupart des cohortes d'hypercholestérolémie familiale [132]. Plus de 30 mutations GOF de *PCSK9* ont été identifiées, la plupart sont des mutations non-sens distribuées sur l'ensemble de la région codante de *PCSK9* et affectant tous les domaines de la protéine [133]. Les études fonctionnelles des différentes mutations GOF de *PCSK9* montrent que l'augmentation de la dégradation du LDLR est la cause de l'hypercholestérolémie. Les différents mutants atteignent ce but par le biais de mécanismes distincts.

Les mutations localisées dans la région du pro-domaine montrent une grande diversité de mécanismes augmentant la dégradation du LDLR. La mutation D35Y augmente la dégradation intracellulaire du LDLR en modifiant la structure secondaire du pro-segment, ainsi entraînant une affinité intracellulaire accrue de *PCSK9* envers le LDLR [134]. A l'inverse, les mutations S127R et D129G ont lieu à côté du site auto-catalytique de *PCSK9* et induisent une baisse du clivage du zymogène [135][136]. En effet, la mutation S127R réduit de 66% le clivage auto-catalytique de *PCSK9* [137] et le changement structural augmente l'affinité pour le LDLR de 5 fois par rapport à la forme sauvage de *PCSK9* [129]. Les mutations dans le pro-domaine peuvent aussi augmenter la stabilité du complexe *PCSK9*-LDLR extracellulaire. C'est le cas des mutations L108R et D129N, non pas par leur capacité à produire un clivage ou une

structure altérés mais connues pour augmenter la stabilité de l'interaction entre PCSK9 et LDLR en dehors de la cellule [134][138].

Une autre protéine convertase, la furine (ou PCSK3) est capable de cliver PCSK9 et ainsi de l'inactiver, réduisant sa capacité à inhiber le LDLR [139][140]. Ce clivage a lieu entre l'arginine 218 et la glutamine 219 du domaine catalytique de PCSK9 [140]. Les mutations situées au niveau du domaine catalytique confèrent une résistance partielle ou totale au clivage de PCSK9 par la furine. En effet, les mutations R215H [141], R218S [136][142], F216L [140][143] et D374Y [136][140][141] sont connues pour rendre PCSK9 résistant à la furine. La mutation D374Y est considérée comme la plus active des GOF de PCSK9 [129]. En effet, cette mutation apparaît au niveau du site responsable de la liaison de PCSK9 avec le LDLR et augmente la stabilité du complexe PCSK9-LDLR; ce qui entraîne une augmentation de 10 fois de la dégradation du récepteur et une réduction de 61% de l'internalisation du LDL-C [136][138].

Peu de choses sont connues sur les mécanismes des GOF présentes dans la partie C-terminale de PCSK9. Il se peut que la mutation N425S située dans la région charnière (résidus 422-439) de la protéine ait des conséquences structurelles augmentant l'interaction extracellulaire de PCSK9 avec le LDLR [138]. Une autre mutation, R469W dans une autre partie de la région C-terminale influencerait l'interaction PCSK9-LDLR par un mécanisme non élucidé [138].

1.3.b) Perte de fonction (LOF)

Depuis leur découverte en 2005 par l'équipe d'Helen Hobbs au Texas, de nombreuses mutations LOF de *PCSK9* ont été identifiées [123]. Bien que la principale cause de la réduction d'activité de PCSK9 soit une diminution de sa sécrétion, les

mutations LOF agissent via différents mécanismes. Une différence notable entre les mutations GOF et LOF est que la majorité des LOF perturbent les processus précoces de la maturation de PCSK9.

Les mutations présentes dans le pro-domaine de PCSK9 altèrent les modifications post-traductionnelles. C'est le cas de la mutation R46L, même si le mécanisme précis qui conduit à la réduction de PCSK9 n'est pas entièrement connu, ce variant est associé à une réduction de la phosphorylation qui peut causer une augmentation de la dégradation protéolytique de PCSK9 [144]. De plus, cette mutation peut altérer l'interaction entre PCSK9 et le LDLR car la protéine mutée présente une diminution de son affinité pour le LDLR d'environ 50% [128]. Les autres mutations situées dans le pro-domaine de PCSK9 affectent le processus de clivage auto-catalytique. En effet, le mutant R94del altère la structure d'une hélice alpha du pro-domaine entraînant une absence de clivage de la proPCSK9 prévenant sa maturation et sa sécrétion [145]. De même, la mutation G106R abolit le clivage auto-catalytique de PCSK9 induisant une incapacité de la protéine à sortir du RE [135][136]. Le même phénomène a été identifié chez un individu présentant deux mutations de PCSK9, R104C/V114A. Même si l'impact de ces mutations n'a pas été étudié individuellement, elles agissent *in vitro* de manière dominante négative et altèrent fortement l'activité auto-catalytique et causent l'incapacité de PCSK9 à sortir du RE [146].

Une autre catégorie de mutations, souvent des mutations non-sens dans le pro-domaine, empêchent la production l'absence d'ARNm (ARN messenger) de PCSK9. C'est le cas de la mutation Y142X identifiée dans le premier papier de 2005 décrivant les effets des mutations LOF de PCSK9 sur la cholestérolémie [123].

Concernant les mutations LOF du domaine catalytique, plusieurs mécanismes semblent altérer la fonction de PCSK9. Par exemple, le mutant N157K altère un

domaine avec une hélice alpha important dans la liaison au LDLR [147]. cette altération cause une diminution de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR entraînant une augmentation de la présence du LDLR à la surface cellulaire et de l'internalisation du LDL-C [147]. Les autres mutations du domaine catalytique induisent une incapacité à sécréter PCSK9. C'est le cas de la mutation G236S qui altère la conformation de la protéine et qui, malgré un clivage auto-catalytique normal, est incapable de quitter le RE [141]. De la même manière, les mutants L253F et N354I sont incapables de sortir du RE mais cette fois à cause d'une réduction de l'activité auto-catalytique [141][145].

Tout comme pour les mutations GOF, la partie charnière entre le domaine catalytique et la partie C-terminale de PCSK9 présente des mutations LOF. La mutation R434W altère la sécrétion de PCSK9 en diminuant l'auto-clivage de la proPCSK9 et entraînant une mauvaise conformation dans le RE [148].

La partie C-terminale comprend 3 mutations validées. Les deux premières S462P et C679X retiennent PCSK9 dans le RE à cause d'une mauvaise conformation de la protéine [136][92][93]. La mutation A443T possède un mécanisme propre, étant donné que la thréonine introduit un nouveau site de O-glycosylation favorisant le clivage de la protéine par la furine [140].

1.4) Régulation de PCSK9

1.4.a) Régulation transcriptionnelle

PCSK9 est fortement exprimée dans le foie et, dans une moindre mesure, dans l'intestin, les reins et le cerveau [120]. Au niveau transcriptionnel, *PCSK9* a été identifié comme une cible des protéines SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) [149][150]. Ces facteurs de transcription régulent les gènes du métabolisme

du cholestérol (SREBP2) et de la lipogenèse hépatique (SREBP1c) [151]. Le promoteur proximal de *PCSK9* contient un domaine SRE (Sterol Regulatory Element) qui permet aux protéines SREBP de se fixer et d'induire l'expression de *PCSK9* [149]. Les facteurs SREBP permettent de multiplier les stimuli capables d'induire l'expression de *PCSK9* [150]. Par exemple, SREBP2 est activé lorsque les niveaux de cholestérol intracellulaires, notamment au niveau du RE, sont faibles [152]. En effet, lorsque les niveaux de cholestérol dans le RE sont faibles, le complexe SREBP2-SCAP (SREBP Cleavage Activating Protein) n'est pas retenu et est transporté dans l'appareil de Golgi via SEC24 et le complexe COPII. Une fois dans l'appareil de Golgi, deux sérine protéases, S1P et S2P, clivent la liaison de SREBP2 et SCAP libérant ainsi la forme active du facteur de transcription qui exercera ses effets sur ses gènes cibles dans le noyau. A l'inverse, lorsque les niveaux de cholestérol sont élevés dans le RE, le complexe SREBP2-SCAP est retenu, d'une part par la liaison de SCAP avec le cholestérol mais aussi par les protéines INSIG1/2 (Insulin Induced gene) [153].

Les statines, comme décrit dans le paragraphe 6.1 du chapitre 1, sont des inhibiteurs de l'HMGCoAR et de la synthèse endogène de cholestérol. La baisse du contenu intracellulaire en cholestérol entraîne une activation de SREBP2 et de ses gènes cibles, *PCSK9* et *LDLR*. En effet, plusieurs travaux ont montré *in vitro* et *in vivo* que les statines induisent l'expression de *PCSK9* de manière SREBP2-dépendante [154].

L'expression de *PCSK9* est, aussi, régulée par le statut nutritionnel [155]. L'expression de *PCSK9* est réduite pendant un jeûne et augmente suivant l'état de re-nutrition chez les modèles murins [155]. Cette régulation est médiée par la liaison de SREBP1c sur le site SRE du promoteur de *PCSK9* comme l'indique une expérience

de mutation de SRE qui abolit l'interaction entre SREBP1c et le promoteur de *PCSK9* réduisant ainsi l'expression de *PCSK9* [155].

L'induction de l'expression de *PCSK9* par la Berberine, un alcaloïde végétal, a permis de mettre en évidence un autre site de liaison, HNF1 (Hepatocyte Nuclear Factor 1). Ce site permet la liaison de HNF1 α sur le promoteur de *PCSK9*, de plus, le site HNF1 semble fonctionner en coopération avec la séquence SRE car la mutation du site HNF1 réduit la sensibilité du promoteur aux stérols et atténue ainsi l'effet activateur de SREBP2 pour activer le promoteur de *PCSK9* [156].

Pcsk9 est aussi régulé par d'autres facteurs de transcription comme PPAR α qui réduit l'expression de Pcsk9 [157]. A l'inverse, PPAR γ augmente l'expression de Pcsk9 dans les hépatocytes [158]. De plus, FXR (Farnesoid X Receptor) activé par les acides biliaires réduit l'expression de Pcsk9 [159], lorsque LXR (Liver X Receptor) activé, lui, par les oxystérols augmente l'expression de Pcsk9 [155]. HINFP (Histone Nuclear Factor P) est un élément capable d'induire l'expression de Pcsk9 [160], tout comme la résistine, une adipokine, augmente l'expression de Pcsk9 [161]. Enfin, SIRT1/6 (Sirtuin), des histones déacétylases, réduisent l'expression de Pcsk9 [162].

1.4.b) Modification post-traductionnelle

Le fonctionnement de *PCSK9* peut également être affecté par une série de modifications post-traductionnelles lors de sa maturation (Figure 13). La plus remarquable se déroule au niveau du RE où *PCSK9* exécute un clivage auto-catalytique de son pro-domaine. Toujours dans le RE, *PCSK9* est N-glycosylée au niveau de l'asparagine 533 [120]. L'étude du mutant N533A qui empêche la N-glycosylation de *PCSK9* ou l'inhibition de la N-glycosylation par traitement à la tunicamycine n'affecte pas la maturation ni la sécrétion de *PCSK9* [120].

En 2013, l'étude de Chen et al. chez les souris déficientes en SEC24A (Sec24a^{-/-}), une protéine du complexe COPII (Coat Protein Complex II) importante dans l'assemblage des vésicules de transport entre le RE et l'appareil de Golgi, a montré que la sécrétion de PCSK9 est réduite de 55% [163]. Cette réduction de sécrétion est due à une accumulation de PCSK9 dans le RE, montrant ainsi clairement que SEC24A est cruciale dans le transport de PCSK9 entre le RE et l'appareil de Golgi [163].

Une fois dans l'appareil de Golgi, PCSK9 peut être phosphorylée. En effet, l'étude de 2008 de Dewpura et al. montre que PCSK9 est phosphorylée sur la sérine en position 47 et met en évidence un second site majeur de phosphorylation au niveau de la sérine 688 [144]. La phosphorylation sur la sérine-688 a lieu très tardivement voire juste avant la sécrétion de PCSK9 étant donné que la forme phosphorylée n'est pas détectée au niveau intracellulaire [144]. Cette étude montre également que la phosphorylation sur la sérine 47 protège PCSK9 de la protéolyse [144]. C'est en 2015 que les travaux de Tagliabracci caractérisent la kinase responsable de la phosphorylation de PCSK9, FAM20C [164]. Une étude récente de l'équipe de Nabil Seidah confirme les 2 sites de phosphorylation de PCSK9 sur la sérine 47 et 688 et révèle deux autres sites de phosphorylation sur les résidus sérines 666 et 668. De plus, les expériences de mutagenèse dirigée permettant de générer des mutants phosphoneutres montrent que la réduction de la phosphorylation de PCSK9 réduit sa capacité à inhiber le LDLR. A l'inverse, les mutants phosphomimétiques restaurent l'inhibition du LDLR par PCSK9 [165].

L'équipe de Nabil Seidah a mis en évidence en 2006 l'existence de 2 sites de sulfatation situés dans le pro-domaine ou dans le domaine catalytique de PCSK9 [140]. Le premier se trouve sur la tyrosine 38, le second n'est toujours pas identifié précisément. Le traitement au chlorate ou l'utilisation de mutant Y38F (sulfoneutre) et

Y38E (sulfomimétique) n'affecte pas respectivement, la sécrétion ou l'affinité pour le LDLR *in vitro* [140].

La dernière modification que peut subir PCSK9 avant sa sécrétion est médiée par deux autres membres de la famille des protéines convertases, la furine (PCSK3) et PC5/6A [140]. L'équipe de Nabil Seidah a révélé que ces deux protéines convertases sont capables de cliver PCSK9 au niveau de l'arginine 218 [140]. La délétion hépatique de la furine diminue la présence de la forme clivée de PCSK9 ainsi que la présence du LDLR dans le foie de souris. De plus, les auteurs montrent que seule la forme entière de la furine qui reste fixée à la membrane, et non la forme soluble, peut cliver PCSK9 [166].

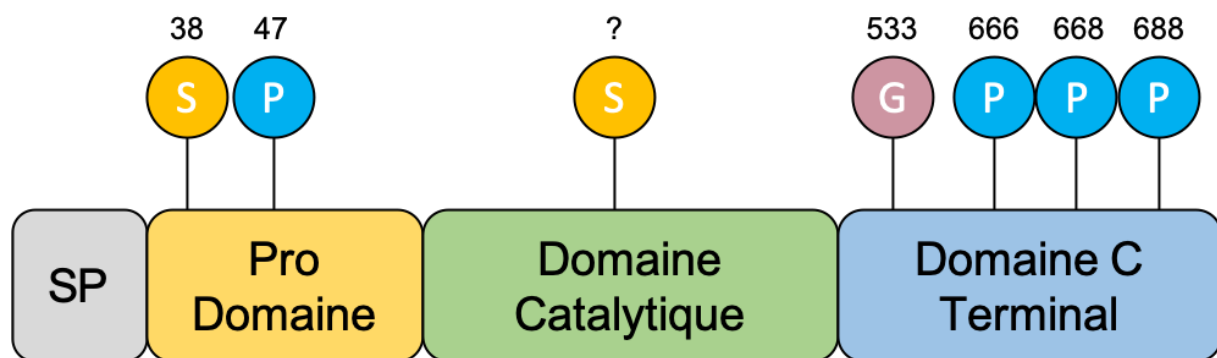


Figure 13 : Schéma des modifications post-traductionnelles de PCSK9

1.5) Autres cibles de PCSK9

Au fur et à mesure de la caractérisation des mécanismes d'action de PCSK9, les travaux ont suggéré que PCSK9 pouvait agir sur d'autres cibles moléculaires que le LDLR. En effet, PCSK9 peut interagir avec le VLDLR (Very Low Density Lipoprotein Receptor) et l'APOER2 (Apoprotein E Receptor 2). C'est le travail de l'équipe de Nabil Seidah en 2008 qui a montré *in vitro* que la co-expression, dans des cellules HEK293, de PCSK9 avec le VLDLR ou APOER2 réduit les niveaux protéiques des deux

récepteurs [167]. Ces auteurs ont également montré que l'ajout de PCSK9 extracellulaire dans le milieu de culture de fibroblastes murins diminue les contenus protéiques des récepteurs VLDLR et APOER2 [167].

En plus de ces deux récepteurs, PCSK9 peut interagir avec LRP1 (LDLR-related Protein 1). En effet, la diminution de l'expression de PCSK9 par shRNA dans une lignée d'hépatocytes humains : les cellules HepG2, montre une augmentation de l'expression du LDLR mais aussi de LRP1 [168].

En plus de ces cibles, PCSK9 apparaît comme pouvant réguler CD36. Ce récepteur permet l'absorption des acides gras libres au niveau intestinal et du tissu adipeux [169]. Une dernière étude a montré que PCSK9 dégrade le récepteur du virus de l'hépatite C, CD81, à la surface des hépatocytes [170].

2) Développement d'inhibiteurs anti-PCSK9

1) *Anticorps anti-PCSK9*

La recherche sur PCSK9 a conduit au développement d'une nouvelle classe de médicaments extrêmement puissants pour abaisser le cholestérol. Ainsi en 2015, soit douze années après l'identification de PCSK9, deux anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 : l'alirocumab (Praluent, Régénéron) et l'évolocumab (Repatha, Amgen) ont été approuvés par les hautes autorités de santé en Europe et aux États-Unis pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Les deux médicaments sont des anticorps entièrement humanisés administrés en sous cutané. Les deux essais cliniques ODYSSEY Outcomes pour l'alirocumab et l'étude FOURIER (Further cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in subjects with Elevated

Risk) pour l'évolocumab ont permis de mettre en évidence une réduction importante de la cholestérolémie en complément des statines et une protection supplémentaire vis-à-vis des MCV (Table V).

Inhibiteur de PCSK9	Nom de l'essai clinique	Nombre de patients	Niveau de base LDL-C (mg/dL)	Dose d'inhibiteur de PCSK9	Réduction moyenne du LDL-C plasmatique absolue (mg/dL)	Suivi moyen des patients
Evolocumab	FOURIER	27,564	92	140mg/2 semaines 420mg/4 semaines	56	2,2 ans
Alirocumab	ODYSSEY Outcomes	18,924	87	75 ou 150mg/2 semaines	37-48	2,8 ans

Tableau V : Essais cliniques et effets des anticorps anti-PCSK9

2) siRNA PCSK9

Une seconde stratégie d'inhibition est apparue plus récemment, l'Inclisiran est un siRNA (small interference ARN) qui va inhiber l'expression de PCSK9 dans les cellules ciblées. Les différences avec les anticorps sont d'une part la fréquence d'injection qui se fait 2 fois par an pour l'inclisiran par rapport à une injection toutes les 2 à 4 semaines pour les anticorps anti-PCSK9. Et d'autre part, la phase I de l'essai ORION-1 a montré que l'inclisiran agit exclusivement au niveau du foie. La phase II avec notamment l'essai clinique ORION-7 chez les patients avec une dysfonction rénale montre que l'inclisiran garde une efficacité prolongée sans altérer davantage la fonction rénale [171]. Les études, très récentes, de phase III (ORION-10 et ORION-11) montrent une inhibition importante et prolongée de PCSK9 ainsi qu'une baisse importante du niveau plasmatique de LDL-C. Seul un effet indésirable réversible au

site d'injection est rapporté à l'issu de ces deux essais cliniques de phase III [172]. Au-delà de l'effet sur le cholestérol, d'autres essais cliniques utilisant des siRNA comme thérapies ont rapporté des effets secondaires sur l'immunité avec un développement immunitaire contre le médicament, notamment représenté par une stimulation des TLR (Toll Like Receptor) entraînant une production de cytokines pro-inflammatoires [173][174]. Cependant, une étude de 2020 s'étant particulièrement intéressée à cet aspect a montré que l'inclisiran n'a pas d'effet sur le nombre de leukocytes circulants ni sur le profil sanguin de l'IL-6 et du TNF- α (Tumor Necrosis Factor) [175].

Cette stratégie thérapeutique contre PCSK9 semble donc être efficace pour réduire la cholestérolémie sans effet secondaire connu à ce jour. Du fait que le coût du traitement par les anticorps anti-PCSK9 est extrêmement élevé - donc limitant, elle pourrait permettre de traiter plus de patients [176].

III) Action extra-hépatique de PCSK9 et au-delà du métabolisme du cholestérol

Le développement des souris présentant une déficience en PCSK9 exclusivement dans le foie (*L-Pcsk9^{-/-}*) par l'équipe de Nabil Seidah en 2008 a permis de mettre en évidence le rôle extra-hépatique de cette enzyme [177]. En effet, les souris *L-Pcsk9^{-/-}* se caractérisent par une hypocholestérolémie moins marquée que les souris KO (délétion totale de PCSK9). Les souris *L-Pcsk9^{-/-}* montrent une réduction de 27% de leur cholestérolémie alors que les souris KO ont une réduction de 42% de leur cholestérolémie [177]. Cette différence de réduction de la cholestérolémie suggère un rôle extra-hépatique de PCSK9.

1) Action intestinale

L'intestin grêle est un organe clé dans le métabolisme des lipides. Il joue un rôle fondamental dans l'absorption des lipides alimentaires et biliaires, leur « ré-empaquetage » sous forme de chylomicrons structurés majoritairement avec de l'apolipoprotéine B48 (APOB48) et leur sécrétion dans le canal lymphatique mésentérique. Cette production de chylomicrons va augmenter le niveau de triglycérides circulant après un repas ; ce mécanisme contribue au phénomène de lipémie postprandiale. L'intestin est aussi important dans le processus de transport inverse du cholestérol. En effet, L'intestin est le second organe après le foie à contribuer significativement à la production et à la sécrétion d'apolipoprotéine AI (ApoAI) qui représente la protéine structurale majoritaire des HDL. Les travaux de Liam Brunham ont permis d'estimer que l'intestin contribue à hauteur de 20 à 30% des précurseurs d'HDL [178]. La voie ultime du transport inverse du cholestérol étant l'élimination de l'organisme du cholestérol sanguin par voie hépato-biliaire, il a été suggéré que l'inhibition de l'absorption intestinale de cholestérol stimulerait le transport inverse du cholestérol en limitant sa réabsorption intestinale [179]. Enfin, en 2007, le groupe de A.K Groen a montré que l'intestin est capable d'excréter du cholestérol sanguin par une voie appelée excrétion transintestinale du cholestérol (ou TICE) [180]. Plusieurs travaux ont suggéré que le TICE contribuerait significativement à la voie inverse du cholestérol [181].

1.1) Absorption intestinale du cholestérol

Le cholestérol présent dans la lumière intestinale est absorbé par les entérocytes. Comme décrit dans le paragraphe 2.2 du chapitre 2, ce phénomène actif est médié notamment par le transporteur NPC1L1. L'utilisation d'un modèle murin

déficient en NPC1L1 a permis de déterminer que cette protéine est responsable de l'absorption du cholestérol à hauteur de 70% et les études utilisant l'ézétimibe chez l'Homme montrent que l'inhibition de NPC1L1 diminue la cholestérolémie de 20% [93].

Différentes équipes ont débattu sur le rôle de PCSK9 dans l'absorption intestinale du cholestérol. En 2013, Emile Levy et al. ont montré que l'ajout de PCSK9 recombinant dans le milieu de culture basolatéral d'une lignée entérocytaire humaine, les Caco-2, augmente l'absorption du cholestérol en augmentant l'expression de plusieurs transporteurs, NPC1L1, SRBI et CD36, à la surface apicale de ces cellules [182]. A l'inverse, notre équipe n'a pas observé de différence d'absorption intestinale du cholestérol chez les souris *Pcsk9*^{-/-} comparativement aux souris sauvages [183]. En accord avec nos données, deux études mesurant les rapports campestérol/cholestérol (marqueur de l'absorption) ont montré que l'évolocumab chez l'Homme n'influence pas l'absorption intestinale du cholestérol [184][185].

1.2) Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)

Jusqu'à très récemment, il était admis que la voie hépato-biliaire était la seule voie d'élimination du cholestérol plasmatique, en dépit de plusieurs arguments indirects datant du milieu du 20^e siècle qui suggéraient l'existence d'une voie intestinale complémentaire [118][186]. Ce n'est qu'en 2007, qu'une équipe hollandaise a mis en évidence, chez la souris, une nouvelle voie d'excrétion du cholestérol sanguin directement par la paroi intestinale qu'ils ont appelée TICE. Leurs travaux initiaux démontraient que le TICE est la voie majeure d'élimination du cholestérol plasmatique chez la souris (33% à l'état basal) et qu'elle est fortement inductible par des agents pharmacologiques et/ou nutritionnels [119]. Notamment, le TICE est inductible par des agonistes de LXR et contribue de manière importante à leurs effets sur la voie inverse

du cholestérol et à l'excrétion du cholestérol dans les fèces [187]. En 2013, notre équipe a mis en évidence que le HDL-C et LDL-C peuvent être excrétés via le TICE chez la souris. De plus, nous avons été les premiers à démontrer *ex vivo* l'existence du TICE chez l'Homme par l'utilisation de biopsies intestinales en chambre de Ussing [183]. En 2016, l'équipe de A.K Groen a confirmé cette donnée *in vivo* via la méthode des traceurs stables et montré que le TICE contribue à l'excrétion fécale du cholestérol à hauteur de 35% chez l'Homme et qu'il est fortement induit lorsque les patients sont traités à l'ézétimibe [188]. Notre équipe a de son côté confirmé l'existence d'un efflux intestinal de cholestérol marqué au deutérium 7 (D7-cholestérol) chez des patients présentant une dérivation externe des voies biliaires [189]. Les mécanismes moléculaires restent à ce jour peu explorés. Au niveau apical, trois transporteurs sont impliqués fonctionnellement dans le TICE : NPC1L1 [188], ABCB1 (ATP Binding Cassette sub-family B 1) [183] et ABCG5/G8 [187]. Au niveau basolatéral, notre équipe a apporté la preuve de l'implication du LDLR dans le TICE. La modulation de son expression par les statines et PCSK9 régule le TICE chez la souris [183]. Une donnée restait incertaine lors de mon arrivée en thèse, la contribution relative de la forme intestinale versus hépatique (sanguine) de PCSK9.

2) Action sur les triglycérides

Les effets de PCSK9 sur les triglycérides ont été largement discutés dans une revue récente de l'équipe [190]. Pour résumer, les premières observations cliniques ont montré que les niveaux circulants de PCSK9 sont positivement corrélés à la concentration de triglycérides plasmatiques à jeun chez les adolescents et les adultes [191][192]. De plus, une association a été mise en évidence entre la triglycéridémie à jeun et PCSK9 dans différentes pathologies comme le diabète de type 1, le diabète

de type 2, les maladies chroniques du rein, le VIH et l'hyperlipidémie de type III [193][194][195][196][197]. La régulation du métabolisme des triglycérides peut s'effectuer soit par modulation de la production des TRL ou par l'élimination de ces particules.

Les mutations de PCSK9 permettent d'apporter un début de réponse quant au mécanisme pouvant expliquer la relation entre PCSK9 et les triglycérides. En effet, la mutation GOF S127R, est décrite comme associée à une augmentation de la sécrétion d'ApoB100 conduisant à une surproduction de VLDL, IDL et LDL [198]. De plus, les patients présentant la mutation GOF D374Y ont une élévation de leur triglycéridémie [199]. Ce phénomène peut être expliqué par une augmentation de la sécrétion de l'ApoB100 [200][199]. Concernant les mutations LOF, les mutations R46L [201], L10ins/A53V et I474V [202][203] n'influencent pas la triglycéridémie. A l'inverse, les mutations non-sens Y142X et C679X sont associées à une réduction de la triglycéridémie [204]. Enfin, une étude cinétique chez deux patients a montré que le variant R104C/V114A présente une augmentation du catabolisme des VLDL et IDL [146]. Dans l'ensemble, l'impact des mutations de PCSK9 sur le métabolisme des TRL est modeste et hétérogène par rapport à l'impact sur le métabolisme du LDL-C. Les études devraient clarifier les mécanismes moléculaires par lesquels les mutations de PCSK9 régulent le métabolisme des TRL et dans quelle mesure une modification de l'abondance des LDLR explique les effets observés.

Les modèles *in vitro* et *in vivo* n'ont pas révélé de mécanisme clair concernant l'impact de PCSK9 sur le métabolisme des TG. Les premières études n'ont pas révélé un effet de PCSK9 sur la triglycéridémie. Comme l'atteste les résultats d'une surexpression de PCSK9 chez des souris sauvages ou *Ldlr*^{-/-} qui n'affecte pas les niveaux circulants de TG. Ni même, encore, la surexpression de PCSK9 dans des

cellules Huh7 ou dans des hépatocytes primaires qui n'impacte pas la sécrétion d'ApoB [205][137][122][206]. A l'inverse, des hépatocytes primaires issus de souris *Pcsk9*^{-/-} mis en culture montrent une réduction de la sécrétion d'ApoB100 comparativement aux hépatocytes de souris sauvages [207]. De plus, une autre étude a montré que la surexpression de la forme humaine de PCSK9 (hPCSK9) chez les souris entraîne une augmentation de la sécrétion d'ApoB100 dans les cultures d'hépatocytes primaires [208]. Une fois encore, les études doivent se concentrer afin de clarifier par quels mécanismes PCSK9 pourrait avoir un impact sur les TG.

Les études interventionnelles utilisant les anticorps anti-PCSK9 (voir paragraphe 2.1 du chapitre 2) ont également mis en avant une diminution de 16% de la triglycéridémie des patients traités par Evolocumab [209] et 17% pour ceux traités par Alirocumab [210]. De plus, une étude cinétique réalisée chez des patients normolipidiques à jeun a montré que l'Evolocumab réduit le nombre de VLDL-ApoB et IDL-ApoB en augmentant leur catabolisme, suggérant une action LDLR dépendante. A l'inverse, l'Evolocumab n'affecte pas la sécrétion de VLDL-ApoB, IDL-ApoB ou LDL-ApoB [185]. Pour l'Alirocumab, une étude cinétique n'a pas montré d'impact sur le nombre de VLDL-ApoB ni sur le catabolisme de ces particules mais a montré une augmentation du catabolisme des IDL-ApoB [211]. Une étude, visant à montrer l'efficacité de l'Alirocumab par rapport aux autres traitements (ézétimibe, statine) chez des patients atteints de diabète de type 2 sur les triglycérides et le cholestérol non HDL (ODYSSEY DM-DYSLIPIDEMIA), a montré que l'Alirocumab réduit de 32,5% les niveaux de cholestérol non HDL mais n'affecte pas la triglycéridémie des patients [212].

Une autre stratégie thérapeutique afin d'inhiber PCSK9 est l'utilisation d'un siRNA contre PCSK9 (voir paragraphe 2.2 du chapitre 2). L'inclisiran à une dose

supérieure à 300 mg réduit les niveaux de triglycérides d'environ 13%; ce qui est comparable à la réduction observée avec les anticorps anti PCSK9 [213]. Il serait intéressant que des études futures s'intéressent à l'impact de l'inclisiran sur le métabolisme des TRL chez des patients atteints de diabète de type 2 en comparaison au anticorps anti PCSK9.

Dans l'ensemble les thérapies inhibant PCSK9 n'ont eu, pour le moment, qu'un impact modeste sur la triglycéridémie. Le mécanisme d'action, au moins pour les anticorps anti-PCSK9, semble indiquer que l'effet de l'inhibition de PCSK9 est LDLR dépendante.

3) Action sur la Lipémie postprandiale

La lipémie postprandiale (LPP) est un phénomène naturel qui se caractérise par une élévation des niveaux circulants de TG après un repas, essentiellement sous forme de chylomicrons (CM). Comme décrit dans le paragraphe 4.5.a du chapitre 1 ce phénomène peut devenir un risque indépendant des MCV. En effet, chez les patients atteint d'un diabète de type 2, la production des CM est accrue et corrèle avec les niveaux d'insuline [37]. La mise en évidence de l'atténuation de la LPP chez les patients traités par statine pourrait expliquer, en partie, les effets cardioprotecteurs des statines [58].

En 2009, nous avons démontré que les souris *Pcsk9*^{-/-} présentent une réduction de leur LPP [214]. Lorsque nous nous sommes intéressés aux mécanismes pouvant expliquer cette réduction, nous avons observé que l'intestin des souris *Pcsk9*^{-/-} secrète moins d'ApoB mais autant de TG que les souris sauvages entraînant une augmentation de la taille des CM. Cette augmentation de taille est, semble-t-il, associée à une augmentation de la clairance des CM [214]. Nous avons également

montré que le foie des souris *Pcsk9*^{-/-} catabolise plus rapidement les CM que celui des souris sauvages.

Chez l'Homme, une étude s'est intéressée à l'impact des mutations LOF de PCSK9 sur la LPP [215]. Les auteurs ont d'abord montré que les variants LOF de PCSK9 diminuent la présence des chylomicrons et VLDL ainsi que leurs produits rémanents après l'ingestion d'une boisson grasse. Cette réduction des TRL est associée à une diminution de la sécrétion d'ApoB48 dans le sang des patients PCSK9 LOF. Ces observations mettent en avant un rôle intestinal de PCSK9 [215].

Très récemment plusieurs études cliniques ont testé l'effet de l'inhibition de PCSK9 sur la LPP. Chez les sujets sains non diabétiques, l'inhibition de PCSK9 par des anticorps monoclonaux n'a pas d'effet notable sur la LPP [216][217]. En revanche, chez les patients diabétiques, deux études cliniques ont mis en lumière une réduction de l'hyperlipémie postprandiale observée communément chez ces patients (voir paragraphe 4.5.a) lorsqu'ils sont traités par anticorps anti-PCSK9 [218][219].

De ces études expérimentales et cliniques, nous pouvons conclure que PCSK9 joue un rôle dans les mécanismes de régulation de la LPP. Aucune étude n'a permis d'explorer l'importance fonctionnelle de la forme intracellulaire intestinale de PCSK9 par rapport à la forme sanguine dans la régulation de la LPP.

4) Autres actions extra-hépatiques

PCSK9 est exprimée dans de nombreux autres organes que le foie ou l'intestin, notamment dans le pancréas, les reins, les vaisseaux et les poumons [120].

4.1) Rôle de PCSK9 dans le pancréas endocrine

Le pancréas endocrine joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Les cellules bêta du pancréas expriment le LDLR et des données montrent que leur fonction et/ou survie est affectée par une exposition importante aux LDL et VLDL [220][221]. Du fait du rôle régulateur de PCSK9 sur le LDLR, une inquiétude est rapidement née sur l'impact que pourrait avoir la déficience ou l'inhibition de PCSK9 sur la fonction bêta pancréatique et sur l'homéostasie glucidique. Cette crainte a été renforcée par la démonstration du risque légèrement accru de diabète chez des patients traités aux statines [222][223][224][225]. De même, le risque de développement du diabète est plus important chez les patients présentant une mutation LOF de l'HMGCOA reductase [226]. Enfin, les patients présentant une déficience sévère en LDLR ont moins de risque de développer un diabète que les sujets contrôles [227]. Ensemble, ces données suggèrent que la déficience ou l'inhibition de PCSK9 qui tend à augmenter la présence du LDLR à la surface des cellules pourrait être délétère.

Cependant la première étude murine n'a pas montré d'altération du métabolisme du glucose chez les souris *Pcsk9*^{-/-} [228]. En effet, dans l'étude de 2009, notre équipe a mis en évidence que PCSK9 est capable d'inhiber le LDLR présent à la surface des cellules β du pancréas, et donc, que l'inhibition de PCSK9 augmente la présence du LDLR dans ces cellules. Malgré cette absence de régulation du LDLR, les cellules β n'ont pas une augmentation de leur contenu intracellulaire de cholestérol. Enfin, les souris *Pcsk9*^{-/-} présentent la même intolérance au glucose et la même sécrétion d'insuline après un traitement à la streptozotocine, une molécule induisant l'apoptose des cellules β du pancréas et induisant une insulinopénie [228].

A l'inverse, les données plus récentes étayent l'hypothèse d'un rôle de la déficience en PCSK9 sur l'altération du métabolisme du glucose. En effet, ces études montrent que les souris *Pcsk9*^{-/-} présentent une hyperglycémie, une tolérance au glucose altérée et une réduction de la sécrétion d'insuline [229][230]. L'étude la plus récente de l'équipe italienne de Norata a montré que les souris *Pcsk9*^{-/-} développent une intolérance au glucose aussi bien sous régime standard que sous régime enrichi en gras. Cette intolérance au glucose n'est pas associée à une insulino-résistance, comme illustré par la réponse similaire des souris contrôles et *Pcsk9*^{-/-} à une injection intrapéritonéale d'insuline. De plus, la mesure de la sécrétion d'insuline montre que les souris *Pcsk9*^{-/-} sécrètent moins d'insuline que les souris sauvages, et que cette réduction de la sécrétion d'insuline est associée à une morphologie irrégulière des îlots β du pancréas. Enfin, les auteurs ont mis en évidence que les souris L-*Pcsk9*^{-/-} ne présentent pas ces altérations de la sécrétion d'insuline, ni d'intolérance au glucose et que les niveaux de LDLR pancréatiques sont identiques chez les souris L-*Pcsk9*^{-/-} et les souris contrôles, suggérant que la PCSK9 circulante n'influence pas la quantité de LDLR au niveau pancréatique [230]. Ces dernières données pré-cliniques indiquent que c'est la forme intracellulaire de PCSK9 présente au sein de l'îlot de Langerhans qui exercerait son action anti-diabétique ; ce qui est rassurant quant à l'usage des inhibiteurs anti-PCSK9 ciblant la forme circulante sanguine.

Chez l'homme, des études mendéliennes randomisées ont montré que les variants LOF de PCSK9 sont associés à une élévation du glucose à jeun et à une augmentation du risque de diabète [231][232][233]. Cependant, de manière rassurante les études de l'évaluation du sur-risque de l'apparition du diabète chez les patients traités par anticorps anti-PCSK9 n'ont révélé aucun effet néfaste. C'est le cas d'une étude regroupant les données des essais cliniques de phase 3 d'ODYSSEY qui n'a

pas montré d'augmentation de l'incidence du diabète sur 3448 patients traités par alirocumab sur une période de 6 à 18 mois [234]. De même, l'étude FOURIER n'a pas mis en évidence de risque accru du développement du diabète chez les patients traités par l'évolocumab et suivis durant environ 2 ans [235]. De plus, une étude de 2020 sur deux cohortes (IT-DIAB et ELSA-BRASIL) a montré que les niveaux plasmatiques de PCSK9 ne permettent pas de prédire le risque de développement de diabète de type 2 chez les patients pré-diabétiques [236].

4.2) Rôle de PCSK9 dans le rein

Un des rôles majeurs du rein est de maintenir la pression artérielle par réabsorption de certains solutés notamment du sodium (Na^+) maintenant ainsi la tension artérielle. L'hypertension est un facteur de risque majeur des MCV (voir paragraphe 1.4.3). Le canal ENaC (Epithelial Sodium channel) joue un rôle essentiel dans la réabsorption du Na^+ au niveau rénal et dans le contrôle de la tension artérielle [237]. Ce canal est connu pour être activé après son clivage par des sérines-protéases telles que la furine [238]. Une étude visant à déterminer si d'autres protéases sont capables de cliver ENaC a montré que PCSK9 possède cette capacité. A l'inverse des autres protéases, le clivage de ENaC par PCSK9 diminue sa présence à la membrane, notamment en augmentant sa dégradation et en altérant son trafic intracellulaire [239]. Notre équipe en 2015 a étudié l'impact de la déficience en PCSK9 dans plusieurs modèles murins d'hypertension artérielle. Nos données indiquent qu'*in vivo* chez la souris, la déficience en PCSK9 ne semble pas favoriser le développement ni l'aggravation de l'hypertension [240].

Une étude clinique a examiné l'association entre des variants communs et rares de PCSK9 et la pression artérielle dans une population d'Afro-Américains à haut risque

de MCV [241]. En utilisant les données génomiques du réseau HyperGEN (the Hypertension Genetic Epidemiology Network) et en tirant profit des GWAS (Genome-Wide Association Study), un effet minimal sur la pression sanguine diastolique (PSD) a été attribué à deux SNP (Single Nucleotide Polymorphism) communs, et un effet cumulatif significatif sur la PSD de tous les variants rares de PCSK9 a été identifié. De plus, dans cette étude, ces associations génétiques ont été testées dans la population appartenant à l'étude REGARDS (REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke), et une association cumulative avec la pression artérielle systolique a été trouvée, indiquant que des variants rares de PCSK9 peuvent jouer un rôle dans la régulation de la pression artérielle, peut-être en interférant avec la fonction ENaC.

Les données issues des essais cliniques d'ODYSSEY chez des patients avec une maladie chronique rénale modérée ne montrent pas d'altération de la fonction rénale lors du traitement à l'alirocumab [242]. Des données similaires ont été présentées dans l'étude FOURIER utilisant l'évolocumab [243]. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires chez les patients présentant une dysfonction rénale sévère.

4.3) Rôle de PCSK9 dans la plaque d'athérosclérose

Une étude pré-clinique de 2012 a analysé l'impact de la déficience ou de la sur-expression hépatique de PCSK9 sur l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} d'une part et *Ldlr*^{-/-} d'autre part, bien décrits comme modèles d'étude de l'athérosclérose [244]. Nabil Seidah et ses collaborateurs ont croisé les souris *Pcsk9*^{-/-} et transgénique pour *Pcsk9* (*Tg(Pcsk9)*^{+/-}) avec les souris *ApoE*^{-/-} et *Ldlr*^{-/-} afin d'obtenir des modèles doubles déficients *ApoE*^{-/-} *Pcsk9*^{-/-} ; *Ldlr*^{-/-} *Pcsk9*^{-/-} et des modèles transgéniques et déficients *ApoE*^{-/-} *Tg(Pcsk9)*^{+/-} ; *Ldlr*^{-/-} *Tg(Pcsk9)*^{+/-} [245]. Dans une première série

d'expériences, ils ont montré que la déficience en PCSK9 protège du développement de l'athérosclérose en diminuant l'accumulation de cholestérol dans l'aorte des souris nourries pendant 12 semaines avec un régime pro-athérogénique. A l'inverse, les souris *Tg(Pcsk9)^{+/-}* présentent une forte augmentation du cholestérol intra-plaque ainsi qu'un développement accru de la plaque d'athérome [245]. Ensuite, ils ont mis en évidence que chez les souris *ApoE^{-/-} Pcsk9^{-/-}*, l'absence de PCSK9 protège de l'accumulation du cholestérol dans l'aorte. A l'inverse, chez les souris *ApoE^{-/-} Tg(Pcsk9)^{+/-}*, la sur-expression de PCSK9 augmente aussi bien l'accumulation du cholestérol que la taille de la plaque d'athérome. Enfin, la déficience ou la surexpression de PCSK9 chez des souris *Ldlr^{-/-}* est sans effet sur le développement de la plaque d'athérome [245]. Ces derniers résultats démontrent que PCSK9 agit sur l'athérosclérose de manière LDLR-dépendante.

En 2012, l'équipe Italienne dirigée par A. Catapano a montré par immunohistochimie que PCSK9 est présente dans la plaque d'athérome de patients [246]. En utilisant des cultures primaires de cellules musculaires lisses d'aorte, ces auteurs ont mis en évidence une expression de PCSK9 comparable à celles des cellules hépatiques HepG2. En outre, ces cellules sont capables de sécréter localement PCSK9 susceptible de dégrader le LDLR au niveau des macrophages [246]. Plus récemment, une équipe a montré que PCSK9 a un effet local sur le développement de l'athérosclérose, via le recrutement de monocytes et l'aggravation de l'inflammation via les macrophages de façon LDLR-dépendante et indépendamment du niveau de cholestérol [247]. Une autre étude en 2018 a montré que l'inhibition de PCSK9 par siRNA dans des cultures de cellules dendritiques et de lymphocytes T provenant de plaques d'athérosclérose humaines empêche la

production d'IFN- γ et d'IL17 [248]. De plus, PCSK9 joue un rôle dans la maturation des cellules dendritiques intra-plaque de l'athérocclérose [249][250].

Ensemble, ces études montrent que PCSK9 est exprimée dans les cellules musculaires lisses et joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. PCSK9 accroît la présence de lipide au niveau de la plaque de manière LDLR-dépendante et augmente le recrutement et l'activation des cellules immunitaires de la plaque d'athérome. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mettre en lumière l'effet des inhibiteurs de PCSK9 sur la composition de la plaque.

5) Action de PCSK9 sur le développement

PCSK9 a tout d'abord été nommé NARC-1 (Neural Apoptosis-Regulated convertase 1); ce nom avait été choisi de par sa découverte et son expression très forte dans les cultures de cellules neuronales [120]. La surexpression de PCSK9, par transfection, est associée à une augmentation du recrutement des cellules progénitrices neurales indifférenciées [120]. Des observations supplémentaires ont montré que PCSK9 est présente dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et pourrait jouer un rôle dans la neurogénèse [251]. Deux paramètres importants suggèrent que le métabolisme de PCSK9 au niveau cérébral est régulé de manière indépendante par rapport au reste de l'organisme : d'une part, les concentrations de PCSK9 dans le LCR sont 200-300 plus faibles par rapport à celles mesurées dans le sang ; 2) contrairement aux concentrations sanguines, les concentrations de PCSK9 dans le LCR ne sont pas affectées par le rythme circadien [251]. Une étude sur le développement du système nerveux du zebrafish montre que PCSK9 est essentielle dans le processus de neurogénèse. En effet, dans ce modèle animal, l'inhibition de

l'expression de PCSK9 entraîne une désorganisation des neurones et une mort rapide (96h) après la fertilisation [252]. A l'inverse, l'invalidation totale de PCSK9 chez la souris ne semble altérer ni le développement ni la survie globale [177][154]. Chez l'Homme, la question reste posée. Plusieurs des mutations LOF identifiés sont relativement fréquentes à l'état hétérozygote (entre 1 et 5% pour certaines, voir paragraphe 1.3.b du chapitre 2) [123][204][145]. Les patients porteurs sont exposés tout au long de leur vie à un niveau faible de PCSK9 et de LDL-C mais ne semblent pas souffrir de dysfonction cognitive [253][254]. De manière curieuse à la vue de la prévalence des mutations LOF, seuls trois cas de patients porteurs de mutations LOF à l'état homozygote (ou hétérozygote composite) et présentant une absence de PCSK9 dans leur sang ont été décrits à l'heure actuelle [145][255][146]. Il est tentant de spéculer qu'à l'état homozygote, les mutations LOF pourraient altérer le développement et la viabilité des embryons. De manière intéressante, il a été montré que les niveaux circulants de PCSK9 sont plus faibles chez les rates « spina bifida » gestantes que chez les rates contrôles. De plus, les niveaux circulants de PCSK9 sont 0,73 fois plus faibles dans le sérum des femmes enceintes « spina bifida » [256]. Une inquiétude est née lors des premières phases cliniques sur l'efficacité et la sécurité des anticorps anti-PCSK9 (FOURIER et ODYSSEY). Les premiers résultats semblaient suggérer une légère augmentation des événements neurocognitifs dans les groupes traités par les inhibiteurs anti-PCSK9 [257][210]. Toutefois, une étude a été spécifiquement développée pour explorer ce point : l'étude EBBINGHAUS (Evaluating PCSK9 Binding Antibody Influence on Cognitive Health in High Cardiovascular Risk Subjects) dérivant de l'étude FOURIER pour dénombrer la survenue des événements neurocognitifs pendant 18 mois suite à l'injection de l'évolucumab. Il s'avère que les patients traités par l'évolucumab ne présentent pas

davantage de troubles neurocognitifs que les sujets contrôles [258]. Les mêmes résultats ont été reportés chez les patients traités à l'alirocumab pendant 2 ans [259].

Tous ces résultats tendent à montrer un rôle de PCSK9 dans le développement du système nerveux mais ce rôle est suffisamment localisé et ponctuel pour que les thérapies visant à inhiber PCSK9 ne déclenchent pas de dysfonctions neurocognitives.

6) Action de PCSK9 sur les canaux lymphatiques

Il a été montré que PCSK9 joue un rôle sur le maintien et le bon fonctionnement des canaux lymphatiques [260]. Les canaux lymphatiques sont cruciaux dans le phénomène de RCT. Notamment en permettant l'efflux des particules HDL de la périphérie vers le foie pour leur élimination par SRB1 (Scavenger Receptor B1) [261]. Il a été montré en 2009 que les souris hypercholestérolémiques *ApoE*^{-/-} présentent une dysfonction des canaux lymphatiques associée à un œdème et une accumulation des lipides [262]. En effet, il est suggéré que le HDL lors du RCT est drainé en premier lieu par les canaux lymphatiques [263]. En 2016, une étude a montré que les souris *Pcsk9*^{-/-} ont moins d'HDL dans leur lymphé que les souris contrôles, une réduction pouvant être due à un RCT plus efficace [260]. De plus, l'absence de PCSK9 améliore la fonction des vaisseaux lymphatiques, comme illustré par la migration accrue des cellules dendritiques ainsi qu'une coloration plus nette et continue des canaux lymphatiques par injection d'une solution de bleu Evans [260]. L'impact direct ou non de PCSK9 sur les canaux lymphatiques reste à approfondir.

IV) Relation entre lipides et système immunitaire

Il existe une relation étroite entre le système immunitaire et le développement des MCV. Le meilleur exemple de pathologie alliant ces deux composantes est, sans doute, l'athérosclérose. Un des éléments clefs dans le développement de cette pathologie est le RCT qui consiste au « retour » du cholestérol périphérique, notamment des macrophages, vers le foie via les HDL (Figure 14). Dans des conditions physiologiques, l'Apo-AI, qui est le principal composant protéique des HDL, est sécrétée par le foie et l'intestin, et est assemblée en une particule nommée pré- β HDL en raison de son interaction avec ABCA1 sur les hépatocytes et les entérocytes [264]. L'ABCA1 sur les macrophages favorise l'efflux de cholestérol et de phospholipides sur ces particules pré- β HDL relativement pauvres en lipides, initiant le processus de RCT. L'ABCG1 favorise un nouvel efflux de cholestérol sur les particules d'HDL. Le cholestérol libre dans les HDL est estérifié par l'enzyme lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), qui donne naissance aux esters de cholestérol. Le cholestérol libre et les esters de cholestérol dans les HDL peuvent être directement éliminés par le foie [265]. Le cholestérol capté par le foie lors du RCT peut être recyclé sous forme de VLDL, ou peut être excrété dans la bile via ABCG5 et ABCG8 [114]. Chez l'homme, la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) plasmatique sert de médiateur pour l'échange des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et des triglycérides des VLDL vers les HDL [266]. Une cascade lipolytique médiée par la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique provoque l'hydrolyse des triglycérides et entraîne la formation de particules LDL riches en cholestérol et en esters de cholestérol. Bien que le LDL soit en grande partie éliminé dans le foie, une fraction peut fournir du cholestérol aux tissus périphériques et une petite proportion est absorbée par la paroi artérielle, où elle est modifiée par oxydation ou agrégation, ce qui entraîne son absorption par les

macrophages. Le LDL modifié dans la paroi artérielle favorise la signalisation des TLR [267] au niveau des macrophages et est absorbé par ces derniers, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses, à la production de myéloperoxydase et à l'inflammation.

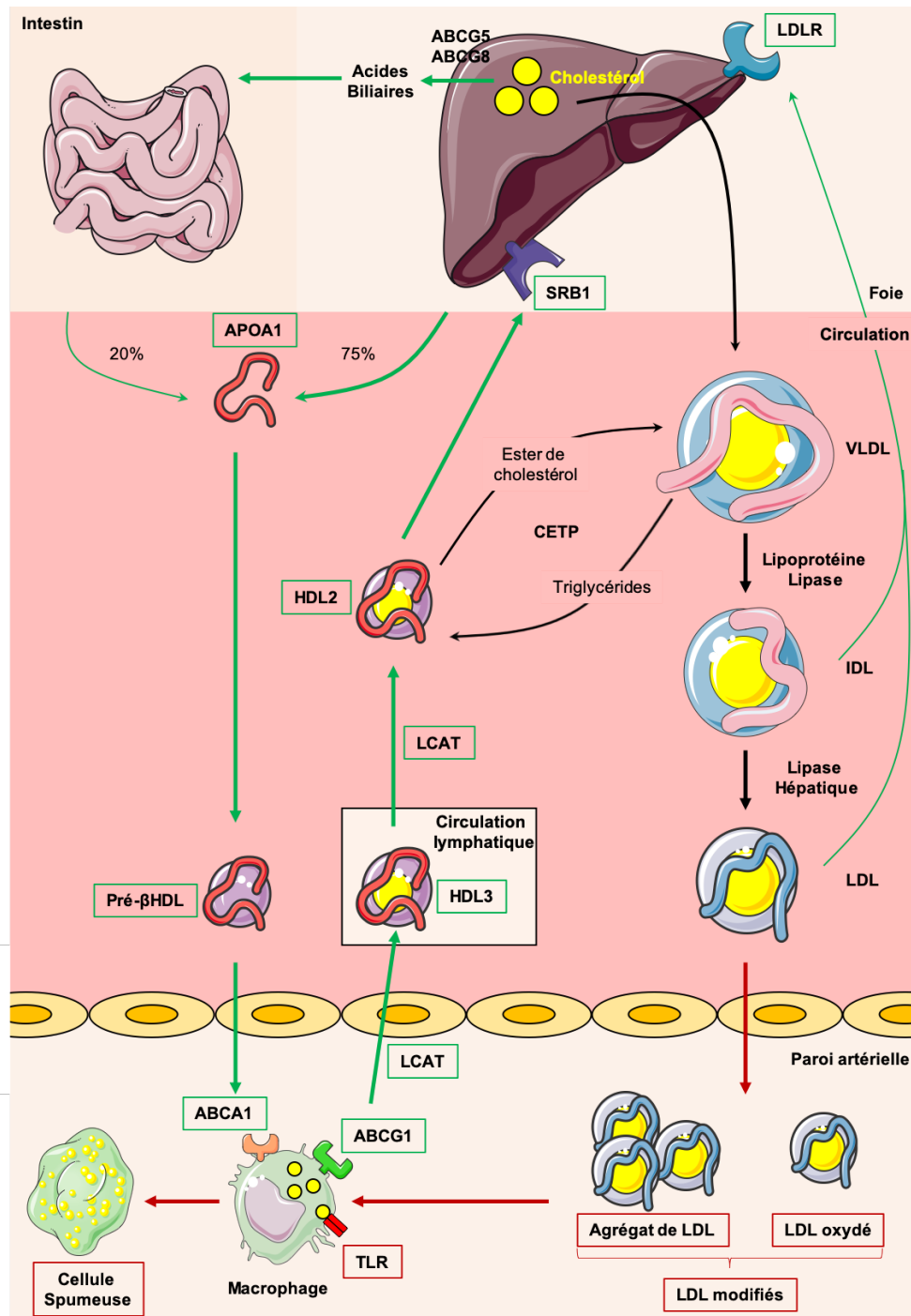


Figure 14 : Mécanisme du transport inverse du cholestérol et sa régulation par les réponses immunitaires innées (adapté de Tall et al. 2015)

L'intestin et le foie produisent l'Apo-AI, cette protéine sert de base à la formation des particules de pré-βHDL. Une fois dans la paroi artérielle les pré-βHDL vont capter le cholestérol des macrophages via le transporteur ABCA1. Cette étape permet la formation des HDL, ces HDL vont accepter, une fois de plus, le cholestérol des macrophages par le transporteur ABCG1. Ces particules d'HDL saturés de cholestérol vont circuler via la circulation lymphatique puis sanguine et retourner au foie. Le récepteur SRB1 va lier les HDL et transférer le cholestérol de ces lipoprotéines dans les hépatocytes. Dans la circulation sanguine, les HDL peuvent, sous l'effet de la CETP, transférer une partie de leur cholestérol vers les VLDL en échange de triglycérides. Les VLDL sous l'effet des différentes lipases seront petit à petit hydrolysés en LDL. Les LDL petites et denses vont pénétrées dans la paroi artérielle s'agglutiner en agrégat ou s'oxyder. Ces modifications vont augmenter leur affinité avec les macrophages et conduire à la formation de cellules spumeuses débordant de cholestérol.

En plus du rôle des macrophages et du transport inverse du cholestérol, des études ont montré que les mastocytes, d'autres cellules du système immunitaire, peuvent influencer le développement de MCV. Les premiers indices de la relation entre mastocytes et athérosclérose ont été rapportés en 2007 dans les études pré-cliniques murines [268][269]. En effet, l'utilisation d'un modèle de souris *Ldlr*^{-/-} couplées avec des souris déficientes en mastocytes *Kit*^{-/-} a révélé que l'absence de mastocytes réduit les niveaux de cholestérol et de triglycérides dans le sang et le foie [268]. A l'inverse, l'activation des mastocytes par le C48/80 augmente les niveaux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides [270]. De plus, la présence des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes T) dans la plaque d'athérome est réduite chez les souris dépourvues de mastocytes [268][271].

L'activation des mastocytes est un phénomène pouvant exacerber le développement des MCV. En effet, les mastocytes activés dégranulent, libérant l'histamine, la chymase, la tryptase et des cytokines pro-inflammatoires. L'activation des mastocytes peut se faire par différents stimuli parmi lesquels nous retrouvons le LDL via le TLR4 (Figure 15) [272][273]. De plus, chez les patients avec différents

degrés d'athérosclérose, les niveaux de tryptases plasmatiques sont corrélés à l'aggravation de la déstabilisation de la plaque et plus important encore, cette protéase est un facteur de risque indépendant des MCV [274][275][276]. L'IgE (Immunoglobuline E) est un autre activateur des mastocytes ; il a été montré que les niveaux d'IgE sont plus élevés dans le sang des patients avec une forte concentration de lipoprotéines non HDL. De plus, chez les patients qui présentent une maladie coronaire, les niveaux plasmatiques d'IgE sont plus élevés que chez les sujets sains. Enfin, les souris *ApoE^{-/-} Fcεr1a^{-/-}* (déficientes en récepteur FcεR) double KO ont une réduction de leur plaque d'athérome et de l'infiltrat cellulaire [277].

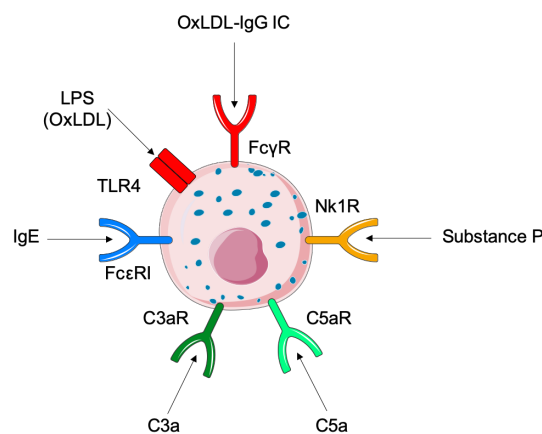


Figure 15 : Activation des mastocytes par les récepteurs (adapté de Shi et al. 2015)

D'un point de vue mécanistique, les mastocytes et leurs molécules pro-inflammatoires une fois sécrétées dans le liquide extracellulaire vont induire une série d'évènements favorisant l'apparition de cellules spumeuses (Figure 16). En effet, l'histamine sécrétée induit des espaces entre les cellules endothéliales, augmente localement la perméabilité aux particules de LDL et de HDL plasmatiques, augmentant ainsi leur passage dans l'espace sous-endothélial [278]. Certaines des particules de LDL affluents se lient à l'héparine en granules et sont protéolysées par la chymase. Les particules de LDL protéolysées deviennent instables et fusionnent en de plus

grosses gouttelettes de lipides dérivées des LDL à la surface du granule. Le granule, avec sa charge de gouttelettes lipidiques, est phagocyté par un macrophage pour finalement former une cellule spumeuse [279]. Certaines des particules sous-endothéliales pre β -HDL sont protéolysées par la chymase et la tryptase, et perdent ainsi leur capacité à interagir avec le transporteur ABCA1, médiateur de l'efflux de cholestérol, à la surface des macrophages [280]. Ensemble, la stimulation de l'absorption du cholestérol et l'inhibition de l'efflux de cholestérol, pourraient favoriser la formation de cellules spumeuses dans l'intima, et ainsi participer à la formation d'une lésion d'athérosclérose.

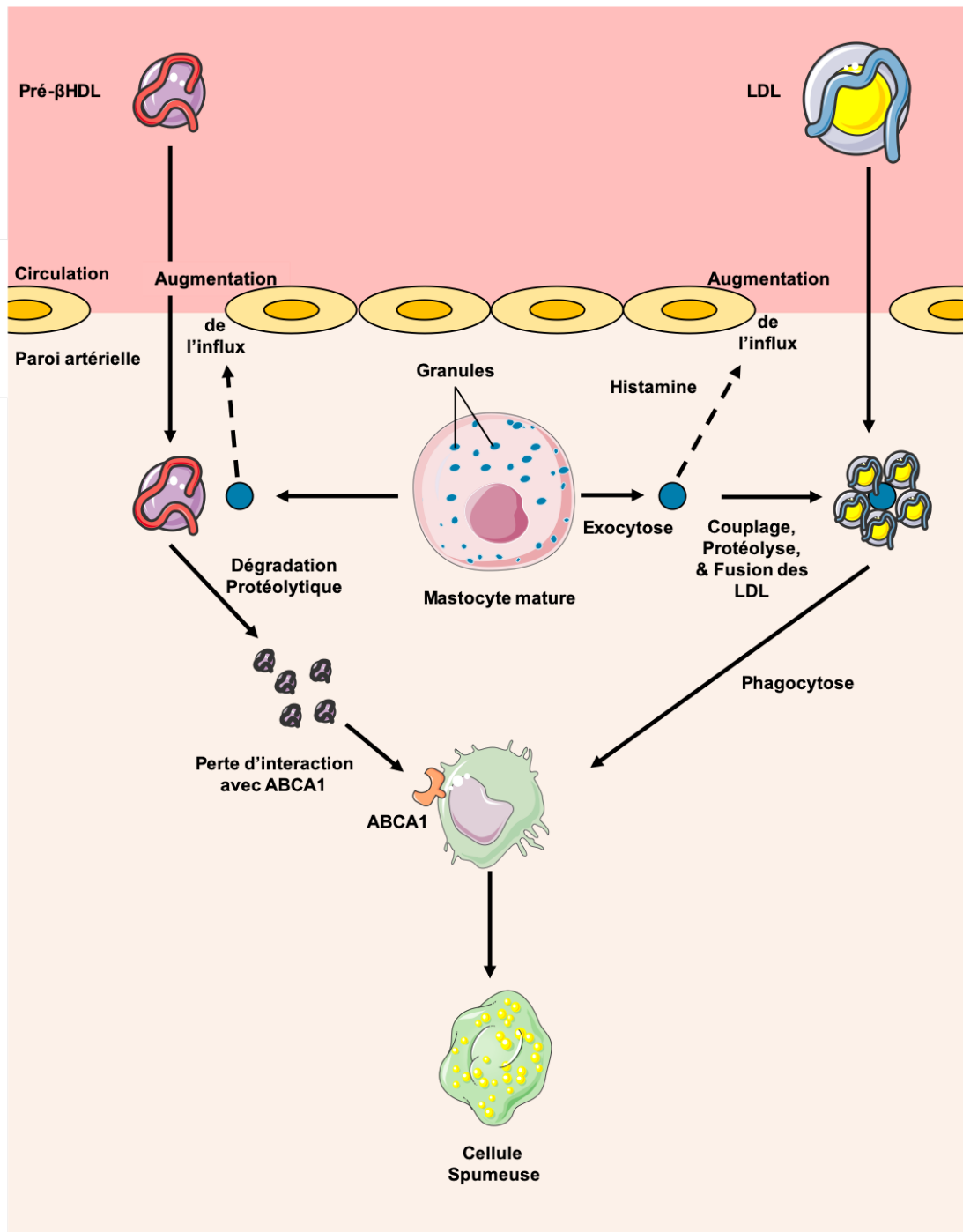


Figure 16 : Formation de cellules spumeuses par l'activation des mastocytes dans l'intima de la paroi artérielle

Les mastocytes activés vont relarguer différentes molécules, notamment l'histamine et des protéases. Sous l'effet des protéases les pré-βHDL vont subir une dégradation protéolytique empêchant l'interaction avec ABCA1 et le transfert du cholestérol des macrophages vers les pré-βHDL. L'histamine va augmenter la perméabilité de la paroi artérielle et l'infiltration des particules de LDL dans l'intima des vaisseaux sanguins. Sous l'effet des protéases, les LDL vont fusionner et créer des agrégats augmentant la phagocytose des macrophages et leur transformation en cellules spumeuses.

V) Action inflammatoire de PCSK9

Récemment un lien direct entre PCSK9 et l'inflammation a été suggéré. En effet, Les niveaux circulants de PCSK9 sont corrélés au nombre de globules blancs chez les patients atteints de maladie coronaire stable [281]. De plus, une étude *in vitro* a mis en évidence que la diminution de l'expression de PCSK9 par siRNA dans des cultures de macrophages réduit la réponse inflammatoire induite par les LDL oxydés [282]. Enfin, l'utilisation de l'alirocumab dans un modèle de souris hypercholestérolémiques réduit le recrutement de monocytes et améliore la composition de la lésion athéromateuse [283].

Au-delà du rôle de PCSK9 dans la réponse inflammatoire liée à l'athérosclérose, de nombreuses études indépendantes ont montré un lien entre PCSK9 et choc septique [284][285]. Ainsi, l'expression de PCSK9 hépatique est notamment augmentée en réponse à une inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) chez la souris [286]. En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de PCSK9 est associée avec un meilleur pronostic au cours d'un choc septique aussi bien chez la souris que chez l'homme [285]. De plus, une étude de souris avec un système immunitaire humanisé sur-exprimant une forme GOF de PCSK9 dans le foie a montré une prolifération accrue des lymphocytes T CD4+ et CD8+, une baisse des lymphocytes T régulateurs et une augmentation de l'inflammation au niveau du foie et des poumons [287].

L'ensemble de ces travaux suggèrent que PCSK9 aurait un profil pro-inflammatoire. D'autres études sont nécessaires afin de comprendre son rôle direct ou non dans les processus inflammatoires.

Très peu d'études se sont intéressées à la relation entre allergie et maladies cardiovasculaires. Les quelques études montrent que les patients allergiques sont plus sujets aux maladies coronaires que les sujets non allergiques. Les auteurs expliquent cette association par l'inflammation chronique que subissent ces patients. En effet, le terrain pro-inflammatoire chez les individus allergiques notamment par la dégranulation des mastocytes entraîne une augmentation de la survenue des MCV [288].

Chapitre 3 : l'allergie alimentaire

I) Définition et prévalence

1) Définition et symptômes

Le système immunitaire des mammifères est adapté pour tolérer certains antigènes tout en répondant de manière appropriée aux antigènes néfastes tels que ceux des agents pathogènes. Cependant, bien que les antigènes alimentaires soient étrangers au système immunitaire, une surveillance immunitaire saine entraîne un état de non-réactivité immunitaire, ce phénomène est appelé "tolérance ". Il a été montré que 2 % des protéines alimentaires passent par la barrière intestinale [289] et sont disséminées dans le sang ou la lymphe. Une fois qu'ils ont passé la barrière épithéliale, les antigènes sont pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui, en absence d'un signal de co-stimulation, induisent une tolérance [290][291][292]. A l'inverse, lorsque la tolérance orale est rompue, une réaction immunitaire se met en place suite à l'ingestion d'un allergène spécifique, ce phénomène est appelé : allergie alimentaire.

Tous les aliments sont susceptibles d'être transformés en allergène, mais en réalité certains aliments sont plus allergènes que d'autres. En effet, chez les enfants, le lait de vache, l'œuf, l'arachide, le soja, les fruits à coque et les fruits de mer représentent la majorité des allergies alimentaires (Table VI) [293]. Toutefois, nombre de ces allergies précoces sont associées à une rupture dans le développement de la tolérance, ce qui conduit à un spectre d'allergies différent chez les adultes (Table VI) [293]. Les symptômes de l'allergie alimentaire sont divers et variés selon le type d'allergène et les individus. Cette diversité rend le diagnostic compliqué. Les symptômes peuvent apparaître entre quelques minutes et quelques heures après

l'ingestion de l'allergène. Ils peuvent se présenter en touchant plusieurs organes comme la peau, le système digestif et l'appareil respiratoire induisant différentes réactions comme l'urticaire, des nausées, vomissements, un œdème ou même de l'asthme [294].

Aliment	Prévalence (%)
Enfants	
Lait de vache	2,5
Œuf	1,3
Arachide	0,8
Soja	0,4
Fruits à coque	0,2
Fruits de mer	0,1
Adultes	
Fruits de mer	2
Arachide	0,6
Fruits à coque	0,5
Poissons	0,4

Tableau VI : Prévalence des allergies alimentaires chez les enfants et les adultes

Il existe plusieurs types d'allergies alimentaires classées selon l'importance des immunoglobulines E dans la pathologie. Les allergies alimentaires ont été découpées en 3 classes : les allergies IgE médiées, les allergies non IgE médiées et les allergies mixtes (Table VII).

1.1) Allergies alimentaires IgE médiées

Cette classe d'allergies alimentaires est celle qui présente les symptômes les plus sévères et qui peut même être fatale. La physiopathologie de cette classe d'allergie alimentaire est caractérisée par la dégranulation des mastocytes et des basophiles activés par les IgE et l'apparition rapide des symptômes. Ce phénomène est possible par la reconnaissance des allergènes par les IgE liées aux FcεRI à la surface de ces cellules immunitaires. Ce couplage entre les IgE spécifiques de l'allergène et l'allergène va permettre une dimérisation du complexe IgE-FcεRI et, ainsi, induire la dégranulation des particules d'histamine et d'autres facteurs pro-inflammatoires [295]. Après cette réponse immédiate, l'inflammation est maintenue par la production *de novo* de leucotriènes, du facteur d'activation des plaquettes et de cytokines comme les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13 [295].

1.2) Allergies alimentaires IgE non médiées

Cette catégorie d'allergies alimentaires se caractérise par une réaction allergique médiée par les éosinophiles. La plupart des allergies alimentaires IgE non médiées affectent principalement le tractus gastro-intestinal, plutôt que la peau et les voies respiratoires. Ces manifestations conduisent à différents symptômes cliniques comme l'œsophagite, la rectocolite allergique, et l'entéocolite induite par les protéines alimentaires (pour revue [296]).

1.3) Allergies alimentaires mixtes

Cette catégorie d'allergies alimentaires est caractérisée par des voies dépendantes et indépendantes des IgE. Les manifestations résultant de facteurs

indépendants des IgE comprennent la dermatite atopique liée à une allergie alimentaire retardée (6-48 heures après l'exposition) [297]. Ce retard est causé par l'action des lymphocytes T helper 2 (Th2) [298] et les troubles gastro-intestinaux éosinophiles, tels que l'œsophagite, qui sont souvent déclenchés par des allergènes du lait et causés par l'infiltration éosinophile des tissus [299].

Sous-type d'allergie	Âge des patients	Allergènes	Symptômes
Allergies IgE médiées			
Pas de sous-type	Enfants > Adultes	Lait, œuf, blé, soja, arachides, fruit à coque, poisson, fruit de mer	Démangeaisons, urticaire, œdème de Quincke, douleurs abdominales, vomissement, diarrhée et hypotension
Allergies IgE non médiées			
FPIES (Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome)	Enfants	Lait, riz, soja, œuf et avoine	Vomissement, diarrhée et défaut de croissance
FPIP (Food Protein Induced Proctocolitis)	Enfants	Lait, soja, blé et œuf	Saignements rectaux
FPE (Food Protein Enteropathy)	Enfants	Lait, soja, blé et œuf	Diarrhée, défaut de croissance, malabsorption et stéatorrhée
Allergies mixtes			
Allergie alimentaire associée à la dermatite atopique	Enfants > Adultes	Lait, œuf, blé, soja, arachide, fruit à coque, poisson et fruit de mer	Exacerbation de la dermatite atopique après ingestion d'un allergène

Œsophagite à éosinophiles	Enfants et Adultes	Lait, blé, œuf, viande, soja et poulet	Vomissement, défaut de croissance, surcharge fécale et brûlures d'estomac
Autres désordres gastro-intestinaux à éosinophiles	Enfants et Adultes	Lait, œuf, blé, soja, fruit à coque, poisson, fruit de mer et viande	Douleurs intestinales variées

Tableau VII : Classification des allergies alimentaires (adapté de Yu et al. 2016)

1) Données de prévalence et études cliniques

Le sentiment d'une réaction indésirable à l'ingestion de nourriture, allergie ou intolérance alimentaire est commun. Dans une étude conduite au Royaume-Uni, 20% de la population répond être intolérante à certains aliments. Cependant, lorsqu'une étude en double aveugle avec challenge oral est conduite, seulement 2% des patients présentent une réaction immunologique [300]. De plus, la même discordance entre questionnaire et réaction au challenge est observée dans une étude allemande. Avec cette fois une prévalence de 3,6% de réactions allergiques avec plus des deux tiers présentant une réaction IgE médiée [301]. La prévalence de l'allergie alimentaire est plus importante chez les enfants que chez les adultes. La prévalence des allergies IgE spécifiques diminue avec l'âge de 3,8% chez les 6 – 19 ans et 1,3% chez les plus de 60 ans [302]. La prévalence de l'allergie alimentaire est hétérogène suivant les régions et est en augmentation dans certaines parties du monde lorsqu'elle reste stable dans d'autres [303] (Figure 16). En effet, une étude chinoise montre un doublement des allergies IgE médiées à 10 ans d'intervalle dans le même type de population (des enfants de 0 à 24 mois) passant de 3,5% en 1999 à 7,7% en 2009 [304] alors que

le Royaume-Uni, la Finlande et le Canada présentent des prévalences stables des allergies alimentaires [305][306][307].

En résumé, les études tendent à estimer la prévalence de l'allergie alimentaire à environ 5 à 7% [303] chez les enfants et environ 2% chez les adultes [308] (Figure 17).

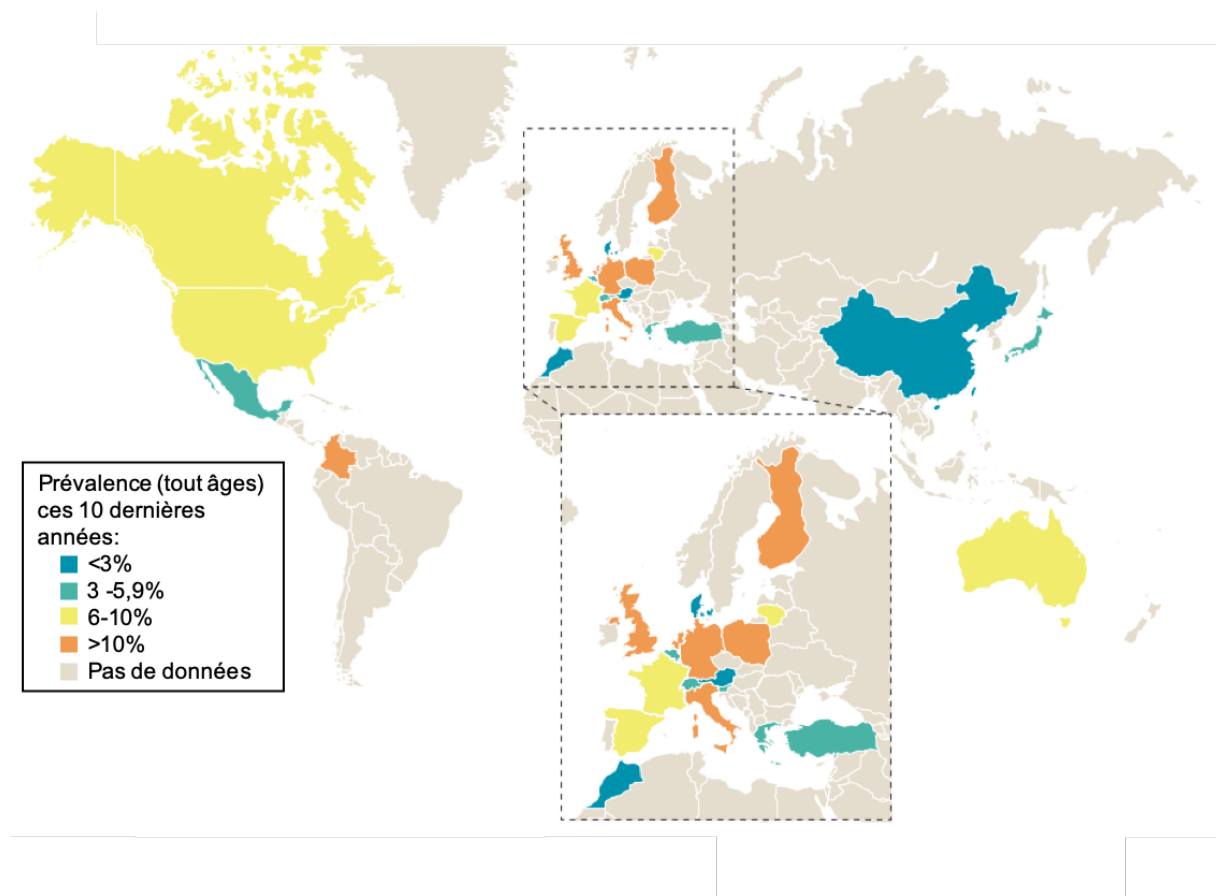


Figure 17 : Prévalence de l'allergie alimentaire dans le monde (adapté de Renz et al. 2018)

3) Augmentation des allergies

La prévalence des allergies alimentaires est en augmentation ces dernières années. Ce phénomène est maintenant reconnu comme un enjeu majeur de santé

publique. Entre 1997 et 2007, une étude visant à déterminer la prévalence de l'allergie alimentaire par auto-déclaration chez les enfants âgés de moins de 18 ans a montré que la prévalence a augmenté de 18% pour atteindre 3,9% et a continué d'augmenter pour atteindre 5% en 2011 aux États-Unis [310][311]. Encore plus récemment, toujours aux États-Unis, le dernier rapport fait mention d'une augmentation des hospitalisations pour un choc anaphylactique causé par une allergie alimentaire, notamment celle à l'arachide, qui a augmenté de 413% en 10 ans [312]. De plus, une étude conduite entre 1997 et 2013 en Australie montre une augmentation des décès par choc anaphylactique après allergie alimentaire de 9,7% par an [313].

L'augmentation significative de la prévalence des allergies alimentaires sur une courte période suggère que des facteurs génétiques, environnementaux et le style de vie jouent un rôle dans son étiologie.

4) Facteurs de risque des allergies alimentaires

4.1) Facteurs génétiques

L'allergie alimentaire est une maladie ayant une composante héréditaire. En effet, les enfants qui ont des parents ou frères et sœurs allergiques à l'arachide ont 7 fois plus de risques de développer la même allergie [314]. De plus, les jumeaux monozygotes ont un risque 64% plus élevé de développer une allergie à l'arachide si l'un d'entre eux présente une telle allergie [315]. En plus de ces études sur l'hérédité, des polymorphismes génétiques ont été associés au développement d'allergies alimentaires. C'est le cas d'un polymorphisme de *STAT6* (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) qui est associé à une allergie au noix [316]. Dans le même contexte, des polymorphismes des gènes de l'*IL-10* et l'*IL-13* ont été associés à un

risque accrue de développement d'allergies alimentaires [317][318]. Enfin, De nombreuses études ont montré que les mutations LOF de la filaggrine, un gène important dans l'intégrité de la barrière épithéliale notamment au niveau de la peau, sont associées au développement de dermatite atopique et de l'allergie à l'arachide [319]. Néanmoins aucun gène n'a clairement été associé au développement de l'allergie alimentaire ; ce qui suggère un rôle fondamental de notre environnement.

4.2) Microbiote

En 1989, Strachan a émis l'hypothèse, pour expliquer l'accroissement de la prévalence des allergies, que l'exposition aux risques d'infection pendant la petite enfance et aux microbes était liée à la taille des fratries et était inversement proportionnelle aux risques de développement d'allergies [320]. Des études ultérieures ont modifié l'hypothèse initiale de l'hygiénisme pour suggérer un rôle de la flore microbienne dans la prédisposition aux allergies, reflétant l'impact d'un style de vie dans la restriction de l'exposition et de la colonisation par des bactéries commensales [321]. L'intestin est connu pour être colonisé par une quantité extrêmement importante de bactéries notamment au niveau du colon (environ 10^{11} de bactéries/mm de colon) [322]. Normalement, des communautés saines et diversifiées de bactéries commensales favorisent des réponses immunitaires tolérogènes qui offrent une protection efficace à long terme contre le développement de maladies allergiques et inflammatoires (Figure 18) [323]. A l'inverse, une colonisation anormale conduisant à une dysbiose peut entraîner une susceptibilité plus forte aux maladies atopiques et inflammatoires, même si la relation de cause à effet entre dysbiose et allergie reste encore mal définie (Figure 18). Il a notamment été montré que la dysbiose est

importante dans le développement et la persistance des allergies alimentaires, aussi bien chez l'Homme que dans les modèles animaux [324].

Concernant la tolérance favorisée par le microbiote, différents mécanismes sont proposés. Tout d'abord, il a été montré que les bactéries commensales produisent des acides gras à chaînes courtes (SCFA, Short Chain Fatty Acid) comme l'acétate, le propionate et le butyrate à partir des fibres alimentaires [325][326]. Ces SCFA se fixent aux récepteurs couplés aux protéines G (GPR) à la surface des entérocytes notamment GPR43 et GPR109. Cette fixation induit une activation de l'inflammasome et une production d'IL-18, connue pour garantir l'intégrité de la barrière épithéliale [327][328]. Ensuite, les SCFA, notamment le butyrate, provoquent une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs au niveau du colon [329][330][331]. Le mécanisme expliquant cette expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) passe par l'inhibition de l'histone déacétylase par les SCFA. Cette inhibition entraîne une acétylation de l'histone H3 sur le promoteur de *Foxp3* conduisant à la différenciation des lymphocytes T en Treg [329][330]. De plus, le propionate peut induire l'expansion des Treg par le GPR43 [331]. Enfin, les bactéries de la classe des Clostridia, qui sont les bactéries produisant le plus de SCFA, induisent la production d'IL-22 via la reconnaissance de la flageline par le TLR5 [332]. Cette production est possible grâce à la stimulation des cellules lymphoïdes innées (iLC, innate lymphoid cells) et des lymphocytes T ROR γ + (RAR-related Orphan Receptor γ). L'IL-22 permet de garantir l'intégrité de la barrière épithéliale et de stimuler l'expression de peptides antimicrobiens comme REG3 β 3 et le mucus (Figure 18) [333].

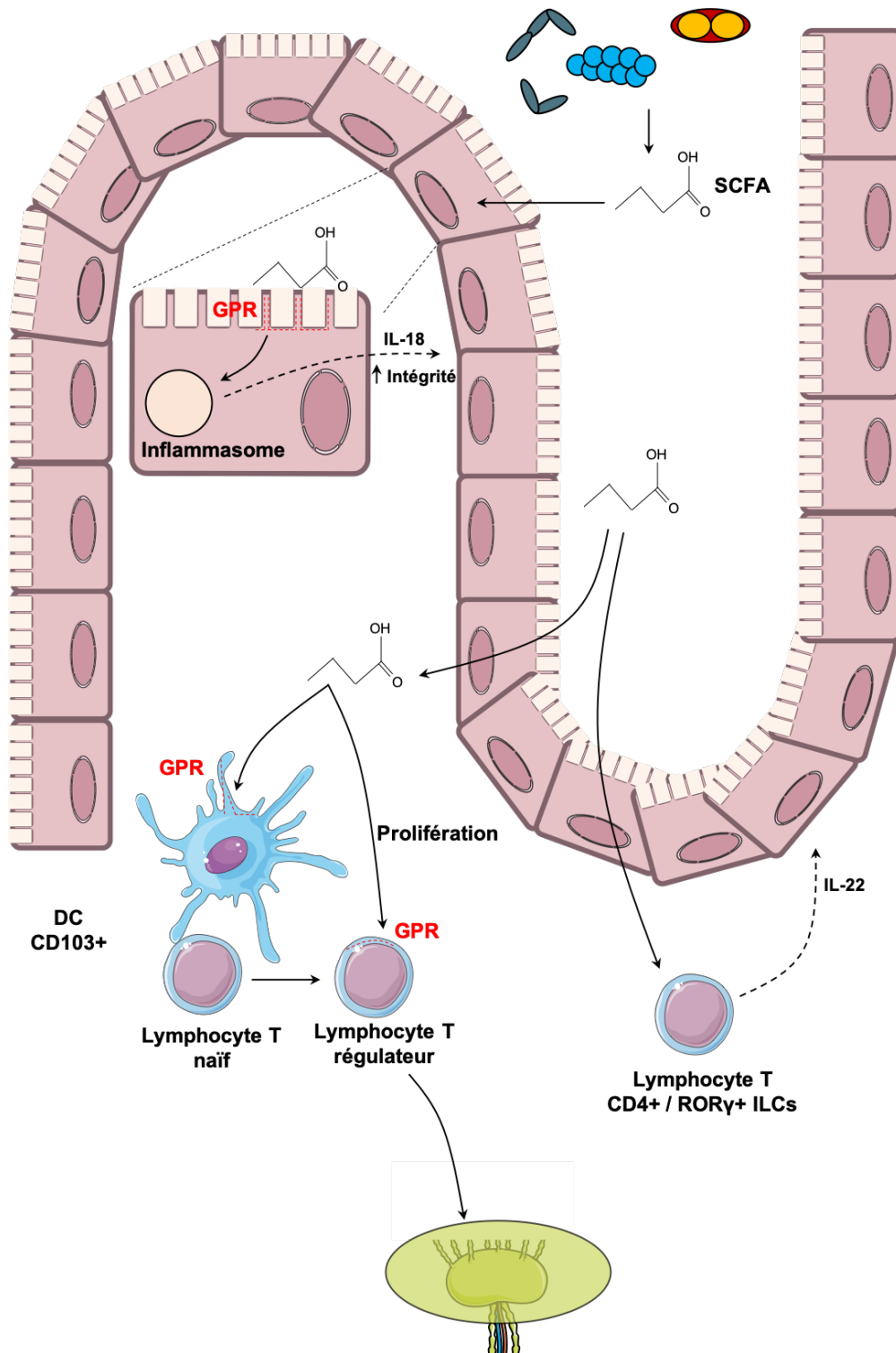


Figure 18 : Induction de la tolérance par le microbiote

Les SCFA vont activer, au niveau des entérocytes, les récepteurs couplés au protéine G. Cette activation va conduire à la production d'IL-18 et augmenter l'intégrité de la barrière intestinale. Les SCFA passant la barrière intestinale vont activer les GPR des cellules dendritiques CD103+ et induire la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs. De même, les SCFA vont stimuler la prolifération des lymphocytes T régulateurs toujours via les GPR. Enfin, les SCFA vont augmenter la production d'IL-22 important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

Les modèles animaux ont apporté les premiers arguments sur l'impact de la dysbiose sur les allergies alimentaires grâce à l'utilisation de la lignée murine *Il4ra*^{F709}, qui possède une mutation GOF de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-4 (IL-4R α) [334]. Le développement de l'allergie alimentaire chez ces souris est associé à une composition de bactéries commensales particulière par rapport aux souris sauvages traitées de la même manière. De plus, le transfert fécal de bactéries des souris *Il4ra*^{F709} vers des souris sans aucune bactérie (Germ-Free, GF) transmet leur susceptibilité aux allergies alimentaires. Les souris GF avec le microbiote des souris *Il4ra*^{F709} présentent une augmentation des IgE spécifiques à l'ovalbumine et les symptômes anaphylactiques après un challenge oral. Enfin, chez les souris *Il4ra*^{F709}, le transfert rétro-orbital de Treg spécifiques de l'ovalbumine supprime l'allergie et restructure le microbiote [335]. De plus, une étude a utilisé le microbiote d'enfants non allergiques, considéré comme protecteur, et transféré dans des souris GF. Ce microbiote, caractérisé par la présence forte de *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, supprime la présence des IgG1 spécifiques de la β -lactoglobuline, la dégranalution des mastocytes et les symptômes après challenge [336]. Toutes ces études *in vivo* ont permis d'orienter les études chez l'Homme (Figure 19).

Les premières études, basées sur la culture des bactéries sur des milieux sélectifs, suggèrent que les enfants atteints d'allergies au lait possèdent plus de bactéries anaérobies que les enfants non allergiques [337]. Cependant dans 3 autres cohortes Européennes, aucune association n'a été trouvée entre les bactéries commensales cultivables et l'allergie alimentaire [338]. Ces résultats peuvent s'expliquer par la difficulté à disposer d'espèces de bactéries cultivables.

Une étude canadienne, utilisant le séquençage des ARNr 16S (ARN ribosomal), donne une idée plus précise de l'impact de la dysbiose sur les allergies alimentaires. En effet, cette étude a montré que la réduction de la diversité microbienne chez des bébés de 3 mois est associée à une sensibilisation alimentaire à 12 mois. Cette diminution de diversité est liée à une diminution des *Bacteroidaceae* et un enrichissement en *Enterobacteriaceae* [339].

Toutes ces données montrent clairement que le microbiote est un facteur crucial du développement des MCV. Nous détaillerons les thérapies visant à traiter la dysbiose afin de combattre les allergies alimentaires dans un paragraphe dédié.

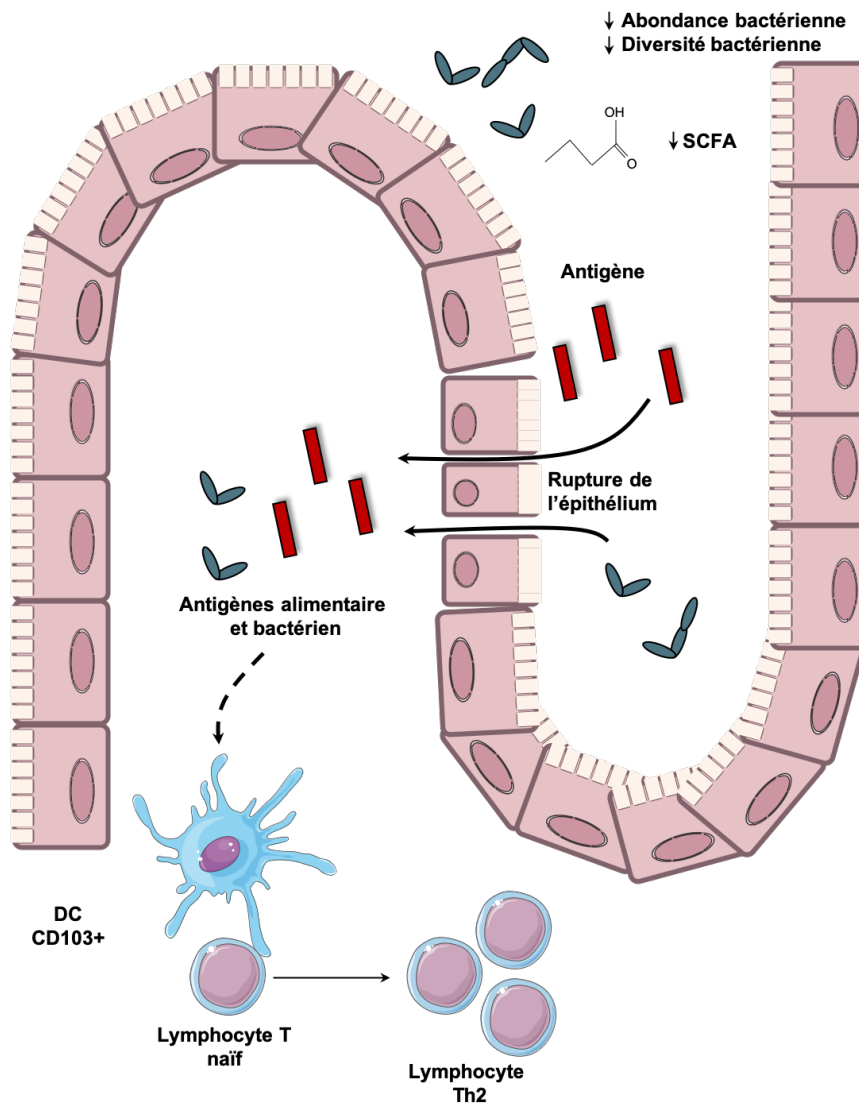


Figure 19 : Induction de l'allergie alimentaire par le microbiote

La diminution de l'abondance et de la diversité des bactéries commensales diminue la quantité de SCFA présent dans la lumière intestinale. Cette diminution de SCFA entraîne une altération de la barrière intestinale permettant l'entrée d'antigènes bactériens et alimentaires. La prise en charge des antigènes par les DC CD103+ permet l'activation des lymphocytes T naifs en lymphocytes Th2, pro-inflammatoires.

4.3) Voies d'exposition aux allergènes

La voie orale était traditionnellement considérée comme la voie majeure de sensibilisation aux allergènes alimentaires. Cependant, dans la plupart des cas, les enfants ont une réaction allergique à l'arachide dès leur première ingestion de

cacahuètes [340], suggérant que la sensibilisation a eu lieu par voie non-orale ou durant la grossesse.

L'influence de l'alimentation maternelle sur la sensibilisation alimentaire du futur bébé est sujet à controverse. En effet, des études suggèrent que la consommation d'arachide durant la grossesse peut être un facteur de risque de sensibilisation à l'arachide [341]. Alors que d'autres études ne montrent aucune influence sur la sensibilisation prénatale [342] ou même rapportent un rôle protecteur à la sensibilisation [343].

L'hypothèse de la double exposition suggère que l'exposition précoce à un allergène alimentaire via une barrière cutanée altérée favorise la sensibilisation lorsque l'exposition précoce par voie orale conduit à la tolérance [344]. Il y a une forte association entre la dermatite atopique et la sensibilisation alimentaire [345]. En effet, l'eczéma est considéré comme un facteur de risque majeur du développement de l'allergie alimentaire [346][347]. De plus, les lymphocytes T spécifiques de l'arachide des patients allergiques expriment le marqueur cutané CCR4 [348].

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la peau des enfants souffrant de maladies inflammatoires cutanées est le site majeur de sensibilisation aux allergènes alimentaires (Figure 20).

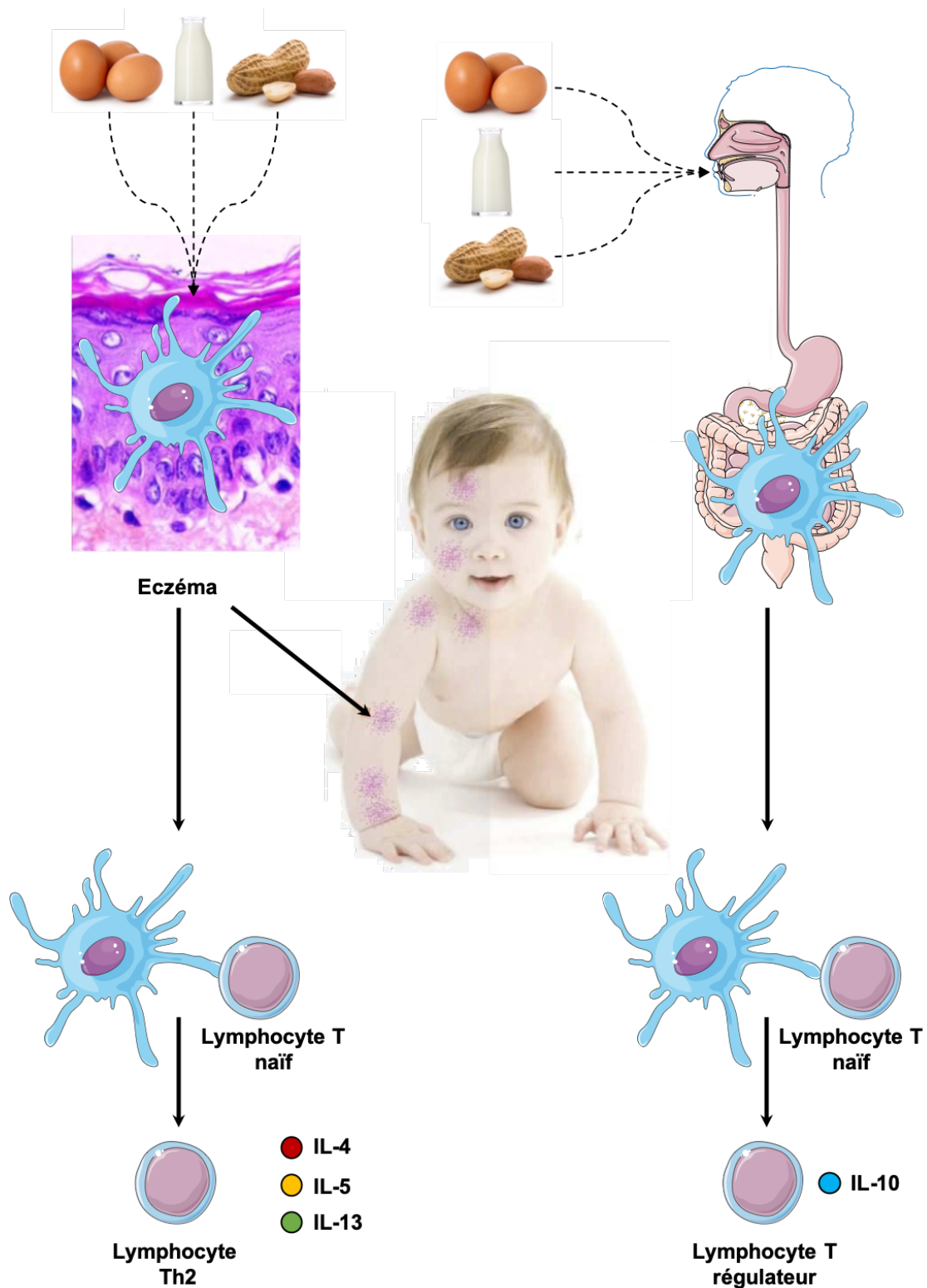


Figure 20 : Hypothèse de la double exposition et pathogénèse de l'allergie alimentaire (adapté de Du Toit et al. 2016)

L'allergie alimentaire est favorisée par l'exposition cutanée des allergènes. Cette exposition permet le développement des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2. A l'inverse l'exposition orale aux allergènes induit une tolérance par le développement de lymphocytes T régulateurs

II) Rôle de la barrière intestinale

1) Structure de l'intestin : organe immunitaire

L'intestin est le plus large réservoir de cellules immunitaires du corps humain. L'une de ses fonctions est de protéger l'organisme contre les pathogènes extérieurs. L'intestin, organe immunitaire, peut être divisé en sites inducteurs et site effecteurs. Les sites inducteurs sont appelés GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) et se composent des plaques de Peyer (PP), des follicules lymphoïdes isolés et des ganglions lymphatiques mésentériques [349]. Les PP et les follicules lymphoïdes isolés contiennent des lymphocytes T et B, des macrophages et des cellules dendritiques. En plus de ces cellules immunitaires, les sites inducteurs se caractérisent par la présence de cellules spécialisées au niveau de l'épithélium intestinal, les cellules M [290]. Les sites effecteurs sont constitués de la lamina propria et de l'épithélium. Ils sont caractérisés par la présence de lymphocytes, notamment de type T, des macrophages, des éosinophiles, des cellules dendritiques et des mastocytes, plus particulièrement dans l'épithélium on retrouve des lymphocytes intra-épithéliaux (Figure 21) [350].

Ces structures effectrices et inductrices sont présentes afin de trier les antigènes pathogènes et inoffensifs, comme ceux provenant des aliments. Ce processus de non réponse alimentaire ou tolérance met en jeu de nombreux processus. A l'inverse, une rupture de ces processus induit le développement d'allergies alimentaires.

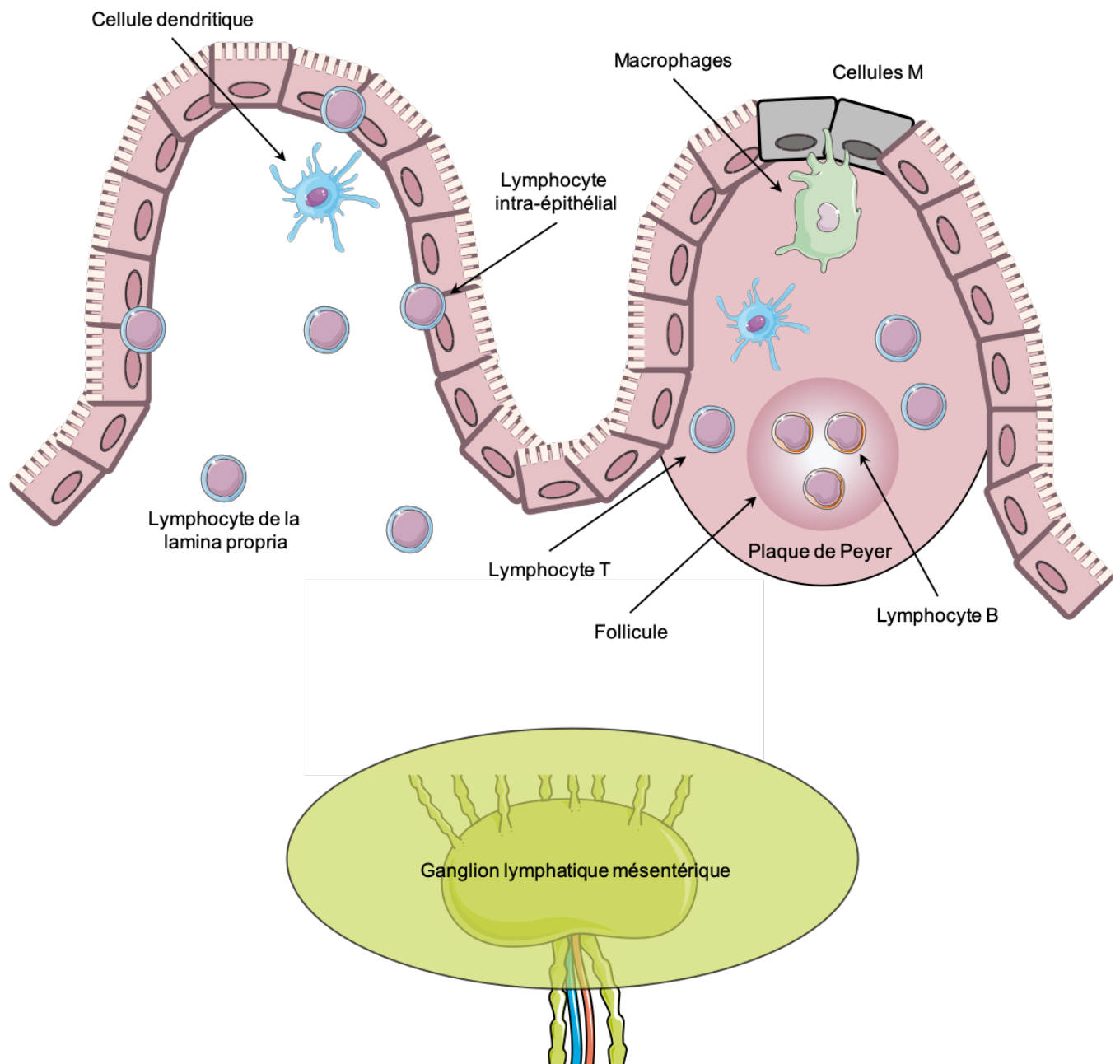


Figure 21 : Schéma de la structure de l'intestin en tant qu'organe immunitaire

L'intestin est organisé en structure immunitaire de part la présence de nombreuses cellules immunitaires comme les DC, les lymphocytes intra-épithéliaux et de la lamina propria. De plus la présence des plaques de Peyer et des follicules permettent le développement et l'activation des lymphocytes B. La proximité de l'intestin avec les ganglions lymphatiques mésentériques fait de l'intestin un site privilégié des réponses immunitaires.

2) Induction de la tolérance

En 1978, la découverte d'une population lymphocytaire suppressif, les lymphocytes T régulateurs, a permis de comprendre les mécanismes induisant la tolérance orale [351]. La tolérance implique un ensemble de mécanismes permettant la différenciation et la prolifération des lymphocytes Treg. De plus, la mise en place de la tolérance s'effectue dans les ganglions mésentériques et requiert la migration des cellules présentatrices d'antigènes via le récepteur de chemokines CCR7 [352]. Les antigènes alimentaires sont capables de passer la barrière intestinale par une diffusion paracellulaire, une transcytose par les entérocytes, une endocytose par les cellules M ou par prélèvement de la lumière intestinale par les cellules exprimant le marqueur CX3CR1 [353][354][355]. Une fois entrés, les antigènes sont pris en charge par les cellules dendritiques (DC) CD103+ qui migrent de la lamina propria vers les ganglions mésentériques et présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Cette interaction permet la génération des lymphocytes Treg par différents mécanismes. L'un des mécanismes s'effectue par la production d'acide rétinoïque par les ganglions mésentériques et les DC [356]. Un autre passe par l'expression de l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) par les DC, importante dans le catabolisme du tryptophane, qui une fois inhibée, diminue la différenciation des Treg et favorise l'induction des Th1 et Th17 [357]. De plus, la sécrétion par les DC de TGF- β (Transforming Growth Factor) permet, aussi, la différenciation en Treg [356]. Les lymphocytes Treg expriment le récepteur CCR9 et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ à leur surface. Ces marqueurs permettent aux Treg d'interagir avec les entérocytes au niveau de la lamina propria et de migrer vers le GALT. Les Treg produisent une quantité importante d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) et de TGF- β favorisant la production d'IgA par les lymphocytes B (Figure 22).

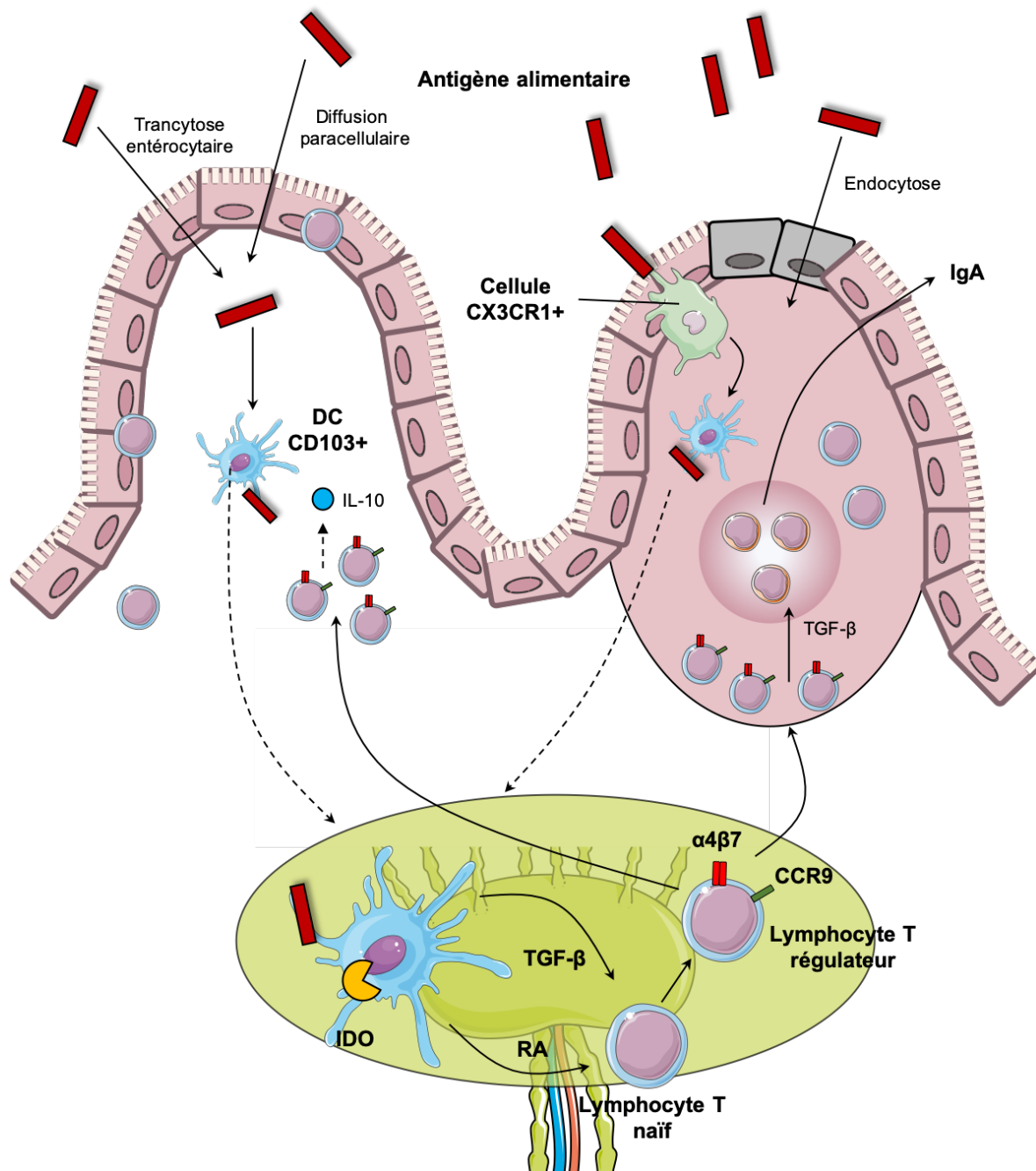


Figure 22 : Mise en place de la tolérance au niveau intestinal

Le passage des antigènes alimentaires par transcytose entérocytaire ou diffusion paracellulaire permet la prise en charge de ces antigènes par les DC CD103+. Ces DC vont migrer au niveau des ganglions mésentériques et libérer des facteurs de stimulation des lymphocytes T reg comme l'acide arachidonique et le TGF- β . Les lymphocytes T reg vont migrer vers la lamina propria et sécréter de l'IL-10 permettant le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Au niveau des plaques de Peyer les lymphocytes T reg vont permettre la production d'IgA, un modulateur du microbiote, par les lymphocytes B. Les cellules CX3CR1+ capturent les antigènes directement à travers la barrière intestinale permettant leur entrée et la prise en charge par les DC CD103+.

III) Mécanismes de l'allergie alimentaire

1) La sensibilisation

L'évènement conduisant à la rupture de la tolérance orale, la sensibilisation allergique et le développement d'allergies alimentaires est, encore aujourd'hui, mal compris. En effet, il est admis que des voies multiples conduisent à un échec du développement ou à une perte de la tolérance orale en favorisant la génération de lymphocyte Th2.

Les cellules épithéliales produisent du TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), de l'IL-25 et de l'IL-33 en réponse à une blessure, une inflammation et à l'activation des cellules immunitaires innées. Ces cytokines sont connues pour conduire vers une inflammation pro-Th2 [358]. Cette activation des lymphocytes Th2 passe par une activation des cellules dendritiques, des mastocytes et des basophiles qui vont alors produire les cytokines et les signaux nécessaires à la maturation des lymphocytes Th0 en Th2 [358].

Des études montrent que l'IL-33 augmente la présence de OX40L (OX40 ligand) à la surface des DC, ce qui permet la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en Th2 [359][360]. De plus, l'IL-33 est connue pour activer les cellules lymphoïdes innées de type 2 produisant une quantité importante d'IL-4 et inhibant la génération de Treg [361]. Enfin, l'IL-33 agit directement sur les mastocytes et augmente leur réactivité aux IgE [362].

Comme décrit dans le paragraphe 4.3 du chapitre 3, la dermatite atopique est un facteur de risque pour le développement des allergies alimentaires. Cette pathologie est associée à une augmentation des niveaux de TSLP [363]. Cette

cytokine active les DC, favorisant l'expression d'OX40L, et les basophiles orientant leur profil vers la production et la sécrétion d'IL-4 [364][365].

L'IL-25, la troisième cytokine produite par les cellules épithéliales favorable à la sensibilisation, est connue pour être augmentée dans l'intestin des souris présentant une allergie alimentaire. Il a été montré que la surexpression d'IL-25 dans l'intestin favorise l'apparition de l'allergie dans les modèles expérimentaux. A l'inverse, lorsque le récepteur de l'IL-25 est absent, les souris sont résistantes à l'induction de l'allergie alimentaire [366][364]. De plus, l'IL-25 agit sur les ILC2 et les active afin qu'elles produisent des cytokines pro-Th2 [366].

Une fois différenciées en lymphocytes Th2, les cellules vont produire de l'IL-2, de l'IL3, de l'IL-4 et de l'IL-9. Toutes ces cytokines vont contribuer au maintien de l'inflammation et à la génération de processus déterminant dans l'apparition des symptômes lors du challenge oral. Une des étapes clef dans la sensibilisation est le changement de classe des lymphocyte B vers des plasmocytes sécrétant des IgE. Ce changement isotypique des Ig est provoqué par la sécrétion d'IL-4 d'une part par les lymphocytes Th2 mais aussi par les basophiles et les mastocytes activés [367]. L'activation de ces différentes cellules immunitaires est possible par les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th2.

La sensibilisation s'achève par la captation des IgE spécifiques de l'allergène par les récepteurs FcεRI (Fragment Constant ε Récepteur I) présents à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette liaison prépare ces cellules à l'activation lors de la prochaine exposition à l'allergène (Figure 23).

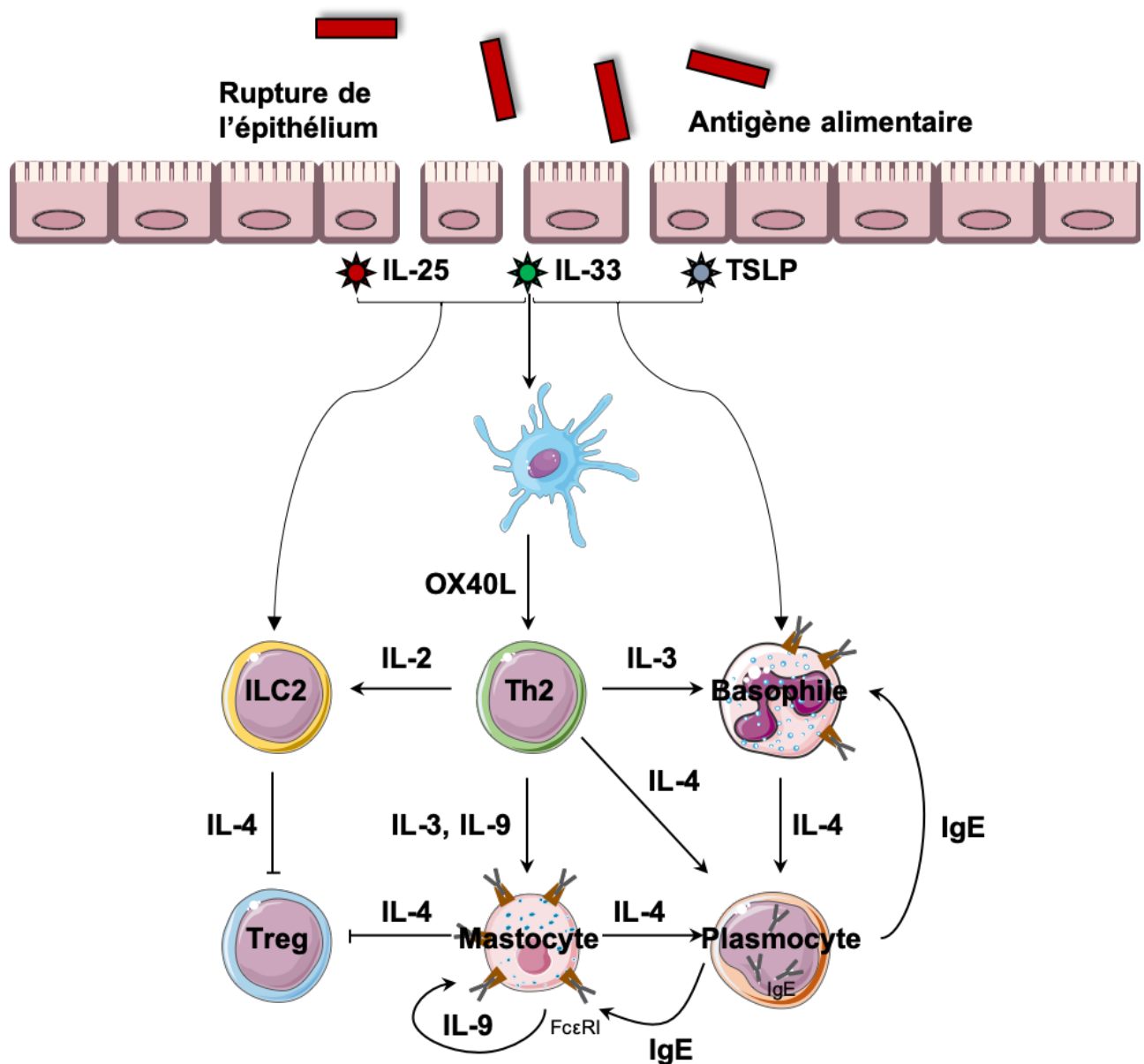


Figure 23 : Mise en place de la sensibilisation allergique

La rupture de l'épithélium entraîne une production et une sécrétion des alarmines telles que l'IL-25, l'IL-33 et le TSLP. L'IL-25 stimule en particulier les ILC2 produisant de l'IL-4 et inhibant la prolifération des Treg. L'IL-33 favorise l'expression d'OX40L à la surface des DC CD103+ stimulant ainsi l'activation des lymphocytes Th2. Ces lymphocytes vont produire de l'IL-2 favorisant le développement des ILC2, de l'IL-3 permettant la prolifération et le recrutement de basophiles, ainsi que de l'IL-4 favorisant la commutation de classe des lymphocytes B en plasmocytes à IgE. Enfin la production d'IL-9 par les lymphocytes Th2 favorise la prolifération des mastocytes. Les plasmocytes sécrètent de l'IgE se fixant sur leurs récepteurs (FcεRI) préparant les basophiles et les mastocytes pour la sécrétion de leurs granules pro-inflammatoires.

2) Le challenge

Chez les patients sensibilisés la réexposition à l'allergène entraîne une fixation de ce dernier par le complexe FcεRI-IgE et induit une cascade de réactions intracellulaires menant à l'expression et la sécrétion des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires (leucotriènes, prostaglandines et histamine) [368]. De plus, d'autres cellules sont recrutées sur le site d'inflammation : les Th2 par le récepteur aux chimiokines CCR4, les éosinophiles stimulés par l'IL-5 et les Th17 produisant de l'IL-17 et l'IL-22 amorçant le recrutement de neutrophiles [369]. En plus, du FcεRI, considéré comme le récepteur de haute affinité pour les IgE, il existe un récepteur de basse affinité : CD23 impliqué dans l'amplification de la réaction allergique. Ce récepteur est exprimé dans les mastocytes et d'autres cellules (basophiles et cellules épithéliales) [370] et augmente la production d'IgE. L'expression de CD23 par les cellules épithéliales permet de faciliter le passage du complexe CD23-IgE-Antigène de la lumière intestinale vers la lamina propria [371]. Ainsi les antigènes au niveau de la lamina propria se fixent sur les FcεRI et induisent les réactions décrites ci-dessus.

La compréhension des mécanismes de sensibilisation et de challenge a permis le développement de stratégies thérapeutiques visant à contrer les symptômes de l'allergie.

IV) Traitement des allergies alimentaires

L'évitement strict des allergènes est la seule "thérapie" de l'allergie alimentaire. Cependant, des thérapies émergentes sont développées comme l'immunothérapie orale et la prévention par les pré- et probiotiques.

1) Eviction

Les patients qui risquent d'avoir des réactions allergiques graves doivent avoir sur eux en permanence des médicaments comme un auto-injecteur d'adrénaline. En effet, l'adrénaline prise dans les 5 minutes après l'ingestion de l'allergène permet de contrer les effets périphériques des médiateurs sécrétés par les mastocytes. De plus, l'adrénaline peut diminuer le relargage des médiateurs par les mastocytes et réguler le tonus vasculaire et la perméabilité via l'oxyde nitrique [309]. Malgré la vigilance des patients allergiques, l'éviction n'est pas un traitement approprié étant donné qu'il n'empêche pas l'ingestion involontaire d'allergène. Par exemple, dans les lieux où les aliments sont consommés sans indication (emballages), 25% des enfants allergiques à un aliment déclarent une réaction allergique [372].

2) L'immunothérapie orale

L'immunothérapie par allergène est bien connue pour les allergies au venin, la rhinite allergique et les conjonctivites. Cette thérapie peut être administrée par voie sous-cutanée ou sublinguale. Ce type de stratégie est actuellement en développement contre les allergies alimentaires [373][374][375]. L'immunothérapie orale est l'approche la plus communément étudiée à l'heure actuelle. Cette approche se décompose en 2 étapes : la désensibilisation puis la tolérance. La désensibilisation s'effectue par administration de faibles doses croissantes (en dessous de la dose provoquant une réaction déterminée par challenge oral) de l'allergène à intervalle régulier par voie orale, sublinguale ou sous-cutanée. Une dose fixe peut également être donnée tout au long du processus de désensibilisation par voie cutanée [376]. La tolérance est le but ultime de cette thérapie et implique une absence de réaction allergique malgré une période d'absence d'exposition. Selon les données actuelles, la

désensibilisation est atteinte dans la majorité des études alors que la tolérance reste un objectif difficile à atteindre [377].

3) La prévention par les pro et prébiotiques

La découverte que le microbiote intestinal peut moduler la sensibilité aux allergies alimentaires (détaillé dans le paragraphe 4.2 du chapitre3) suggère une utilité thérapeutique potentielle à la manipulation du microbiome intestinal à l'avantage de l'hôte. Dans ce sens, les thérapies utilisant les probiotiques et prébiotiques ont émergé.

Peu d'études cliniques sur l'effet des probiotiques sur les patients allergiques alimentaires ont été publiées. Les probiotiques sont des micro-organismes susceptibles d'induire un bénéfice pour l'hôte. Les études cliniques sur des enfants de 12 mois atteints d'allergie au lait supplémenté avec des probiotiques de *Lactobacillus casei* et *Bifidobacterium lactis* n'ont montré aucun effet sur le traitement de l'allergie [378][379]. Cependant, l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* combinée à du lait présentant de la caséine hydrolysée a augmenté la résolution de l'allergie après 6 à 12 mois comparativement à un groupe contrôle [378][379]. La même bactérie, *Lactobacillus rhamnosus*, a été testée chez des patients allergiques à l'arachide. Ce probiotique combiné à l'immunothérapie orale à l'arachide pendant 18 mois augmente l'incidence de la désensibilisation (82,1% vs 3,6%) en comparaison du groupe placebo [380]. Cependant, le manque d'un groupe de contrôles traités avec l'immunothérapie ou le probiotique seul rend l'efficacité du probiotique non certaine.

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui favorisent de manière sélective la croissance et l'activité de certaines bactéries commensales chez l'hôte. Des résultats positifs ont été rapportés chez les souris, notamment dans une étude où la nourriture des souris gestantes ou durant l'allaitement était enrichie

avec des oligosaccharides et de l'inuline induit une réduction de la sensibilisation et du développement de l'allergie chez les souris [381]. Cependant, les études cliniques chez l'Homme ne montrent aucun bénéfice lors de l'utilisation de prébiotiques sur la survenue des allergies alimentaires [382][383].

Article 1 : Circulating rather than intestinal PCSK9 regulates postprandial lipemia in mice.

L'objectif de cette étude a été de déterminer le rôle respectif de la forme extracellulaire d'origine hépatique (forme circulante) ou de la forme intracellulaire intestinale de PCSK9 sur le phénomène de lipémie postprandiale. L'étude menée en 2009 par notre équipe a montré que PCSK9 joue un rôle dans la régulation de la LPP [214]. Ce phénomène est décrit comme un facteur de risque cardiovasculaire dans certaines pathologies comme le diabète [32]. La distinction de l'effet circulant et intestinal de PCSK9 sur la lipémie postprandiale permettrait d'orienter les futures thérapies visant à inhiber PCSK9 sur une action extracellulaire ou intracellulaire. Nous avons deux hypothèses en commençant cette étude 1) La forme circulante régule le catabolisme des particules riche en triglycérides via le LDLR ; 2) La forme intracellulaire intestinale régule la production des chylomicrons via une interaction directe ou non avec l'ApoB-48.

Afin de répondre à ces deux hypothèses, nous avons utilisé différentes approches complémentaires discriminant la forme circulante et intestinale de PCSK9. En effet, tout d'abord nous avons développé un modèle de souris de délétion intestinale spécifique de PCSK9. Pour cela, nous avons croisé des souris *Pcsk9^{ff}* et des souris villine-cre [177][384]. Le croisement de ces souris a permis la génération de souris *i-Pcsk9^{-/-}* exprimant à la fois *Pcsk9^{ff}* et la villine-cre. La caractérisation de ce modèle n'a pas permis de mettre en évidence un rôle de la PCSK9 intestinale dans le métabolisme lipidique ni dans la LPP, suggérant que c'est la forme circulante de PCSK9 qui exerce les effets sur la LPP. Afin de démontrer le lien entre la PCSK9

circulante et la lipémie postprandiale, nous avons bloqué la forme circulante de PCSK9 par inhibition pharmacologique grâce aux anticorps anti-PCSK9 (alirocumab). Ces anticorps baissent la cholestérolémie et diminuent, dans une plus grande mesure, la LPP des souris sauvages. Pour aller plus loin, nous avons également utilisé l'alirocumab chez les souris *Ldlr*^{-/-} afin de déterminer si les effets de PCSK9 sont dépendants du LDLR. En l'absence du LDLR, l'inhibition de la forme circulante de PCSK9 n'a aucun effet sur la LPP mettant en évidence que PCSK9 agit sur la LPP via le LDLR. Enfin, nous avons surexprimé la forme humaine de PCSK9 par infection adénovirale augmentant ainsi la présence de la PCSK9 circulante. Ces souris présentent une disparition de la présence du LDLR hépatique et une augmentation de leur LPP semblable aux souris *Ldlr*^{-/-}. Ces résultats pris ensemble mettent en évidence que la PCSK9 circulante est la seule forme de PCSK9 agissant sur la LPP.

Dans un souci clinique et de relevance thérapeutique, nous avons voulu étudier l'impact de la déficience ou de l'inhibition de PCSK9 chez des modèles présentant une exacerbation du phénomène de LPP. En effet, chez l'Homme les patients diabétiques présentent une augmentation de leur LPP devenant même un facteur de risque indépendant du développement de MCV. Nous avons donc injecté des souris sauvages ou *Pcsk9*^{-/-} avec de la streptozotocine (STZ) afin de détruire les cellules bêta du pancréas et induire une insulino-pénie. Ce modèle est également connu pour présenter une hyperlipémie postprandiale. Lors de cette série d'expériences, nous montrons que l'absence de PCSK9 protège de l'hyperlipémie du modèle STZ. Afin d'aller plus loin nous avons également utilisé l'alirocumab dans le modèle de souris STZ. Nous montrons clairement que l'inhibition de la forme circulante de PCSK9 diminue l'hyperlipémie postprandiale.

En conclusion, après le développement d'un modèle d'inactivation intestinale de PCSK9, l'utilisation d'anticorps anti-PCSK9 afin d'inhiber la forme circulante, la sur-expression adénovirale de PCSK9 et l'utilisation d'un modèle STZ présentant une hyperlipémie postprandiale nous montrons que la PCSK9 circulante régule la LPP de manière LDLR dépendante et que l'inhibition de PCSK9 peut être un argument thérapeutique supplémentaire chez les patients diabétiques.

Nous avons soumis cette étude dans le journal ATVB (Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology), après un retour très positif des reviewers, nous venons de répondre à toutes les interrogations et attendons le retour final de l'étude. J'ai eu l'opportunité de présenter cette étude dans de nombreux congrès comme l'EAS à Maastricht, au DHU 2020 à Nantes, la SFD à Marseille et enfin à la NSFA à Biarritz où j'ai obtenu le prix de la meilleure communication orale.

Circulating rather than intestinal PCSK9 regulates postprandial lipemia in mice.

Damien Garçon¹, François Moreau¹, Audrey Ayer¹, Wieneke Dijk¹, Xavier Prieur¹, Lucie Arnaud¹, Anna Roubtsova², Nabil Seidah², Annik Prat², Bertrand Cariou^{1,3} and Cédric Le May¹

Affiliations : ¹L'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV NANTES, Nantes, France ; ²Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, affiliated to the Université de Montréal, Canada ; ³L'institut du thorax, Department of Endocrinology, CHU NANTES, Nantes, France.

Running title: Circulating PCSK9 regulates postprandial lipemia

Corresponding author: Cédric Le May, l'institut du thorax, INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291, Nantes, France, cedric.lemay@univ-nantes.fr.

Keywords: PCSK9, mouse, postprandial lipemia; intestine-specific PCSK9 knockout mouse, alirocumab

Subject code: Lipids and Cholesterol

Word count: 5024

Total number of figures and tables: 5 figures, 1 supplemental table

TOC category: basic

TOC subcategory: Arteriosclerosis

ABSTRACT (249/250)

Objective

Increased postprandial lipemia (PPL) is an independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular diseases. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) pathway. We previously showed that PCSK9 inhibition in mice reduces PPL. However, the relative contribution of intracellular intestinal PCSK9 or liver-derived circulating PCSK9 to this effect is still unclear.

Approach and Results

To address this issue, we generated the first intestine-specific *Pcsk9*-deficient (*i-Pcsk9*^{-/-}) mouse model. PPL was measured in *i-Pcsk9*^{-/-} as well as in wild-type and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice following treatment with a PCSK9 monoclonal antibody (alirocumab). Blocking the circulating form of PCSK9 with alicumab significantly reduced PPL, while overexpressing human PCSK9 in the liver of full *Pcsk9*^{-/-} mice had the opposite effect. Alirocumab regulated PPL in a LDLR-dependent manner since this effect was abolished in *Ldlr*^{-/-} mice. In contrast, *i-Pcsk9*^{-/-} mice did not exhibit alterations in plasma lipid parameters nor in PPL. Finally, PPL was highly exacerbated by STZ-induced diabetes in *Pcsk9*^{+/+} but not in *Pcsk9*^{-/-} mice, an effect that was mimicked by the use of alicumab in STZ-treated *Pcsk9*^{+/+} mice.

Conclusions

Taken together, our data demonstrate that PPL is significantly altered by full but not intestinal PCSK9 deficiency. Treatment with an PCSK9 monoclonal antibody mimics the effect of PCSK9 deficiency on PPL suggesting that circulating PCSK9 rather than intestinal PCSK9 is a critical regulator of PPL. These data validate the clinical relevance of PCSK9 inhibitors to reduce PPL, especially in patients with type 2 diabetes.

INTRODUCTION

Dyslipidemia is one of the major modifiable risk factors for atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD). Both epidemiologic and genetic studies, as well as randomized clinical trials with lipid-lowering therapies have clearly established that an increased concentration of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) causes ASCVD¹. In addition, it is now widely accepted that elevated non-fasting triglyceride (TG) concentrations represent an independent risk factor for ASCVD^{2, 3}. Postprandial lipemia (PPL) is a natural phenomenon occurring after a meal and that is characterized by an increased concentration of circulating triglyceride-rich lipoproteins (TRLs). Briefly, PPL comprises increased levels of intestinally produced chylomicrons (CMs) and their remnants, and also of liver-produced very-low density lipoproteins (VLDLs) and their remnants⁴. The hydrolysis of TG transported in CMs and VLDLs by lipoprotein lipase leads to cholesterol-enriched atherogenic remnants that are catabolized by the liver via the LDL receptor (LDLR), the LDLR-related protein 1 & 5 (LRP1 & 5) and heparan sulfate proteoglycans⁵. The easy access to highly caloric food has led to a progressive reduction of fasting periods in western countries, thus increasing the exposure risk to non-fasting TG concentrations. Furthermore, it has been clearly demonstrated that patients with insulin resistance or type 2 diabetes display an exacerbated PPL, potentially contributing to the residual CV risk observed in this population⁶.

Discovered in 2003, proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) is a master regulator of cholesterol metabolism which promotes the lysosomal degradation of the LDLR (reviewed in⁷). The liver represents the main site of PCSK9 expression and is the only organ that significantly contributes to plasma PCSK9 levels in mice⁸. However, PCSK9 is also expressed at significant levels in other extra-hepatic organs and may play a functional role beyond cholesterol homeostasis (reviewed in⁹). Notably, PCSK9 is highly expressed in intestinal mucosa cells^{8, 10} and may act on several intestinal functions. In 2009, we were the first to demonstrate that PCSK9-deficient (*Pcsk9*^{-/-}) mice display a blunted PPL¹⁰. The molecular mechanisms involved in this effect are not completely understood. On the one hand, some data support a direct action of PCSK9 inside the enterocyte to control apolipoprotein B48 (ApoB48) and CMs secretion¹⁰⁻¹². On the other hand, the hepatic clearance of CMs and chylomicron remnants is increased in *Pcsk9*^{-/-} mice¹⁰. Thus, the respective contributions of hepatic and/or intestinal PCSK9 to regulating PPL are still unknown.

To address this issue, we used two complementary approaches. We generated a unique intestine-specific *Pcsk9*-deficient (*i-Pcsk9*^{-/-}) mouse model to directly investigate the role of intestinal PCSK9 in PPL. In parallel, we investigated the effect of a PCSK9 monoclonal antibody, alirocumab, that specifically inhibits circulating PCSK9 on PPL in wild-type and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. Taken together our data clearly demonstrated that circulating rather than intestinal PCSK9 is the key regulator of PPL in mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

C57BL6/J mice and LDLR-deficient (*Ldlr*^{-/-}) mice were obtained from Charles River laboratories. Villin-Cre and *Pcsk9*^{fl/fl} C57BL6 mice were provided by the laboratories of Sylvie Robine and Nabil Seidah, respectively^{8, 13}. These mice were crossed to generate *i-Pcsk9*^{-/-}. We only used male mice for this study. The numbers of mice used for each experiment are indicated in figure legends. Mice were housed in a 12-hour day/night cycle and had unlimited access to water and food. PPL was measured in overnight fasted mice (14 hours). After an initial blood harvesting, mice received an oral gavage of olive oil (200 μ l). Plasma samples were then collected 1, 2 and 4 hours after the gavage. For the fasting-refeeding procedure, plasma was collected at day 1 in random fed condition at 8:00 am. Mice were fasted for 24h. At day 2, plasma from fasted mice were harvested at 8:00 am and then regular chow diet was reintroduced ad libitum in the cage. Plasma samples were then harvested 1, 2, 4, 6 and 24

hours after refeeding. Insulinopenic diabetes was induced using STZ (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) injection. STZ was resuspended in citrate buffer (pH 4,5) prior to injection. 14 hours fasted mice received a single high dose injection of STZ (150 mg/kg, intraperitoneal injection). Blood glucose levels were measured at indicated time using the ONE-TOUCH ULTRA glucometer. Alirocumab (Praluent®, Sanofi-Aventis France) was diluted in saline solution (NaCl 0,9%) and administrated subcutaneously at the dose of 10mg/kg of body weight. All the experiments have been approved by the “comité d’éthique des Pays de la Loire” (01953.01).

Adenoviral infection

Pcsk9 adenovirus ¹⁴ was intravenously injected at a rate of $5 \cdot 10^8$ Pi/mouse. Control mice received an intravenous injection of NaCl.

Plasma lipid parameters

Cholesterol and TG levels were measured using commercially available enzymatic kits (Sobiada, Montbonnot, France).

mRNA levels quantification

Real time PCR analyses were performed with the MESAGreen PCR Master Mix (Eurogentec, Angers, France). For the oligonucleotide sequences for real time PCR, please see the Major Resources Table. mRNA values were normalized to TBP (Tata box Binding Protein) and TFRC (Transferrin Receptor) for the small intestine and TBP and cyclophilin for the liver, and expressed as means $\pm$ SEM.

Western Blots

Mice intestinal mucosa and liver were homogenized, and 75 μ g of extracted proteins were resolved on NuPAGE 4–12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen, ThermoFisher, St Herblain, France) under reducing conditions for western blot analysis, as described elsewhere ¹⁵. Antibodies used are listed in the Major Resources Table. Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

PCSK9 protein levels quantification

Plasma, hepatic and intestinal PCSK9 were measured using a commercially available ELISA kit (R&D Duoset PCSK9 mouse, Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France). Samples from plasma, liver and small intestinal homogenates were respectively diluted 50, 1500 and 20 times in PBS and we next followed the provided kit instructions.

In situ hybridization

Female and male were bred together for one night and separated at 8 am the next morning. After eighteen days, pregnant females were killed and their embryos were harvested. Embryos were washed in PBS at 4°C, placed in OCT (Tissue-Tek) and frozen in dry ice-cold isopentane. Mouse sense and antisense cRNA probes coding for mouse PCSK9 ¹⁶ were labeled with [³⁵S]-UTP. Whole mouse cryosections (8 – 10 μ m) obtained at day 18 after pregnancy (E18) were fixed for 1 h in 4% formaldehyde and hybridized overnight at 55°C. For autoradiography, the sections were dipped in photographic emulsion (NTB-2; Kodak), exposed for 12 days, developed in D19 solution (kodak), and stained with thionin.

Statistical analyses

Values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical significance was determined using a Mann & Whitney test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

RESULTS

Circulating PCSK9 inhibition alters postprandial lipemia in a LDLR-dependent manner

To determine the functional importance of circulating PCSK9 on PPL, we injected *Pcsk9*^{+/+} mice with a single subcutaneous injection of vehicle or human PCSK9 monoclonal anti-antibody (mAb) (alirocumab, 10mg/kg) to capture circulating PCSK9. As an additional control, we used *Pcsk9*^{-/-} mice injected with vehicle. Three days after injection, we collected plasma samples and assessed plasma cholesterol concentrations. Alirocumab reduced plasma cholesterol levels in *Pcsk9*^{+/+} mice by 20% compared to vehicle, while the total loss of PCSK9 (*Pcsk9*^{-/-}) led to a 36% reduction (**Figure 1A**). In contrast, alicumab treatment reduced PPL almost to the same extent as the absence of PCSK9 (**Figure 1B**).

Given that PCSK9's main function is to regulate the LDLR expression, we then verified whether the effect of alicumab on PPL was LDLR-dependent. Confirmatory of an LDLR-dependent effect, the administration of alicumab to *Ldlr*^{-/-} mice did not alter neither plasma cholesterol concentrations nor PPL (**Figures 1C-D**). To further consolidate the role of circulating PCSK9 in the regulation of PPL, we overexpressed human PCSK9 in *Pcsk9*^{-/-} mice using an adenoviral construction. As expected, human PCSK9 overexpression in the liver led to: i) the appearance of liver-derived human PCSK9 in the circulation (**Figure 2A**); ii) higher plasma cholesterol levels (**Figure 2B**); and 3) a loss of hepatic LDLR expression (**Figure 2C**). In addition, we show that hepatic human PCSK9 in *Pcsk9*^{-/-} mice increases PPL to a similar extent as observed in *Ldlr*^{-/-} mice (**Figure 2D**).

Taken together, these results demonstrate that liver-derived circulating PCSK9 is a critical regulator of PPL.

Intestinal PCSK9 deletion does not alter metabolic homeostasis and postprandial lipemia

In order to decipher the role of intracellular intestinal PCSK9 in lipoprotein metabolism, we generated a mouse model with a specific inactivation of *Pcsk9* in intestinal epithelial cells (*i-Pcsk9*^{-/-} mice). These mice were obtained by breeding *Pcsk9*^{fl/fl} mice⁸ with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the murine villin promoter¹³. We observed that *Pcsk9* mRNA levels were strongly reduced in the medial and distal intestinal segments of *i-Pcsk9*^{-/-} mice compared to *Pcsk9*^{fl/fl} control mice (**Figure 3A**), while hepatic *Pcsk9* mRNA expression remained unaltered (**Figure 3B**). *In situ* hybridization performed in mouse embryos of 18 days of age and using a *Pcsk9* probe confirmed these results by showing a disappearance of labeling only in the small intestine of *i-Pcsk9*^{-/-} mice (**Figure 3C**). Finally, PCSK9 protein content was undetectable along the intestinal tract of *i-Pcsk9*^{-/-} mice (**Figure 3D**) but remained unchanged in the liver (**Figure 3E**), as measured by ELISA. Altogether, these results validate our mouse model of intestinal PCSK9 deficiency.

We next metabolically phenotyped the *i-Pcsk9*^{-/-} mice to assess the consequences of the absence of PCSK9 in the intestinal epithelial cells. First, we measured body weight, plasma glucose, cholesterol, TG and PCSK9 concentrations during a fasting-refeeding experiment in *i-Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{fl/fl} control mice. As summarized in **Figure 4**, none of these parameters were significantly altered between *i-Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{fl/fl} control mice. To further reveal a potential metabolic phenotype, we challenged the mice by performing: i) an ageing experiment (over 52 weeks old); ii) a high-fat diet intervention (60% Kcal from fat); and iii) a statin-enriched diet intervention, since *Pcsk9*^{-/-} mice are known to be more sensitive to statins than wild-type mice¹⁷. However, even under these pathophysiological conditions, we failed to detect any metabolic differences between *i-Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{fl/fl} mice (*data not shown*). Finally, there was no significant change in plasma TG following an oral olive oil gavage between *i-Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{fl/fl} mice (**Figure 4F**), indicating that intestinal PCSK9 is not required for the regulation of PPL. In accordance with these findings, there were no significant changes in the mRNA expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) and other lipogenic genes in the small intestine of *i-Pcsk9*^{-/-} compared to *Pcsk9*^{fl/fl} mice (**Supplemental Table 1**).

Circulating PCSK9 inhibition protects mice against diabetes-induced postprandial lipemia

As previously mentioned, an exacerbated PPL is frequently observed in patients with diabetes¹⁸. To determine whether PCSK9 inhibition might improve PPL in diabetes setting, we used the STZ-induced insulinopenic mouse model of diabetes, known to develop a strong hypertriglyceridemic response following an olive oil gavage¹⁹.

In a first set of experiments, we injected a single intraperitoneal dose of a vehicle solution or a high dose of STZ (150mg/kg) into *Pcsk9*^{+/+} and *Pcsk9*^{-/-} mice. As expected, 4 days after the injection, STZ induced a strong and comparable hyperglycemia in *Pcsk9*^{+/+} and *Pcsk9*^{-/-} mice (**Figure 5A**). STZ treatment strongly increased PPL in *Pcsk9*^{+/+} mice. STZ also increased PPL in *Pcsk9*^{-/-} mice but to a lesser extent. Indeed, PPL in STZ treated *Pcsk9*^{-/-} mice is similar to vehicle-injected *Pcsk9*^{+/+} mice¹⁰ (**Figure 5B**). Thus, PCSK9 deficiency efficiently protected mice from diabetes-induced exacerbated PPL (**Figure 5B**).

In a second set of experiments, we assessed the effect of alirocumab in STZ-treated *Pcsk9*^{+/+} mice. While the inhibition of circulating PCSK9 did not alter the effect of STZ on blood glucose levels (**Figure 5C**), it significantly reduced plasma cholesterol levels (-42%; **Figure 5D**). In agreement with the above data (**Figure 1B**), alirocumab treatment also drastically reduced PPL in STZ-treated mice (-47%; **Figure 5E**). Finally, intestinal-PCSK9 deficiency did not protect against the exacerbated PPL induced by STZ (**Figure 5F&G**).

Taken together, these data demonstrate that the inhibition of circulating PCSK9 might reduce the exacerbated PPL observed in the context of diabetes.

DISCUSSION

The present study provides important insights into the role of PCSK9 in PPL regulation. By generating the first intestine-specific PCSK9 knockout mouse model, we demonstrate that the intracellular intestinal form of PCSK9 is not required for the regulation of lipoprotein metabolism. In contrast, liver-derived plasma PCSK9 is a key regulator of PPL. Indeed, hepatic PCSK9 overexpression leads to increased plasma PCSK9 levels and an exacerbated PPL. Conversely, blocking the circulating form of PCSK9 with a PCSK9 mAb (*i.e.* alirocumab) reduces PPL. Circulating PCSK9 controls PPL *via* its canonical effect on LDLR protein levels, since its effect is abolished in LDLR-deficient mice. Finally, this study shows for the first time that PCSK9 inhibition efficiently protects mice from the exacerbated PPL observed during diabetes.

Although the expression of PCSK9 was reported to be substantial in the small intestine of rats in the seminal paper of Seidah et al¹⁶, its physiological role in this organ has remained largely unknown. In humans, immunohistochemistry shows that PCSK9 is localized in enterocytes and goblet cells in jejunal and ileal biopsies¹⁰. It was also reported that in obese patients undergoing bariatric surgery PCSK9 protein expression was lower in the duodenum of insulin-resistant subjects compared to insulin-sensitive ones²⁰. In accordance with its role in hepatocytes, PCSK9 downregulates intestinal LDLR expression in CaCo-2 cells¹¹ and in the murine intestine¹⁰.

Following an olive oil gavage, *Pcsk9*^{-/-} mice display a blunted PPL compared to their wild-type littermates. We previously showed that this phenotype is not attributable to a defect in fat absorption, gastric emptying or intestinal transit kinetics¹⁰. Studies performed in CaCo-2 cells suggested a decreased enterocytic apoB48 secretion following PCSK9 knock-down. However, although an upregulation of MTTP has been implicated, the underlying molecular mechanism remains largely unknown¹⁰⁻¹². Importantly, the analysis of our *i-Pcsk9*^{-/-} mice clearly demonstrates that intestinal PCSK9 is not involved in the regulation of plasma lipids levels and PPL. Moreover, MTTP mRNA expression is not altered in the small intestine of *i-Pcsk9*^{-/-} mice. Although we cannot rule out the existence of compensatory mechanisms in the *i-Pcsk9*^{-/-} mice, such mechanisms have not been observed in liver-specific *Pcsk9*^{-/-} mice that display a pronounced hypocholesterolemic phenotype⁸. Nevertheless, additional studies are

needed to further decipher the function of intestinal PCSK9 beyond the regulation of lipoprotein metabolism.

By using complementary experimental approaches, we show that liver-derived plasma PCSK9 is key for the regulation of PPL in mice. Firstly, alirocumab greatly reduced PPL in wild-type mice to a similar extent as total *Pcsk9*^{-/-} mice. Interestingly, the effect of alirocumab on PPL is even further exacerbated in the STZ mouse model of diabetes. Secondly, the hepatic overexpression of human PCSK9 in wild-type mice markedly increased PPL. Using *in vivo* kinetic studies, we previously demonstrated that *Pcsk9*^{-/-} mice have an increased ability to clear their own chylomicrons compared to wild-type mice¹⁰. Taken together, these data suggest that PCSK9 deficiency reduces PPL by increasing the clearance of TRL rather than decreasing intestinal CM production. Chylomicron remnants and VLDL remnants are cleared from the circulation by the liver via their binding to the LDLR, the related LRP1 and LRP5, or syndecan-1 through ApoB or ApoE binding^{21, 22}. Although PCSK9 can downregulate the expression of LRP1²³ we demonstrated here that the LDLR is required for mediating the effect of PCSK9 on PPL. Indeed, alirocumab failed to reduce PPL in *Ldlr*^{-/-} mice, indicating that the hepatic catabolism of TRL mainly involves the LDLR pathway.

Importantly, our findings in mice are in accordance with recent clinical data exploring the link between PCSK9 and PPL regulation in humans. An observational study conducted in 17 obese patients who received an oral fat load highlighted a positive association between plasma PCSK9 levels and the postprandial area-under-the-curve for apoB48, with a negative correlation between circulating PCSK9 and the TRL-apoB48 fractional catabolic rate²⁴. Genetic data also support a role of PCSK9 in PPL. Indeed, a Canadian study demonstrated that subjects harboring PCSK9 loss-of-function variants display blunted PPL after an oral fat load with reduced postprandial total apoB (-17%), apoB48 (-23%), and TG (-18%) levels compared to non-carrier controls²⁵. Interventional studies also investigated the effect of PCSK9 inhibition with PCSK9 mAb (alirocumab and evolocumab) on PPL. In healthy normolipidemic subjects, *in vivo* lipoprotein kinetic studies with stable isotopes consistently showed that neither alirocumab²⁶ nor evolocumab²⁷ alter post-prandial plasma TG concentrations and apoB48 metabolism. Interestingly, the effect of PCSK9 inhibition on PPL is dependent on the metabolic status. In patients with type 2 diabetes, the randomized, placebo-controlled BANTING study demonstrated that evolocumab significantly reduced chylomicron TG, chylomicron cholesterol and VLDL-cholesterol after a mixed-meal test²⁸. In addition, Taskinen et al. showed that evolocumab treatment reduced postprandial rises in both plasma TG (-21%), apoB48 (-17%), VLDL₁ triglycerides (-15%) and remnant particles (-29%) in a small non-randomized study conducted in 15 patients with type 2 diabetes receiving a stable dose of metformin and atorvastatin (20 mg/day). In contrast, evolocumab did not alter the production and the release of chylomicrons from the small intestine²⁹. Similar findings have been reported by Burggraaf et al. with alirocumab in patients with type 2 diabetes under insulin therapy³⁰.

In conclusion, our data in mice clearly demonstrate that liver-derived circulating PCSK9 regulates PPL by controlling the catabolism of TRL particles in a LDLR-dependent manner. In accordance with recent interventional studies in human, these data suggest that blocking circulating PCSK9 with PCSK9 mAb represents an efficient strategy to reduce increased PPL, a situation frequently observed in patients with type 2 diabetes. Thus, PCSK9 inhibition might protect against ASCVD beyond its canonical effect on LDL-C lowering.

Acknowledgments

We thank Dr. Sylvie Robine for providing the Villin-Cre mice. The authors would like to acknowledge the help of Edwige Marcinkiewicz during *In Situ* hybridization experiment.

Sources of funding

This study was supported by a grant from the Fondation Leducq (#13CVD03) ; by a funding from Pfizer ASPIRE Cardiovascular Competitive Research Grants Program 2015 (*Respective roles of intestinal and hepatic PCSK9 on triglyceride rich lipoprotein metabolism*) ; by two grants funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0025-01: INT2 PCSK9; ANR-16-RHUS-0007: French national project CHOPIN). DG is a recipient of a scholarship from the « Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ».

Disclosures

B.C. has received research funding from Amgen and Sanofi and Regeneron Pharmaceuticals Inc outside of the present work; and has served on scientific advisory boards and received honoraria or consulting fees from Amgen, Regeneron and Sanofi. The other authors declare no conflict of interest.

References

1. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Boren J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ and Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38:2459-2472.
2. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P and Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting Triglycerides and Risk of Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, and Death in Men and Women. *JAMA*. 2007;298:299-308.
3. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Frank MS and Ridker PM. Fasting Compared With Nonfasting Triglycerides and Risk of Cardiovascular Events in Women. *JAMA*. 2007;298:309-316.
4. Lambert JE and Parks EJ. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1821:721-6.
5. Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:3247-59.
6. Hiyoshi T, Fujiwara M and Yao Z. Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes. *J Biomed Res*. 2017.
7. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C and Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev*. 2017;69:33-52.
8. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG and Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2008;48:646-54.
9. Cariou B, Si-Tayeb K and Le May C. Role of PCSK9 beyond liver involvement. *Current opinion in lipidology*. 2015;26:155-61.
10. Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, Collet X, Kuipers F, Krempf M, Cariou B and Costet P. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:684-90.
11. Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, Sane AT, Garofalo C, Grenier E, Emonnot L, Yara S, Couture P, Beaulieu JF, Menard D, Seidah NG and Elchebly M. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 2013;227:297-306.

12. Rashid S, Tavori H, Brown PE, Linton MF, He J, Giunzioni I and Fazio S. 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*. 2014;130:431-41.
13. el Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D and Robine S. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 2004;39:186-93.
14. Lallanne F, Lambert G, Amar MJ, Chetiveaux M, Zair Y, Jarnoux AL, Ouguerram K, Friburg J, Seidah NG, Brewer HB, Jr., Krempf M and Costet P. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res*. 2005;46:1312-9.
15. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, Hussain MM, Collet X, Cariou B and Costet P. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:1484-93.
16. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A and Chretien M. 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*. 2003;100:928-33.
17. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA and Horton JD. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:5374-9.
18. Taskinen MR and Boren J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2015;239:483-95.
19. Willecke F, Scerbo D, Nagareddy P, Obunike JC, Barrett TJ, Abdillahi ML, Trent CM, Huggins LA, Fisher EA, Drosatos K and Goldberg IJ. Lipolysis, and not hepatic lipogenesis, is the primary modulator of triglyceride levels in streptozotocin-induced diabetic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:102-10.
20. Veilleux A, Grenier E, Marceau P, Carpentier AC, Richard D and Levy E. Intestinal lipid handling: evidence and implication of insulin signaling abnormalities in human obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:644-53.
21. Foley EM, Gordts P, Stanford KI, Gonzales JC, Lawrence R, Stoddard N and Esko JD. Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:2065-74.
22. Dijk W, Le May C and Cariou B. Beyond LDL: What Role for PCSK9 in Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2018;29:420-434.
23. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A and 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;8:e64145.
24. Chan DC, Wong AT, Pang J, Barrett PH and Watts GF. Inter-relationships between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, apolipoprotein C-III and plasma apolipoprotein B-48 transport in obese subjects: a stable isotope study in the postprandial state. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:379-85.
25. Ooi TC, Krysa JA, Chaker S, Abujrad H, Mayne J, Henry K, Cousins M, Raymond A, Favreau C, Taljaard M, Chretien M, Mbikay M, Proctor SD and Vine DF. The Effect of PCSK9 Loss-of-Function Variants on the Postprandial Lipid and ApoB-Lipoprotein Response. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:3452-3460.
26. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, Holleran S, Ramakrishnan R, Karmally W, Nandakumar R, Fontanez N, Obunike J, Marcovina SM, Lichtenstein AH, Matthan NR, Matta J, Maroccia M, Becue F, Poitiers F, Swanson B, Cowan L, Sasiela WJ, Surks HK and Ginsberg HN. Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation*. 2017;135:352-362.

27. Chan DC, Watts GF, Somaratne R, Wasserman SM, Scott R and Barrett PHR. Comparative Effects of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) Inhibition and Statins on Postprandial Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38:1644-1655.
28. Rosenson RS, Daviglius ML, Handelsman Y, Pozzilli P, Bays H, Monsalvo ML, Elliott-Davey M, Somaratne R and Reaven P. Efficacy and safety of evolocumab in individuals with type 2 diabetes mellitus: primary results of the randomised controlled BANTING study. *Diabetologia*. 2019;62:948-958.
29. Taskinen MR, Bjornson E, Andersson L, Kahri J, Porthan K, Matikainen N, Soderlund S, Pietilainen K, Hakkarainen A, Lundbom N, Nilsson R, Stahlman M, Adiels M, Parini P, Packard C and Boren J. Impact of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition with evolocumab on the postprandial responses of triglyceride-rich lipoproteins in type II diabetic subjects. *Journal of clinical lipidology*. 2019.
30. Burggraaf B, Pouw NMC, Arroyo SF, van Vark-van der Zee LC, van de Geijn GM, Birnie E, Huisbrink J, van der Zwan EM, Mulder MT, Rensen PCN, de Herder WW and Cabezas MC. A placebo-controlled proof-of-concept study of alirocumab on postprandial lipids and vascular elasticity in insulin-treated patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2020.

Highlights

- Inhibition of plasma PCSK9 regulates postprandial lipemia in a LDLR-dependent manner
- Intestinal PCSK9 deficiency does not alter lipid, glucose homeostasis and postprandial lipemia
- PCSK9 deficiency or inhibition reduces postprandial lipemia in the context of diabetes

Legends

Figure 1: Alirocumab treatment reduces postprandial lipemia in a LDLR-dependent manner. *Pcsk9*^{+/+} (n=10) and *Pcsk9*^{-/-} mice (n=13) received a single subcutaneous injection of vehicle (saline solution) and *Pcsk9*^{+/+} mice (n=10) a subcutaneous administration of PCSK9 mAb (Alirocumab, 10mg/kg). Three days later, A) Plasma cholesterol levels were assessed after the overnight fasting and before the postprandial lipemia test. B) Plasma triglyceride concentrations were determined at 0, 1, 2 and 4 hours after the olive oil gavage, (Right panel represents area under the curve). In a second set of experiment, *Ldlr*^{+/+} and *Ldlr*^{-/-} mice (n=8 per group) received a single subcutaneous injection of vehicle (saline solution) or PCSK9 mAb (Alirocumab, 10mg/kg). C) Plasma cholesterol levels and D) Plasma triglycerides were measured as described above. Results are expressed as means ± SEM. Statistical significance was evaluated using Mann & Whitney test, ns: non-significant; * P<0,05, **P<0,01; ***P<0,001.

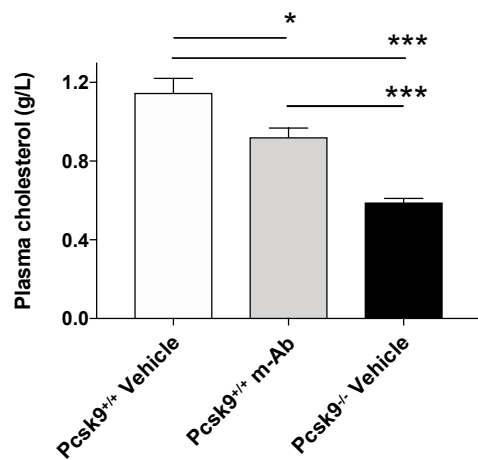
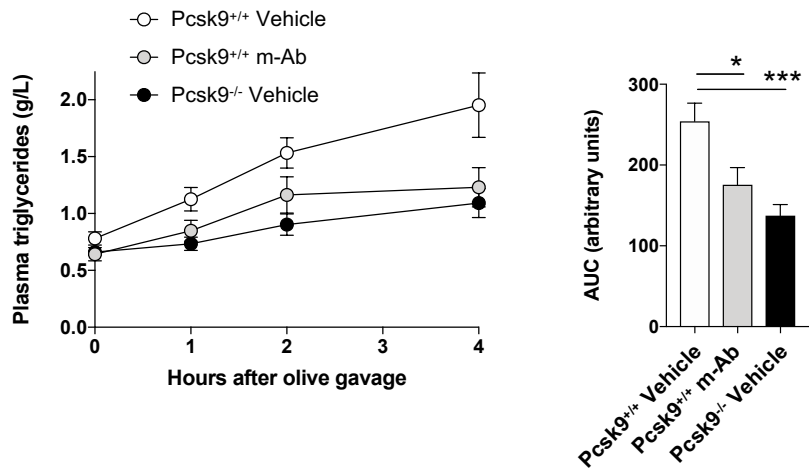
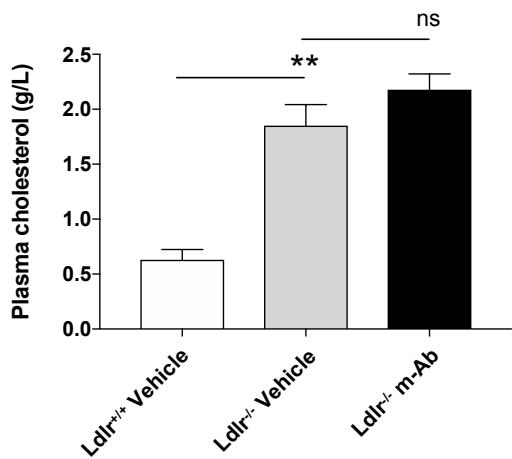
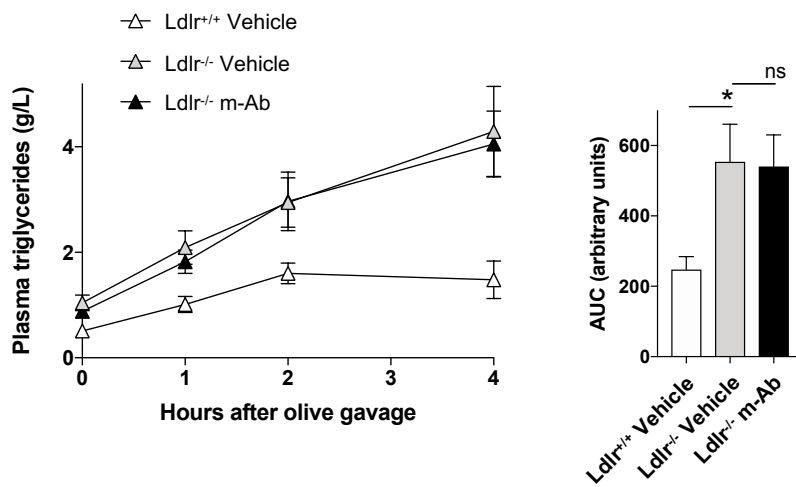
Figure 2: Adenoviral overexpression of PCSK9 reduces hepatic LDLR protein content and strongly increases postprandial lipemia. A) Plasma cholesterol, B) Plasma human PCSK9 levels, C) Hepatic LDLR, PCSK9 and alpha-tubulin expression assessed by Western-blot analysis and D) postprandial lipemia measurement in vehicle treated *Pcsk9*^{-/-} mice (n=5), human PCSK9 adenovirus treated *Pcsk9*^{-/-} mice (n=5) or vehicle treated *Ldlr*^{-/-} mice (n=5). Statistical analyses were performed using Mann & Whitney test, *P<0,05, **P<0,01.

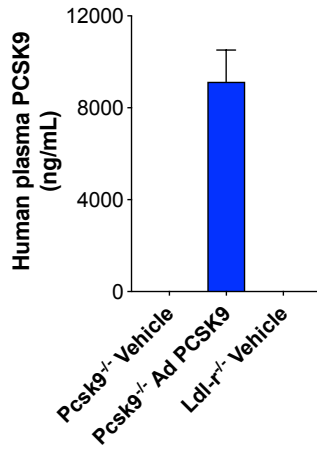
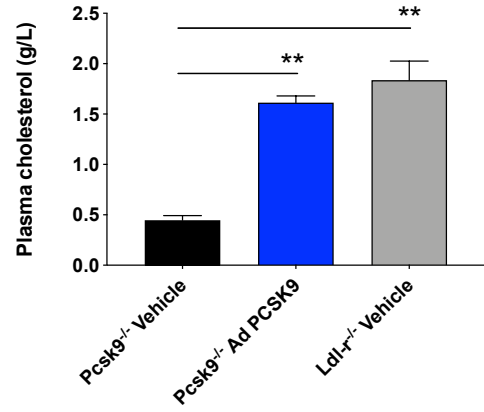
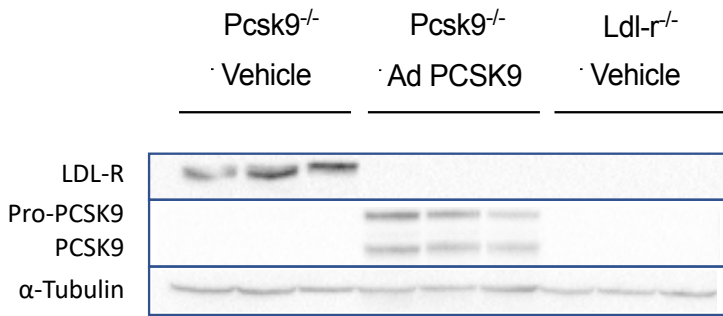
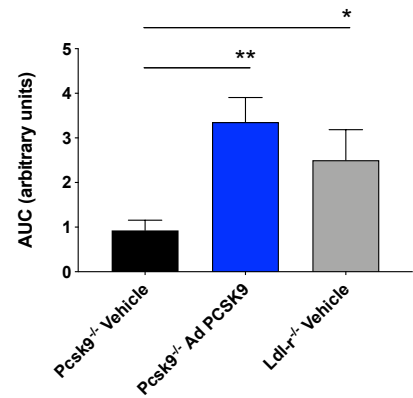
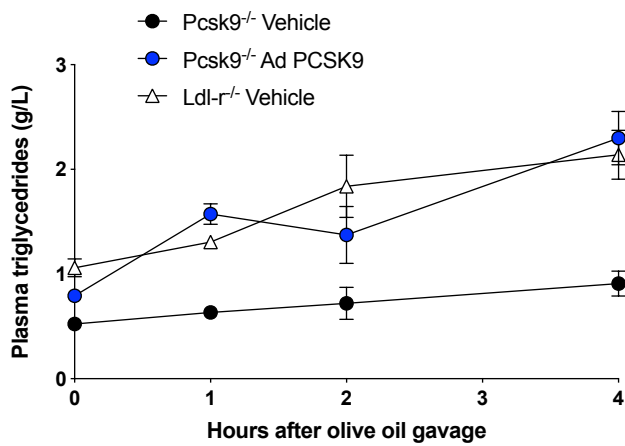
Figure 3: Intestinal PCSK9 expression is deeply repressed in intestinal PCSK9-deficient mouse. mRNA levels of *Pcsk9* in A) the small intestine or B) the liver of *Pcsk9^{fl/fl}* (n=7) and *i-Pcsk9^{-/-}* mice (n=7). C) *In situ* hybridization of *Pcsk9* mRNA performed on 18 day-old *Pcsk9^{fl/fl}* (left panels) and *i-Pcsk9^{-/-}* embryos (right panels). Autoradiography and thionin staining were performed successively on the same slide. D) Intestinal and E) hepatic PCSK9 protein levels in *Pcsk9^{fl/fl}* (n=6) and *i-Pcsk9^{-/-}* (n=5) mice were measured by ELISA. Data are expressed as means $\pm$ SEM, and were analyzed using non parametric Mann & Whitney test, ns: non-significant, **P<0,01, ***P<0,001.

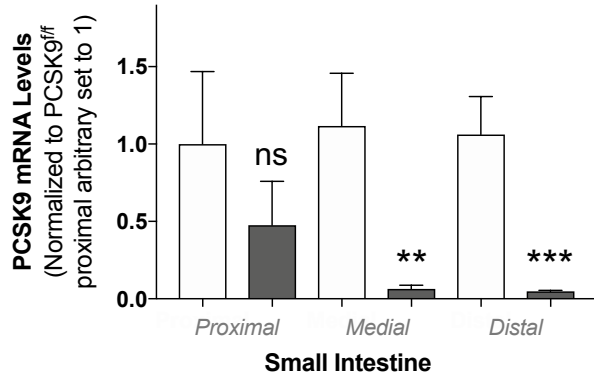
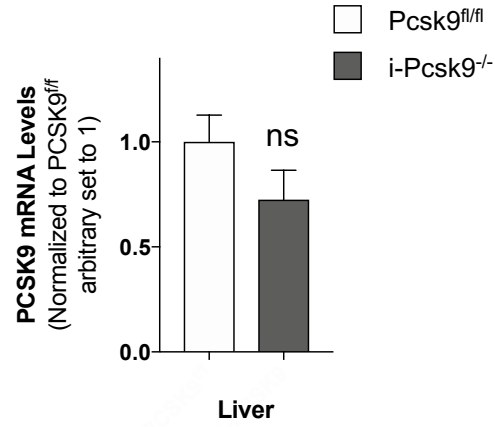
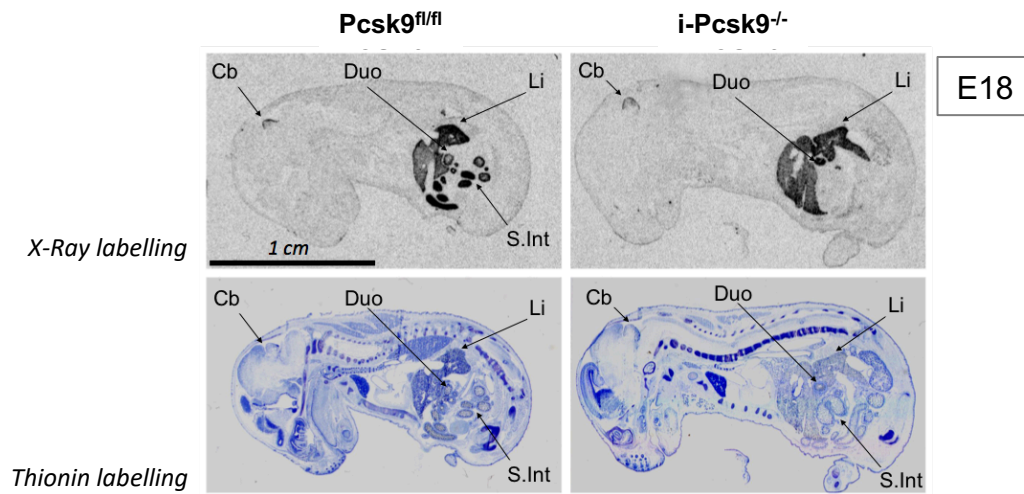
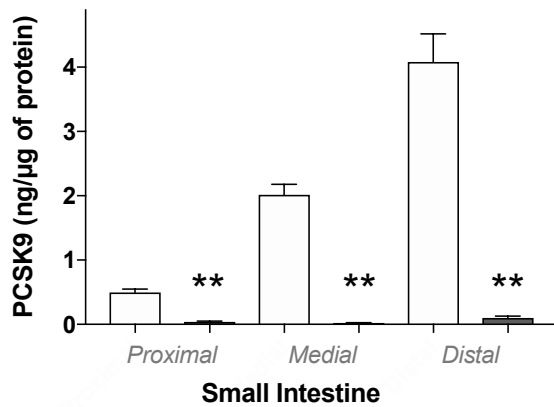
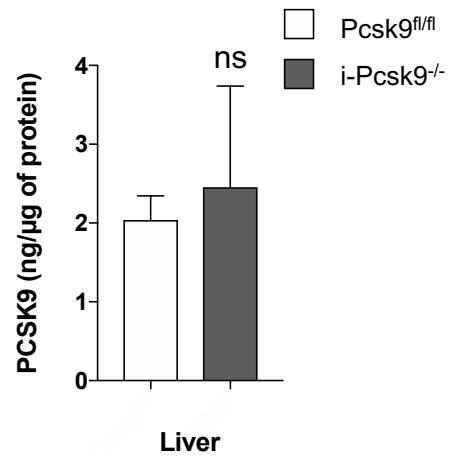
Figure 4: Intestinal PCSK9 deficiency does not alter glucose nor lipid homeostasis in mouse. A) Body weight, B) Blood glucose, C) Plasma cholesterol, D) Plasma PCSK9 and E) Plasma triglycerides were measured in random fed condition, after 24 hours of fasting and 1, 2, 4, 6 and 24 hours following the refeeding period in *Pcsk9^{fl/fl}* (n=18) and *i-Pcsk9^{-/-}* mice (n=19). F) Postprandial lipemia was measured in 14h fasted *Pcsk9^{fl/fl}* and *i-Pcsk9^{-/-}* mice (n=10 per group). Statistical significance was assessed using Mann & Whitney test

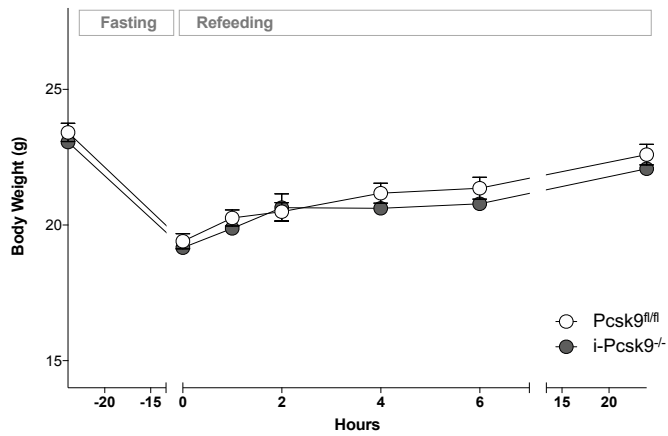
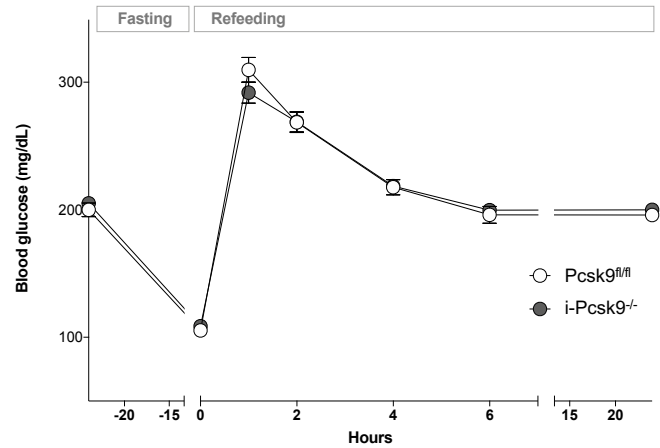
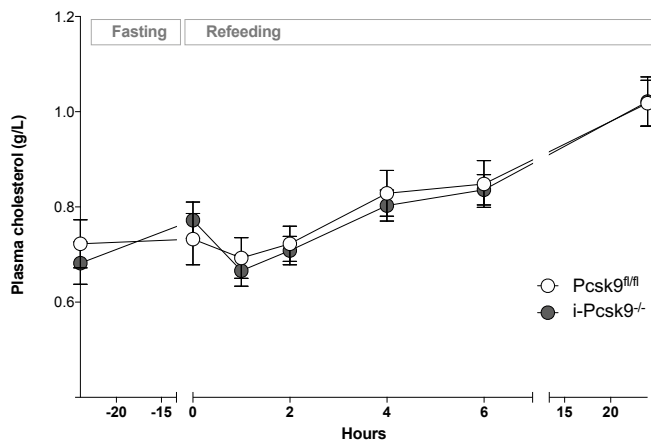
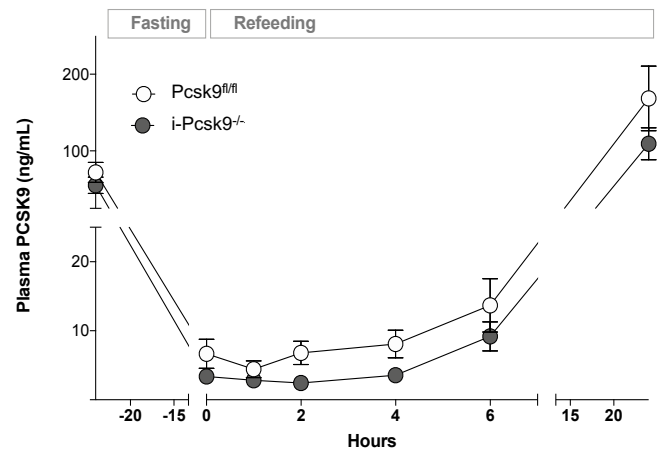
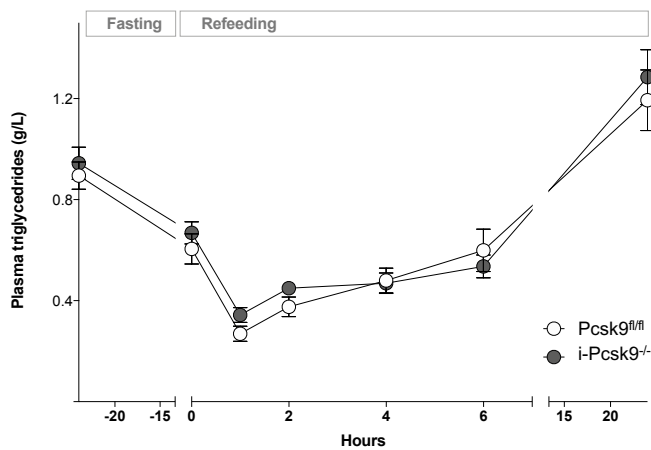
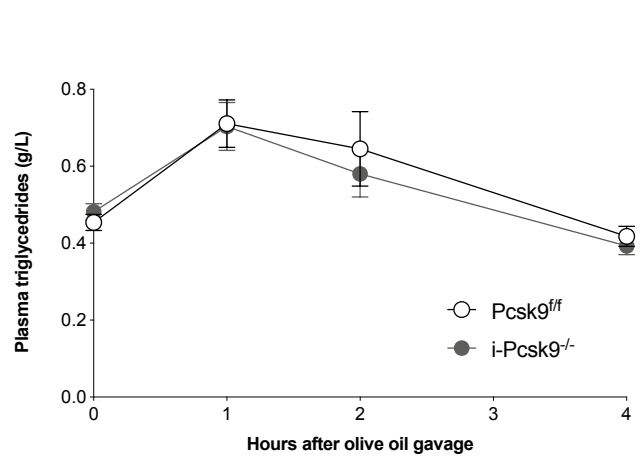
Figure 5: PCSK9 deficiency and inhibition decrease postprandial lipemia in streptozotocin-induced diabetes model. 12 hours fasted *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice received an intraperitoneal injection of vehicle (citrate buffer, *Pcsk9^{+/+}* n=12; *Pcsk9^{-/-}* n=11) or 150 mg/kg streptozotocin (*Pcsk9^{+/+}* n=11; *Pcsk9^{-/-}* n=9). Five days later, we measured A) blood glucose levels, B) Plasma triglyceride levels 0, 1, 2 and 4 hours after the olive oil gavage (right panel represents area under the curve). Data are represented as scatter plot and means $\pm$ SEM, and were analyzed using non parametric Mann & Whitney test, *** P<0,001. 12 hours fasted C57BL/6J mice received an intraperitoneal injection or 150 mg/kg streptozotocin. Two days later, mice received a subcutaneous injection of vehicle (n=10) or 10 mg/kg of monoclonal anti-PCSK9 antibody. At day 5, we measured C) Blood glucose, D) Plasma cholesterol and E) Plasma triglyceride levels at 0, 1, 2 and 4 hours after an olive oil challenge (Right panel represents area under the curve). Values are means $\pm$ SEM, and were analyzed using non parametric Mann & Whitney test, ** P<0,01; *** P<0,001. 12 hours fasted *Pcsk9^{fl/fl}* and *i-Pcsk9^{-/-}* mice received an intraperitoneal injection of vehicle (citrate buffer, *Pcsk9^{fl/fl}* n=5) or 150 mg/kg streptozotocin (*Pcsk9^{fl/fl}* n=6; *i-Pcsk9^{-/-}* n=5). Five days later, we measured A) blood glucose levels, B) Plasma triglyceride levels 0, 1, 2 and 4 hours after the olive oil gavage (Right panel represents area under the curve). Data are means $\pm$ SEM, and were analyzed using non parametric Mann & Whitney test, ns: non-significant.

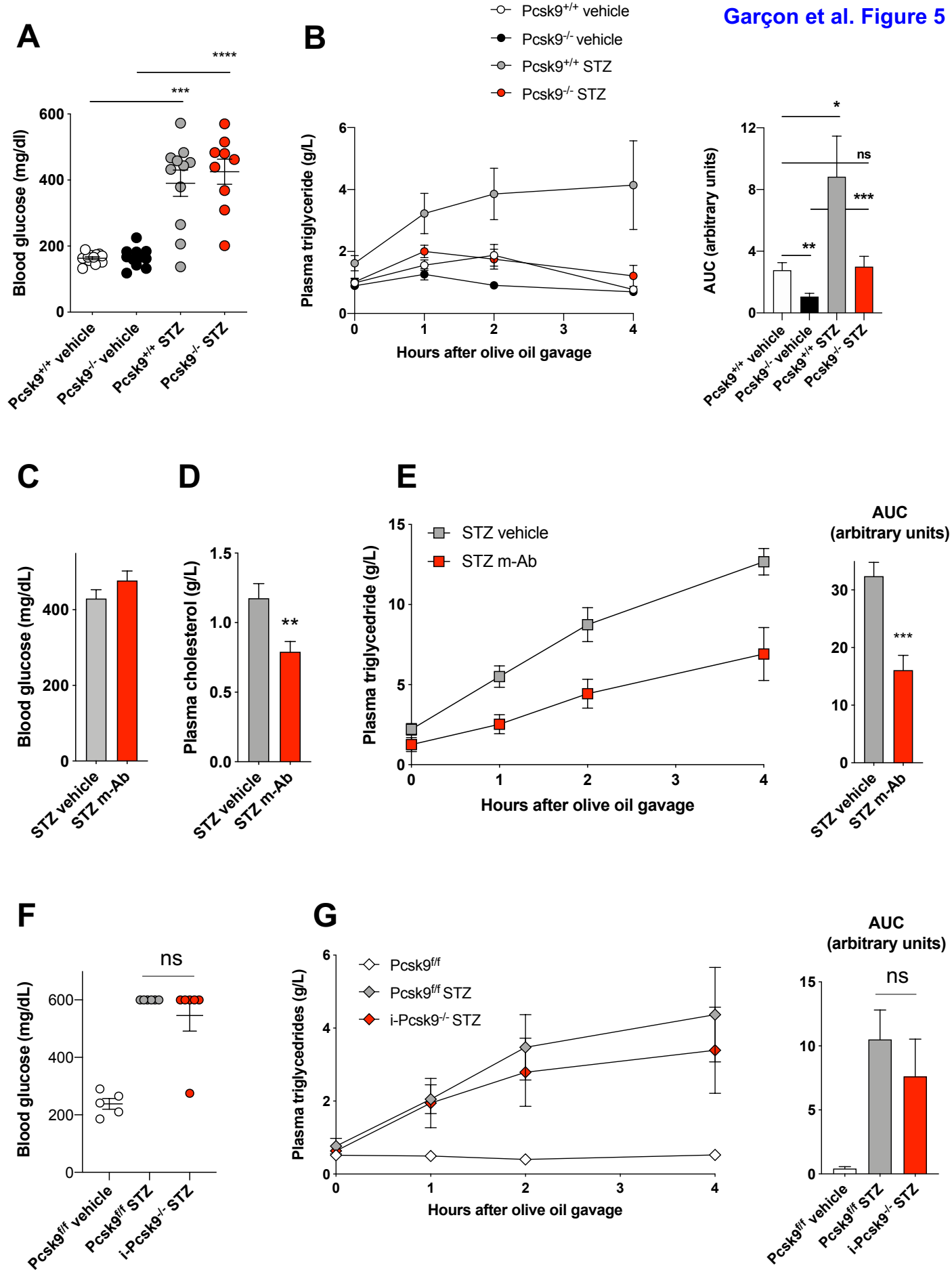
Supplemental Table 1: Intestinal gene expression in *Pcsk9^{fl/fl}* and *i-Pcsk9^{-/-}* mice. mRNA levels were measured from proximal, medial and distal intestinal mucosa of *Pcsk9^{fl/fl}* and *i-Pcsk9^{-/-}* mice (n=5–7 per group). For each intestinal segment, data were normalized with values obtained in control *Pcsk9^{fl/fl}* intestinal mucosa arbitrarily set to 1. Values represent mean $\pm$ SEM, were analyzed using Mann & Whitney test and bolded if P<0.05.

A

B

C

D


A

B

C

D


A

B

C

D

E


A**B****C****D****E****F**



	<i>Proximal intestine</i>				<i>Medial intestine</i>				<i>Distal intestine</i>			
	<i>Pcsk9^{fl/fl} mice</i>		<i>i-Pcsk9^{-/-} mice</i>		<i>Pcsk9^{fl/fl} mice</i>		<i>i-Pcsk9^{-/-} mice</i>		<i>Pcsk9^{fl/fl} mice</i>		<i>i-Pcsk9^{-/-} mice</i>	
	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>
Cre	0,00	0,00	1,00	0,19	0,00	0,00	1,00	0,11	0,00	0,00	1,00	0,09
Pcsk9	1,00	0,47	0,48	0,28	1,00	0,30	0,06	0,02	1,00	0,23	0,05	0,01
Ldlr	1,00	0,28	0,65	0,12	1,00	0,19	0,32	0,03	1,00	0,09	0,80	0,05
Srebp2	1,00	0,27	0,65	0,09	1,00	0,22	0,27	0,03	1,00	0,21	0,81	0,11
Hmgcoar	1,00	0,08	0,98	0,12	1,00	0,11	0,58	0,09	1,00	0,12	0,76	0,06
Abcg5	1,00	0,20	0,61	0,10	1,00	0,14	0,46	0,07	1,00	0,07	1,02	0,05
Abcg8	1,00	0,22	0,90	0,13	1,00	0,17	0,34	0,06	1,00	0,13	0,78	0,11
Mtp	1,00	0,10	0,98	0,10	1,00	0,12	1,24	0,14	1,00	0,19	0,66	0,05
Fas	1,00	0,12	1,01	0,12	1,00	0,07	0,68	0,18	1,00	0,30	0,37	0,07
Dgat2	1,00	0,11	1,32	0,12	1,00	0,07	0,86	0,08	1,00	0,26	0,58	0,04
Apob	1,00	0,07	0,69	0,10	1,00	0,13	0,91	0,26	1,00	0,33	0,93	0,08
Npc1l1	1,00	0,18	0,59	0,11	1,00	0,08	0,81	0,21	1,00	0,47	0,99	0,08

Article 2 : PCSK9 deficiency and inhibition protect against food allergy symptoms

Cette étude visait à déterminer l'effet de PCSK9 sur l'allergie alimentaire. En effet, fort de notre expérience sur l'intestin, nous avons voulu déterminer si le rôle extra-hépatique de PCSK9 dépasse sa fonction canonique sur le métabolisme du cholestérol. Pour cela, nous avons mené cette étude en collaboration avec l'équipe du Professeur Antoine Magnan et du Docteur Grégory Bouchaud spécialiste des allergies respiratoires et alimentaires.

Le principal enjeu de ce travail a été, dans un premier temps, d'établir un lien entre PCSK9 et l'allergie alimentaire. Nous avons utilisé les souris *Pcsk9*^{-/-} et les avons rendus allergiques alimentaires grâce à des injections intrapéritonéales d'une solution de gliadine de blé couplée à un adjuvant (aluminium) [385]. La mesure de certains paramètres macroscopiques communément retrouvés dans les modèles d'allergie alimentaire comme une augmentation du temps de transit et l'apparition d'un œdème auriculaire ont permis d'apprécier l'apparition de l'allergie alimentaire.

Nos résultats montrent que les souris *Pcsk9*^{-/-} une heure après le challenge ne présentent pas de gonflement des oreilles contrairement aux souris sauvages allergiques. De plus, le temps de transit n'est pas augmenté chez les souris *Pcsk9*^{-/-} après induction de l'allergie. Au niveau cellulaire, la récupération des ganglions mésentériques et de la rate une heure après le challenge, nous a permis de mesurer les populations de lymphocytes T et B par cytométrie en flux. Chez les souris sauvages allergiques, nous retrouvons une augmentation des populations des lymphocytes pro-inflammatoires Th2 et Th17 ainsi qu'une augmentation de la présence des plasmocytes B producteurs d'IgE. À l'inverse, les souris *Pcsk9*^{-/-} ne présentent pas

d'augmentation des populations de lymphocytes T (Th2 ou Th17), mais présentent une augmentation des plasmocytes à IgE. Tous ces éléments suggèrent que la déficience en PCSK9 protège de l'allergie alimentaire en empêchant la mise en place de mécanismes visiblement associés aux lymphocytes T.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de PCSK9 par les anticorps anti-PCSK9 sur la survenue de l'allergie alimentaire. Nous avons utilisé le même protocole d'allergisation que chez les souris *Pcsk9*^{-/-}, cette fois les souris, sous fond génétique Balb/c, ont été injectées avec de l'anti-corps anti-PCSK9 (alirocumab) tous les 10 jours du début jusqu'à la fin de l'expérience. Nos résultats avec les anticorps anti-PCSK9 montrent que les souris traitées sont protégées de l'augmentation du temps de transit et de l'œdème auriculaire induit par l'allergie alimentaire. Sur le plan cellulaire, nous montrons que l'inhibition de PCSK9 empêche le développement des lymphocytes Th2 et Th17 alors que, une fois encore, la population des plasmocytes à IgE augmente.

Notre étude montre donc que l'absence ou l'inhibition de PCSK9 protège des symptômes de l'allergie via la modulation des populations pro-inflammatoires lymphocytaires Th2 et Th17.

PCSK9 deficiency and pharmacological inhibition of PCSK9

protect against gliadin induced food allergy

Damien Garçon^{1*}, Martin Klein^{1*}, Victoria Lorant¹, Audrey Ayer¹, Marie-Aude
Cheminant¹, Antoine Magnan¹, Bertrand Cariou¹, Grégory Bouchaud^{1, 2} and Cédric

Le May¹

* Equal contribution

Affiliations : ¹L'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV NANTES, Nantes, France ;

²INRA, UR1268 BIA, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, France.

Abstract

The Proprotein Convertase Subtilisin Kexin of Type 9 (PCSK9) is the third gene involved in familial hypercholesterolemia. It acts as a natural inhibitor of the Low-Density Lipoprotein Receptor by promoting its lysosomal degradation. Beyond this role, several recent publications have displayed that PCSK9 may modulate inflammatory processes involved in atherosclerosis and sepsis. In this context, we have tested the functional role of PCSK9 in food allergy. Indeed, the prevalence of food allergy has been significantly raising for several years and has become a global health issue.

The objective of the present study was to investigate the effect of PCSK9 deficiency or pharmacological PCSK9 inhibition on gliadin induced food allergy (FA).

To test the effect of functional importance of PCSK9 in FA, we used two complimentary mouse models. First, we used full PCSK9 deficient males and females (*Pcsk9*^{-/-} mice, C57Bl6/J genetic background). Secondly, as mice under C57Bl6/J genetic background are relatively resistant to FA induction, we pharmacologically inhibited circulating PCSK9 by performing several alirocumab injection in Balb/c mice (50 mg/kg, every 10 days, first injection after weaning). The FA induction protocol was similar in both mouse models. Mice were fed since weaning with a gliadin free diet. At 5 weeks old, mice received a first sensitization with vehicle (PBS) or deaminated gliadin (DGN) by intraperitoneal injection (10mg). A second and third sensitization were administrated 10 and 20 days later. Finally, mice were challenged twice (7 days and 14 days after the last sensitization) with an oral gavage of water or 20mg DGN and sacrificed 1 hour after the last challenge.

In wild-type mice, the second FA challenge leads to: 1) a significant body weight reduction; 2) a strong allergic edema induced ear thickening; 3) a rise of Th2 lymphocytes percentage in the mesenteric lymph node. By contrast, FA was less

obvious in mouse lacking PCSK9 and in alirocumab-treated mice. We did not observe a strong body weight reduction or ear thickening in FA induced PCSK9^{-/-} mice compared vehicle PCSK9^{-/-} mice after the second allergic challenge nor in alirocumab-treated mice. Finally, mesenteric lymph node Th2 lymphocytes percentage was not induced after FA challenge in PCSK9^{-/-} mice.

Altogether, our results suggest that PCSK9 deficiency and pharmacological inhibition of PCSK9 protect against gliadin induced allergic reactions.

Introduction

Food allergy (FA) is characterized by the absence or failure to develop food tolerance. FA progression can be summarized in two distinct steps: the sensitization and the challenge phases. During sensitization, the appearance of food antigens in the intestinal lumen will induce a signaling cascade emerging from the intestinal epithelial cells and/or from the mucosal immune system that will generate a pro-inflammatory state induced by the production and secretion of cytokine. This context will favor the generation of Th2 lymphocytes and this environment will promote the generation of B-lymphocytes producing allergen-specific IgE. Next, these IgE will bind to their receptor on the surface of mast cells and basophils. Upon re-exposure, the binding of food allergens on IgE present on mast cells and basophils will stimulate the degranulation of pro-inflammatory molecules such as histamine and other cytokines [1]. FA prevalence is increasing over year and become a public health issue [2][3]. Few or no treatment, apart from total eviction, are, nowadays, available for allergic patients. Even if some treatment strategies such as oral immunotherapy are under development, allergic patients should wait several years to have access to it [4]. Thus, the understanding of new pathways involved in FA development or symptom appearance is crucial for patients.

Discovered in 2003 as the third gene involved in familial hypercholesterolemia, the proprotein convertase subtilisin kexin of type 9 (PCSK9) is a natural inhibitor of the Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and a key player in cholesterol homeostasis [5][6]. PCSK9 is strongly expressed by the liver and this organ is the main contributor of the circulating form of PCSK9 in the bloodstream. PCSK9 is also expressed at a lesser extent in the gut, the lung, the brain and the kidneys. Beyond its canonical role

on cholesterol metabolism, several recent studies suggest that PCSK9 can modulate inflammatory responses. Indeed, several independent studies reported that PCSK9 deficiency in mice protect against LPS induced septic shock [7][8]. Furthermore, Gain and Loss of function mutations in PCSK9 gene respectively aggravates or attenuates the cytokine pattern and survival percentage of patients in a context of septic shock [9]. Emerging studies showed that high plasma cholesterol level stimulates adaptive immunity and that these effects can favor atherosclerosis progression and other inflammatory diseases. Indeed, recent data from Ira Tabas' team showed that PCSK9 overexpression in humanized mouse models can disrupt human T cell homeostasis *in vivo* and contribute to T cell-mediated inflammatory diseases [10].

Based on the well-established role of PCSK9 on cholesterol metabolism and the recent data underlying the functional importance of PCSK9 on several immune response, we hypothesize that PCSK9 deficiency or pharmacological inhibition of PCSK9 may protect mice from the deaminated-gliadin induced food allergy.

Material & methods

Animal model

Male and female C57Bl6J mice deficient for PCSK9 (PCSK9^{-/-}), as well as wild-type BALB/c mice were used and housed in a ventilated cage system. All mice had unlimited access to water and food, and followed a 12-hour day/night cycle. The mice were given a diet devoid of wheat gliadins from weaning (3 weeks old) and all along the protocol (Diet 210, SAFE, Augy, France). Five weeks-old mice were sensitized by three intraperitoneal (IP) injection of 10 µg of deaminated-gliadin (DG) in 200 µL of phosphate-buffered saline (PBS) plus aluminum hydroxide (1:1) every 10 days, control

mice were injected only with PBS. Then one week after the last DG injection mice were orally administrated with 20 mg of gliadin in 200 μ L of water. A second challenge was repeated 7 days after, control mice were orally administrated with water only.

The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Pays de Loire (CEEAA).

Transit time and fecal humidity assessment

Mice were placed in individual cages without litter and food. During the first challenge DG/water solution was supplemented with carmine red so mice received a bolus of 40 μ g of carmine red. The time of appearance of the first red feces was noted during the observation in order to evaluate the transit time of each mouse. During the first 2 hours post-challenge all feces were collected in pre-weighed Eppendorf tubes. The weight of "wet" feces was determined by measuring the tubes containing fresh feces. After freezing at -80°C , the water was removed by freeze-drying for 24 hours in a freeze-dryer (SRK System technik). The weight of each tube was measured a third time. The difference in weight between the feces before and after freeze-drying was used to estimate the weight of moisture in the feces.

Intestinal permeability assessment

During the second gliadin challenge DG/water solution was supplemented with 10mg/mL of FITC-dextran (Sigma Aldrich). One hour after the oral administration blood was drawn and the serum was harvested. Paracellular permeability was assessed by measuring the plasma fluorescence emitted by the FITC. In order to achieve the range, the gavage solution was $1/10^6$ diluted with PBS 8 times in cascade. 200 μ L of each sample $1/10^6$ diluted in PBS and range points were deposited on a 96-well darkfield

plate (Thermo Fisher Scientific). The plate was then placed in a VARIOSKAN LUX plate reader spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) where the FITC was excited to 490 nanometers and the emission read at 530 nanometers.

Ear thickness measurement

To assess one allergic macroscopic symptom ear thickness was assessed before and 1 hour after the second challenge with a digital micrometer (Mitutoyo).

Assessment of Triglycerides and Cholesterol

Cholesterol and triglycerides levels were measured using commercially available enzymatic kits (Sobioda, Montbonnot, France).

Flow cytometry analysis

The spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) were removed and mechanically disrupted to obtain a single-cell suspension and filtered using a 40µm mesh. Spleen red blood cells were removed using Red Blood Cell lysis (eBioscience) prior to wash. Then spleen and MLN cells were resuspended in a FACS Buffer solution. BAL, spleen and MLN cells were stained with a lineage cocktail for the following surface markers: CD3 (145-2C11, BioLegend), CD4 (GK1.5, BioLegend), CD25 (PC61, BioLegend), CD8a (53-6.7, BioLegend), CD9 (MZ3, BioLegend), CD19 (1D3/CD19, BioLegend), IgE (R35-72, BD Biosciences), CD49b (DX5, BD Biosciences), IgD (217-170, BD Biosciences) and in the presence of CD16/32 (93, BioLegend) monoclonal antibodies at 1:100. Cells were stimulated for 5 hours with 10 µg/mL of crude deamidated gliadin preparation and with brefeldin A (Golgi plug, BD Biosciences) at 1:1000. Cells were fixed and permeabilized using a Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) and stained

with Gata3 (16E10A23, BioLegend), Foxp3 (MF-14, BioLegend), IL-17A (TC11-18H10.1, BioLegend), IL-10 (JES5-16E3, BioLegend), IL-4 (11B11, BioLegend), IFN γ (XMG1.2, BioLegend) and ROR γ t (Q31-378, BD Biosciences) antibodies at 1:50. The cells were analyzed on a Fortessa X20 cytometer (BD Biosciences). Data were acquired using DIVA software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo 10.4 (TreeStar).

PCSK9 protein levels quantification

Serum PCSK9 was measured using a commercially available ELISA kit (R&D Duoset PCSK9 mouse, Bio-Techne SAS, Noyal Châtillon sur Seiche, France). Samples serum from balbc control and anti-PCSK9 treated balbc were respectively diluted 500 and 5000 times in PBS and we next followed the provided kit instructions.

Serum gliadin specific IgE assessment

A 96-well MaxiSorp dark-bottomed plate (Thermo Fisher Scientific) was saturated with a solution containing gliadin at 10 μ g/ml overnight at 4°C. After four washes, the plate was saturated for two hours at 37°C with a saturation buffer (PBS + 0.05% Tween + 1% BSA). After 4 successive washes, serum diluted 10 times in saturation buffer was deposited in triplicate in the plate and incubated for 2 hours at 37°C. After a further wash step, secondary anti-IgE alkaline phosphatase coupled antibody (1 mg/ml, SouthernBiotech) was diluted 250-fold with saturation buffer and deposited in the wells for two hours at 37°C. After washing, the alkaline phosphatase substrate, 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP) 5-fold diluted in saturation buffer was added to and incubated at room temperature in the dark for 1h30. The plate was then placed in a VARIOSKAN LUX (Thermo Fisher Scientific) plate reader spectrophotometer where

the MUP was excited to 360 nanometers and the emission read at 440 nanometers. Basal fluorescence was obtained by performing a blank labeling in several wells without adding serum and the mean of the values obtained was subtracted from the values of the samples to be assayed.

Serum cytokines measurement

Bio-Plex ELISA with Luminex Bio-Rad technology was used and instruction followed. Briefly, magnetic beads were diluted 10-fold in assay buffer and deposited in kit provided plate. Samples were diluted 4 times in kit reagent diluent. The plate was then washed twice with Bio-Plex Wash Buffer in Bio-Plex Wash Station (Bio-Rad), then the samples and assay were added and the plate was agitated at room temperature for 30 minutes at 850 rpm. A series of three washes was performed, then detection antibody diluted to 10-fold with diluent detection was added and the plate was shaken at room temperature for 30 minutes at 850 rpm. After a series of three successive washes, the 100-fold diluted SA-PE in Assay Buffer was deposited and the plate was shaken at room temperature for 10 minutes at 850 rpm. After a final series of washes, the beads were resuspended in assay buffer and agitated for 1 minute at room temperature at 850 rpm and then the plate was read in Bio-Plex 200 system (Bio-Rad).

Statistical analyses

Values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical significance was determined using a Mann & Whitney test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

PCSK9 deficiency prevents allergic symptoms

We first assess the allergic response in males and females Pcsk9^{-/-} and Pcsk9^{+/+} mice. To do so we injected 10 µg of DG intraperitoneally every 10 days 3 times each injection was called Sensitization 1(S1), S2 and S3 respectively. Then, we orally administered 20 mg of DG 7 days after the S3 (step call Challenge 1 or C1) and one more time 7 days after (C2) (Figure 1A). We first observe that induced FA mice, regardless the genotype, present significant body weight loss after the C1 (Figure B). As a read out of allergic response, ear thickness was quantified before and 1 hour after the C2. We did show that Pcsk9^{+/+} FA mice present a significant increase of their ear thickness following challenge when Pcsk9^{-/-} mice do not exhibit any difference compare to non FA mice (Figure 1C). We also measured an increase of the intestinal transit time in FA induced Pcsk9^{+/+} mice during the C1. As before, FA does not significantly alter intestinal transit of Pcsk9^{-/-} mice (Figure 1E). By contrast, we do not retrieve any difference in feces humidity between control and FA group (Figure 1F). Finally, we confirm that Pcsk9^{-/-} mice with or without FA are hypocholesterolemic compared Pcsk9^{+/+} groups (Figure 1D). All together, these data suggest that Pcsk9^{-/-} mice present less allergic symptoms than Pcsk9^{+/+} mice.

PCSK9 deficiency prevents Th2 cells development but not IgE plasmocytes

To determine how PCSK9 deficiency protect against FA symptoms, we performed flow cytometry analysis on cells harvested from MLN and spleen. We first assess T regulatory (Treg) lymphocytes that are involved in tolerance development. Our measurement showed that during FA process both PCSK9-deficient and control wild-type littermates have decreased Treg lymphocytes in their MLN and spleen

(Figure 2A). Similarly, Th1 lymphocyte population seems not affected by the FA status (Figure 2B). Allergic response is characterized by Th2 lymphocytes activation. Consistently, we did quantify in Pcsk9^{+/+} mice a significant increase of Th2 cell proportion in the MLN of FA induced mice compared to non-allergic control mice (Figure 1C). By contrast, we did not measure a significant raise of these cells in the MLN of Pcsk9^{-/-} mice following FA induction (Figure 1C). In the spleen, we did not measure significant Th2 differences between groups (Figure 1C). Th17 lymphocytes were strongly increased in the MLN of Pcsk9^{+/+} control mice following FA challenge (Figure 1D). Despite a slight increase, it seems that their induction was attenuated in the MLN of FA challenged Pcsk9^{-/-} mice (Figure 1D). In contrast, no significant alteration was seen in the spleen (Figure 1D). Another important feature in allergic immune cell response is the presence of IgE plasmocytes. We measured a significant increase in IgE plasmocytes only in the spleen of all FA induced mice (Figure 1E). Finally, we showed a slight increase in Breg population in MLN and spleen of FA induced Pcsk9^{-/-} mice compared to control group (Figure 1F).

Food allergy modulates circulating PCSK9 and efficacy of anti-PCSK9 antibody

Then, we used males and females Balbc mice, the golden standard mouse model for experimental allergy protocol. We inhibited PCSK9 by injecting every 10 days, from the beginning to the end of the protocol, anti-PCSK9 antibody (AbP9) (Figure 3A). We first verified the efficacy of AbP9 treatment by measuring plasma PCSK9 levels after C2. As expected, due to its sequestering effect, plasma PCSK9 levels were strongly increased in mice treated with PCSK9 antibodies. Interestingly, we noticed that FA reduces plasma PCSK9 levels in both vehicle and AbP9 treated mice (Figure 3B). Moreover, we measured plasma cholesterol concentrations and

validated that expected hypocholesterolemic effect of PCSK9 inhibitor in non-allergic control mice (Figure 3C). Surprisingly, in a food allergic context, anti-PCSK9 antibodies failed to lower plasma cholesterol concentrations (Figure 3C).

Pharmacological PCSK9 inhibition attenuates allergic symptoms

As previously described in C57BL6/J mice, we observed that FA induction in Balb/c mice affects several parameters in vehicle treated mice. FA reduces body weight (Figure 4A), increases ear thickness (Figure 4B), intestinal transit time (Figure 4D) and intestinal permeability (Figure 4C) and reduces fecal humidity (Figure 4E). The pharmacological inhibition of PCSK9 attenuates the symptoms induced by FA. First, the body weight loss was less severe in the AbP9 treated group compared to vehicle treated mice (Figure 4A). Secondly, the FA induction did not significantly affect ear edema (Figure 4B), intestinal transit and permeability (Figure 4D&C) or feces humidity (Figure 4E) in the AbP9 treated mice.

PCSK9 inhibition prevents Th2 cells development but not IgE plasmocytes

To assess the effect of PCSK9 inhibition on immune cell population, we did a flow cytometry analysis in MLN and spleen of control or FA AbP9-treated and untreated balb/c mice. The anti-inflammatory Treg cells were not affected in the MLN while in the spleen, we noticed an increase in Treg cells proportion in FA induced mice (Figure 5A). Pro-inflammatory Th1 cells proportion remained similar in all groups and organs tested (Figure 5B). As seen in C57BL/6 mice, FA induction significantly promoted Th2 and Th17 lymphocytes proportion in MLN and the spleen (Figure 5C&D). Interestingly, the inhibition of PCSK9 globally reduced this FA dependent increase of Th2 and Th17 lymphocytes proportion in MLN and spleen (Figure 5C&D). Finally, both IgE

plasmacytes (Figure 5E) and Breg cells (Figure 5F) were increased in MLN and the spleen following FA induction and were unaffected by PCSK9 inhibition.

PCSK9 inhibition has no effect on serum cytokines

To explore the effect of PCSK9 inhibition on immune response, we performed multiplex plasma cytokine levels analysis. First, we assessed the concentration of pro-inflammatory cytokines released by Th2 and Th17 lymphocytes. As showed on Figure 1A, FA induction respectively increased plasma IL4 and IL9 and reduced IL17A levels. The pharmacological inhibition of PCSK9 did not exert any effect of these cytokine levels (Figure 6A). We next measured serum IFN- γ , mirror of cytokine Th1 production, and find a slight increase in AbP9-treated FA mice compared to non-food allergic mice (Figure 6B). MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) was increased in serum of FA mice regardless PCSK9 inhibition treatment (Figure 6C). We observe a similar increase of serum gliadin specific IgE levels in both FA groups (Figure 6D). Finally, serum IL-10 concentrations were unaffected by the different experimental conditions (Figure 6E).

Discussion

This present study explores the putative role of PCSK9 on food allergy progression. We provide for the first time some evidence suggesting that both PCSK9 deficiency or PCSK9 inhibition can attenuate food allergy symptoms. First, we report that lack of PCSK9 in gliadin food allergy mouse model decrease allergic occurrence such as ear thickness and transit time increase. Secondly, we showed that PCSK9 deficiency prevents from the increase of Th2 and Th17 lymphocytes population occurring during food allergy. Finally, we reproduced these results using a pharmacological PCSK9 inhibitor in Balb/c mice.

Our data suggest that food allergy B cells sensitization occurring normally in Pcsk9 deficient or PCSK9 inhibited mice. Indeed, IgE-plasmocytes and gliadine-specific IgE secretion are increased with or without PCSK9 deficiency/inhibition (Figure 2, 5, 6). However, the other arm of food allergy development involving T lymphocyte seems to be altered by the lack of PCSK9 (Figure 2, 5). Further experiments are needed to determine the exact molecular mechanism and the role of PCSK9 on these cell populations.

One major information in our present study is the lack of food allergy symptoms despite the gliadin-specific IgE production in Pcsk9 deficiency/inhibition mouse model (Figure 1, 3). Because mast cells are known to be central for food allergy pro-inflammatory mediator release and regarding the effect of dietary cholesterol effect on mast cell activation lack of PCSK9 effect may impact mast cell activation or proliferation [1][11].

It has been shown in 2008 that the liver is the only one organ responsible of PCSK9 secretion in the plasma [12]. Since the role of extra-hepatic PCSK9 is not well

understood, we have previously developed an original intestine-specific Pcsk9 deficient mice [13], it could be interesting to test if this mouse model is protected against food allergy symptoms as for total Pcsk9 deficiency.

To date, no data has been published regarding the putative link existing in Humans between PCSK9 biology and food allergy. It would be very informative to determine in cohorts of allergic patients whether PCSK9 polymorphisms or plasma PCSK9 circulating levels are correlated with the predisposition to develop or to aggravate the severity of food allergy.

PCSK9 is a natural inhibitor of the LDLR receptor and a master regulator of cholesterol homeostasis [6]. Numerous studies have established a crosstalk between cholesterol homeostasis and immune response. Notably, some studies have shown that cholesterol levels could have an impact on allergic mediator such as IgE levels or mast cell activation [14][11], or that Histamine may affect the hepatic expression of the LDLR [15]. It would be very interesting to test the effect of PCSK9 inhibitors in LDLR deficient mice.

In conclusion, our study provides the first evidence of the impact of PCSK9 on one allergic disease. Some studies are needed to better understand how PCSK9 inhibition or deficiency modulates food allergic symptoms. Regarding the expression of PCSK9 in the other organs than liver or intestine, such as lungs, we can hypothesis that PCSK9 inhibition can affect other allergic diseases such as asthma or might affect the atopic march phenomenon [5][16].

References

- [1] K. D. Stone, C. Prussin, and D. D. Metcalfe, "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, pp. S73–S80, 2010.
- [2] M. S. Motosue, M. F. Bellolio, H. K. Van Houten, N. D. Shah, and R. L. Campbell, "National trends in emergency department visits and hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children," *Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 29, no. 5, pp. 538–544, 2018.
- [3] R. J. Mullins, B. K. Wainstein, E. H. Barnes, W. K. Liew, and D. E. Campbell, "Increases in anaphylaxis fatalities in Australia from 1997 to 2013," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 46, no. 8, pp. 1099–1110, 2016.
- [4] G. B. Pajno *et al.*, "EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy," *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 73, no. 4, pp. 799–815, 2018.
- [5] N. G. Seidah *et al.*, "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation," *PNAS*, 2003.
- [6] K. N. Maxwell and J. L. Breslow, "Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype," *PNAS*, 2004.
- [7] K. R. Walley *et al.*, "PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome," *Sci Transl Med Oct.*, vol. 15, no. 6258, pp. 258–143, 2014.
- [8] D. J. Dwivedi *et al.*, "Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis," *Shock*, vol. 46, no.

- 6, pp. 672–680, 2016.
- [9] K. R. Walley *et al.*, “PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 258, pp. 258ra143–258ra143, Oct. 2014.
- [10] J. D. Proto *et al.*, “Hypercholesterolemia induces T cell expansion in humanized immune mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 6, pp. 2370–2375, Jun. 2018.
- [11] X. Zhang *et al.*, “Dietary cholesterol is essential to mast cell activation and associated obesity and diabetes in mice,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 6, pp. 1690–1700, 2019.
- [12] A. Zaid *et al.*, “Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration,” *Hepatology*, vol. 48, no. 2, pp. 646–654, 2008.
- [13] D. Garçon *et al.*, “Circulating rather than intestinal PCSK9 regulates postprandial lipemia in mice,” *ATVB*, 2020.
- [14] X. Zhang *et al.*, “IgE contributes to atherosclerosis and obesity by affecting macrophage polarization, macrophage protein network, and foam cell formation,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, no. March, pp. 597–610, 2020.
- [15] W. Liao, M. Rudling, and B. Angelin, “Novel effects of histamine on lipoprotein metabolism: Suppression of hepatic low density lipoprotein receptor expression and reduction of plasma high density lipoprotein cholesterol in the rat,” *Endocrinology*, vol. 138, no. 5, pp. 1863–1870, 1997.
- [16] K. J. Allen and S. C. Dharmage, “The role of food allergy in the atopic march,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 40, no. 10, pp. 1439–1441, 2010.

Legends

Figure 1 : PCSK9 deficiency prevents food allergy symptoms. A) Protocol of food allergy induction. B) Mice body weight measured every 2 days all along the protocol. * statistical analysis between $Pcsk9^{+/+}$ Ctl and $Pcsk9^{+/+}$ FA ; \$ statistical analysis between $Pcsk9^{-/-}$ Ctl and $Pcsk9^{-/-}$ FA. C) Delta ear thickness before and one hour after the C2 deaminated-gliadin gavage. D) Serum cholesterol at the end of the protocol. E) Transit time assessed by red carmin colored feces appearance during the first deaminated-gliadin gavage (C1). F) Feces humidity from feces harvested during C1. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 9 – 12 animals per group); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Figure 2 : $Pcsk9$ deficiency protects from Th2 and Th17 lymphocyte increase but not from IgE-plasmocyte increase during food allergy. A) T regulatory lymphocyte B) Th1 lymphocyte C) Th2 lymphocyte D) Th17 lymphocyte E) B regulatory lymphocyte and F) IgE-plasmocytes were measured in MLN and spleen after the second deaminated-gliadin gavage obtained by flow cytometry from the four groups of mice. Treg (CD3+ CD4+ Foxp3+ CD25^{high}), Th1 (CD3+ CD4+ IFN γ +), Th2 (CD3+ CD4+ Gata3+), Th17 (CD3+ CD4+ Ror γ t+), Breg (CD19+ IL-10+) and IgE-plasmocytes (CD9+ IgE+) were measured after in vitro stimulation. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 9 – 12 animals per group); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

Figure 3 : Effect of PCSK9 antibodies on circulating PCSK9 and cholesterol during food allergy. A) Protocol of food allergy induction and PCSK9 inhibition. B) Serum

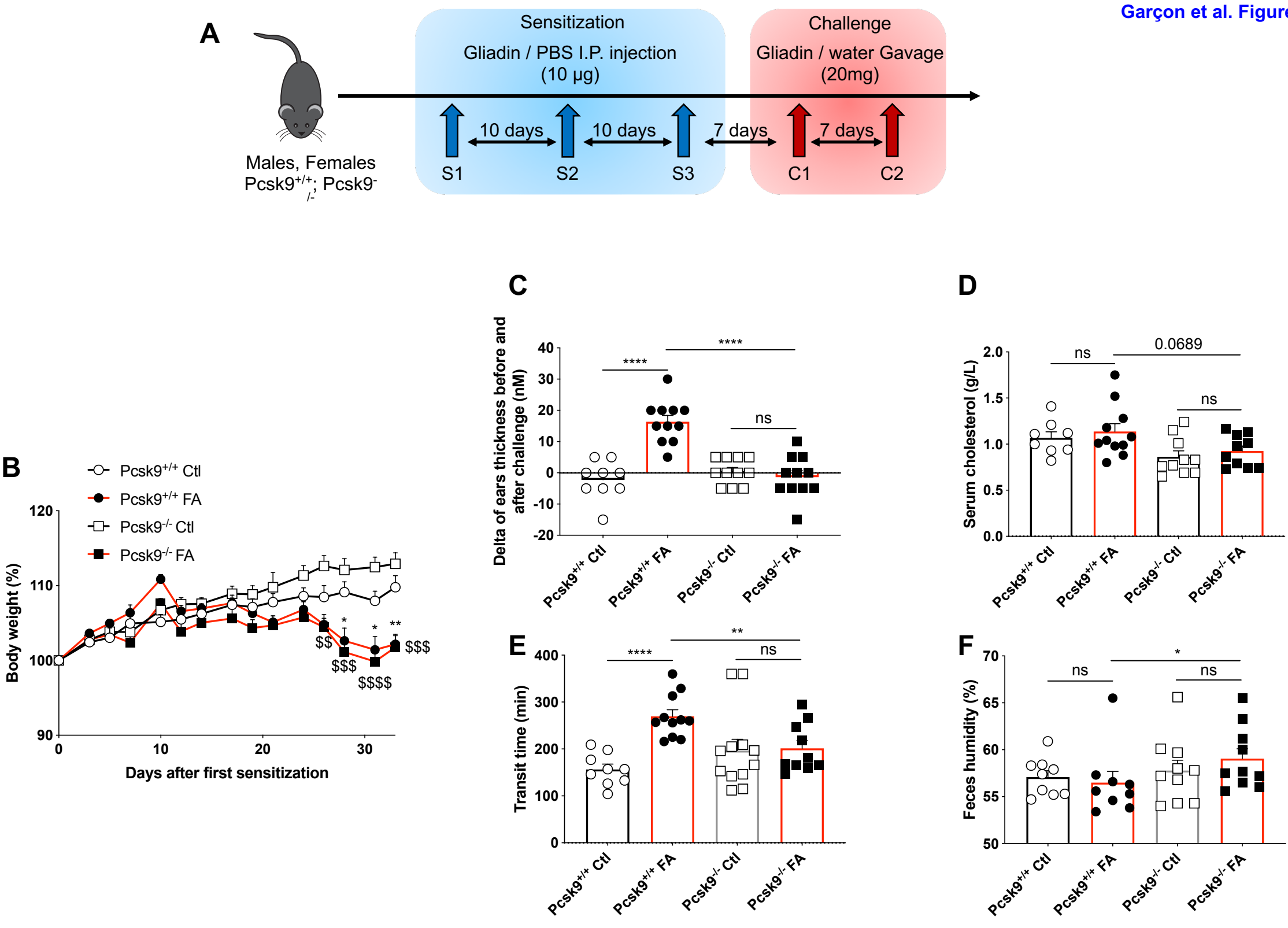
PCSK9 and C) Serum cholesterol assess from sera harvested during the C2. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 8 – 10 animals per group); **p<0,01; ****p<0,001.

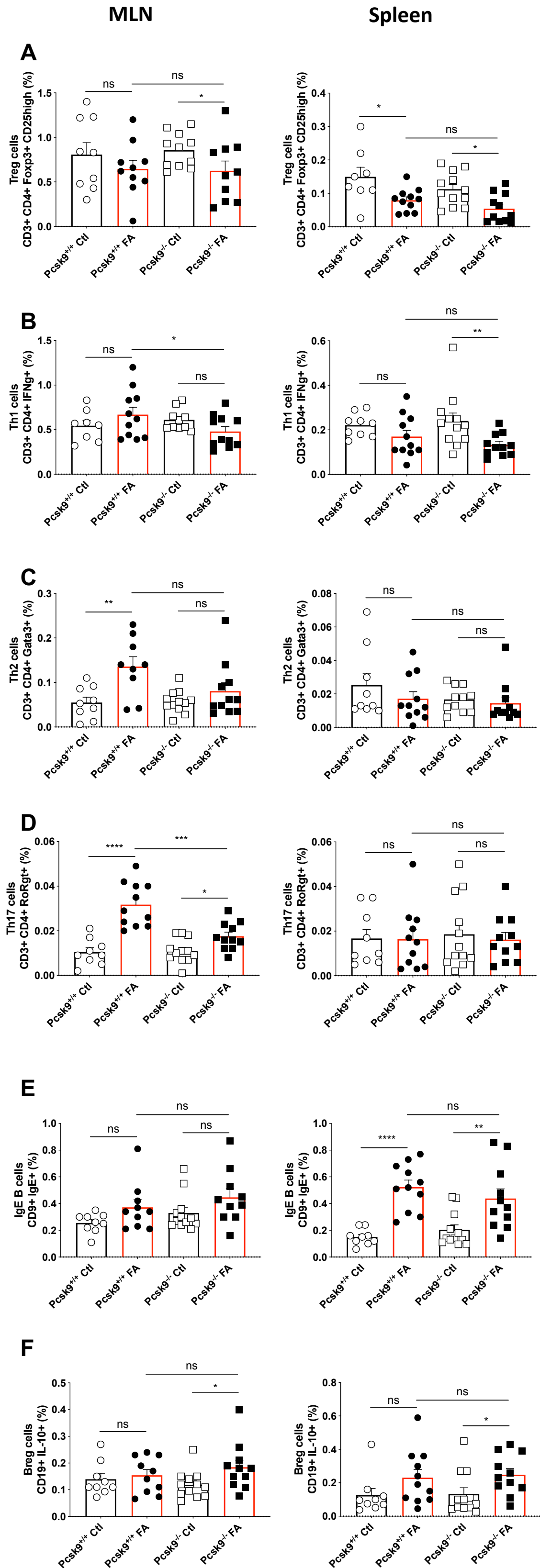
Figure 4 : PCSK9 inhibition prevents food allergy symptoms. A) Mice body weight measured every 2 days all along the protocol. * statistical analysis between Ctl and Ctl FA ; \$ statistical analysis between AbP9 Ctl and AbP9 FA. B) Delta ear thickness before and one hour after the C2 deaminated-gliadin gavage. C) Intestinal permeability assessed by FITC serum content during the second challenge. D) Transit time assessed by red carmin colored feces appearance during the first deaminated-gliadin gavage (C1). E) Feces humidity from feces harvested during C1. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 8 – 10 animals per group); * p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001.

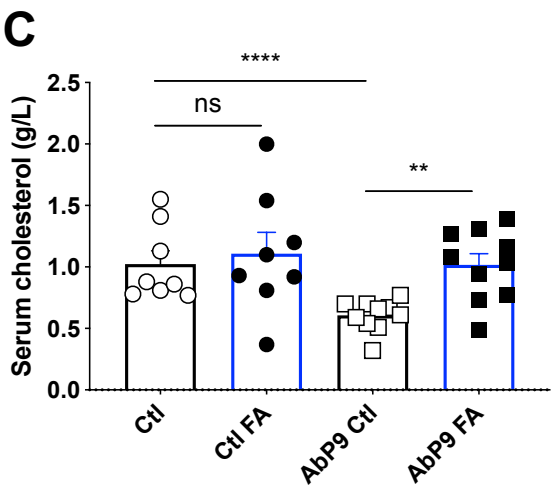
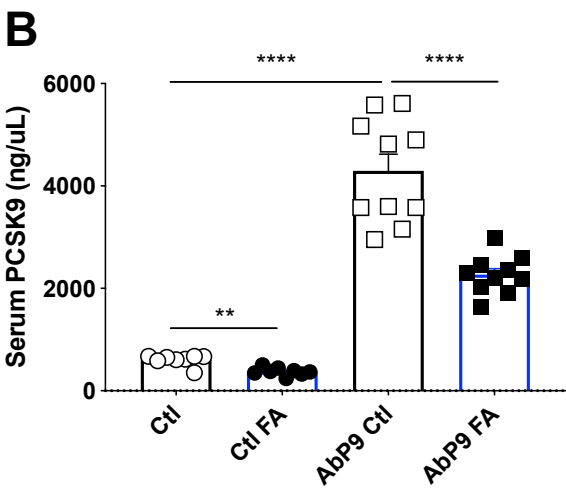
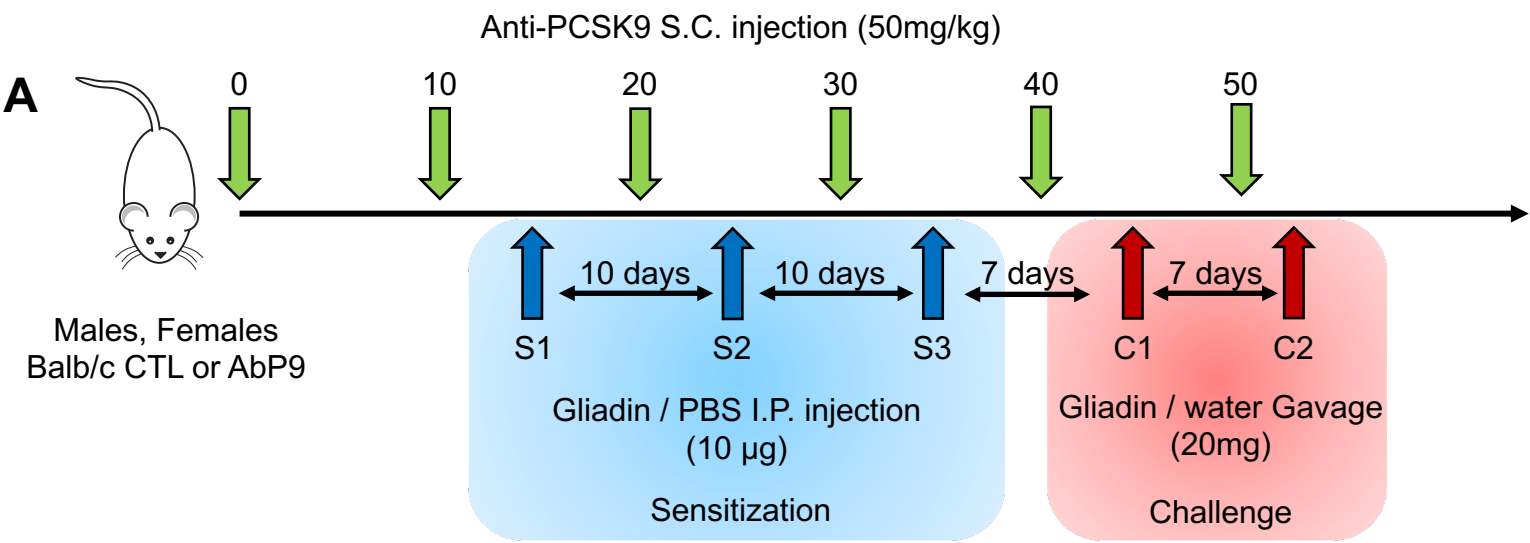
Figure 5 : Pcsk9 inhibition protects from Th2 and Th17 lymphocyte increase but not from IgE-plasmocyte increase during food allergy. A) T regulatory lymphocyte B) Th1 lymphocyte C) Th2 lymphocyte D) Th17 lymphocyte E) B regulatory lymphocyte and F) IgE-plasmocytes were measured in MLN and spleen after the second deaminated-gliadin gavage obtained by flow cytometry from the four groups of mice. Treg (CD3+ CD4+ Foxp3+ CD25high), Th1 (CD3+ CD4+ IFN γ +), Th2 (CD3+ CD4+ Gata3+), Th17 (CD3+ CD4+ Ror γ t+), Breg (CD19+ IL-10+) and IgE-plasmocytes (CD9+ IgE+) were measured after in vitro stimulation. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 8 – 10 animals per group); * p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001.

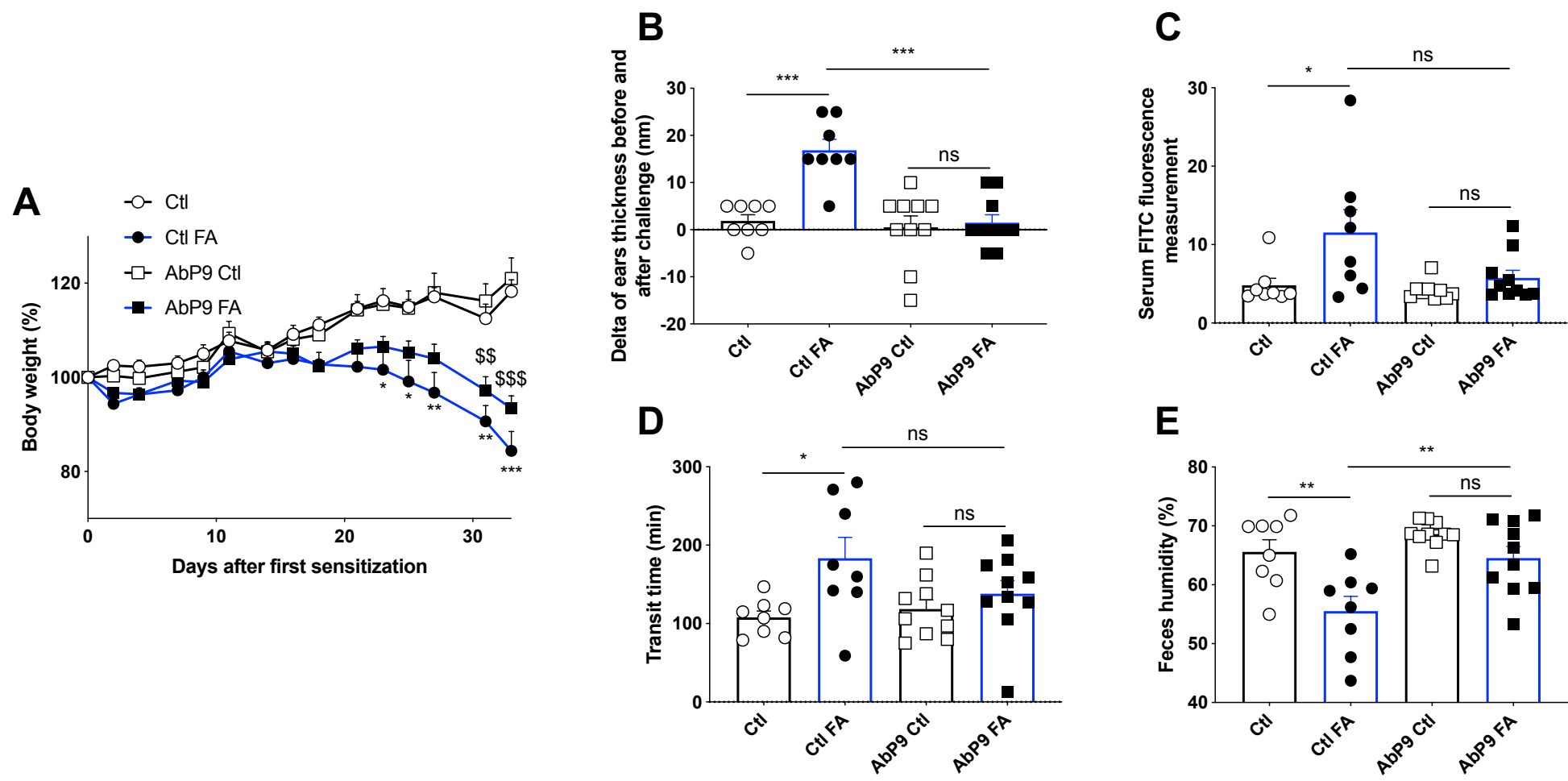
Figure 6 : PCSK9 inhibition have no impact on serum cytokines during food allergy. A) Serum Th2 and Th17 lymphocytes pro-inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-9 and IL-

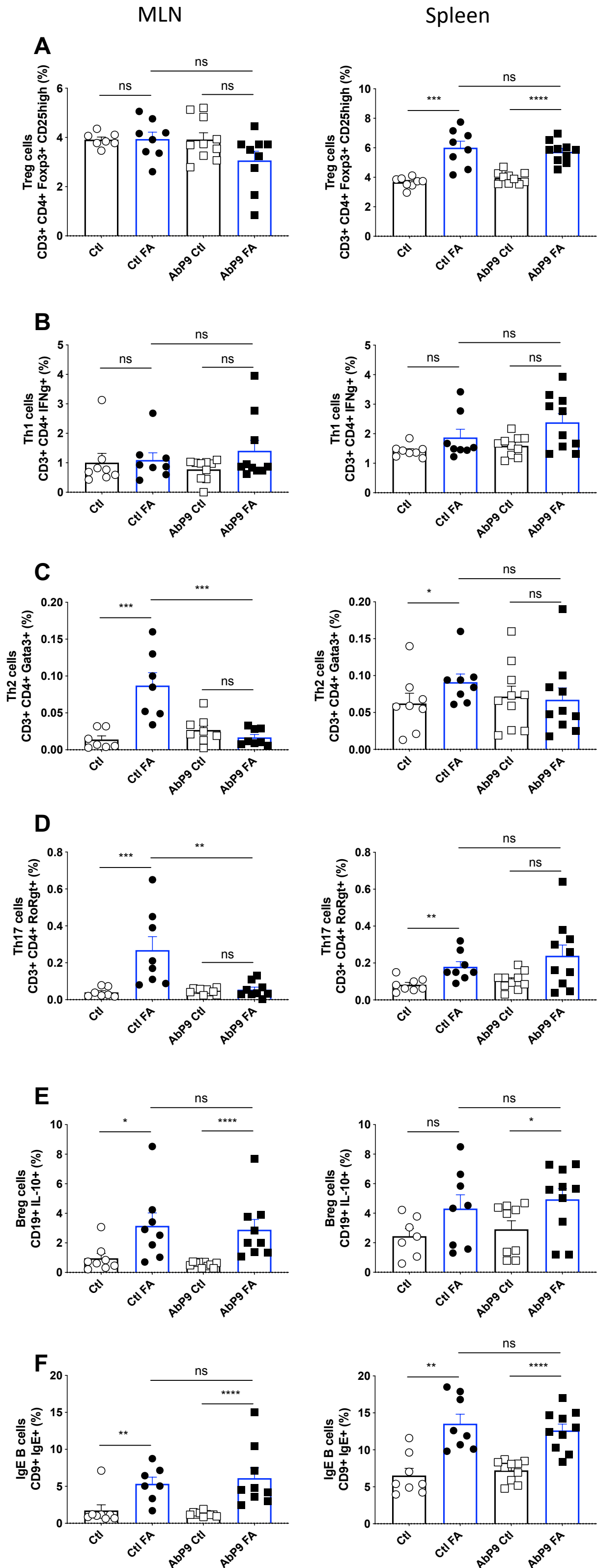
17A), B) Serum IFN- γ , C) Serum gliadin specific IgE, D) Serum MCP-1 and E) Serum IL-10 were measured from sera harvested during the second deaminated-gliadin gavage. Data represent the mean $\pm$ SEM (n = 8 – 10 animals per group); * p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001.

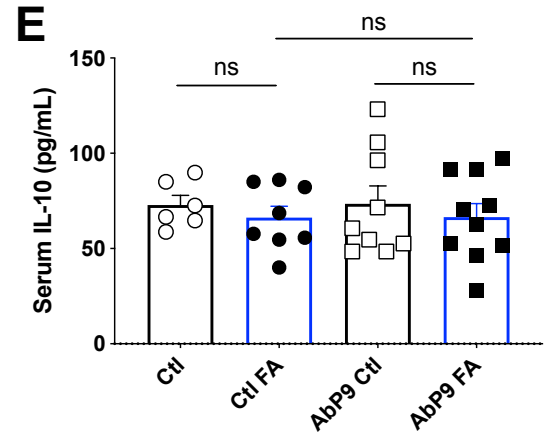
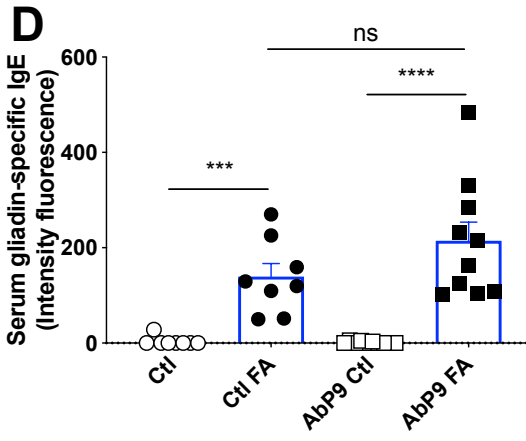
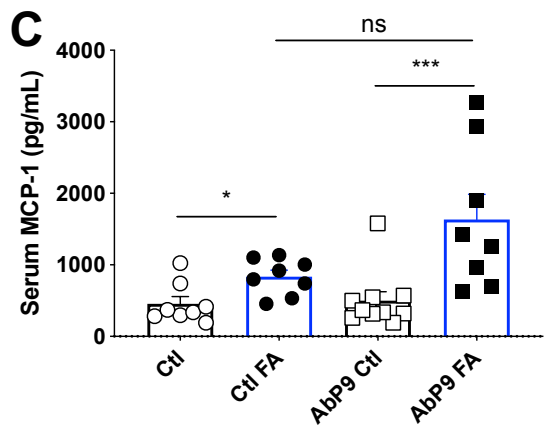
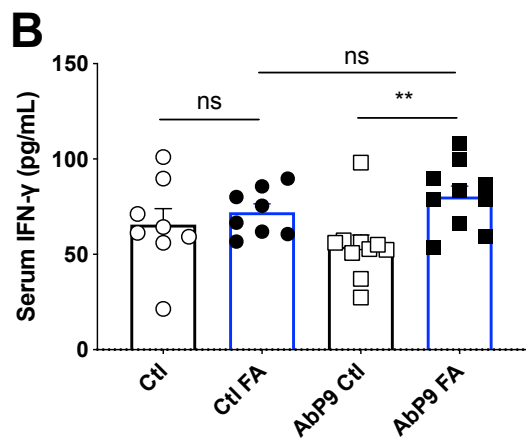
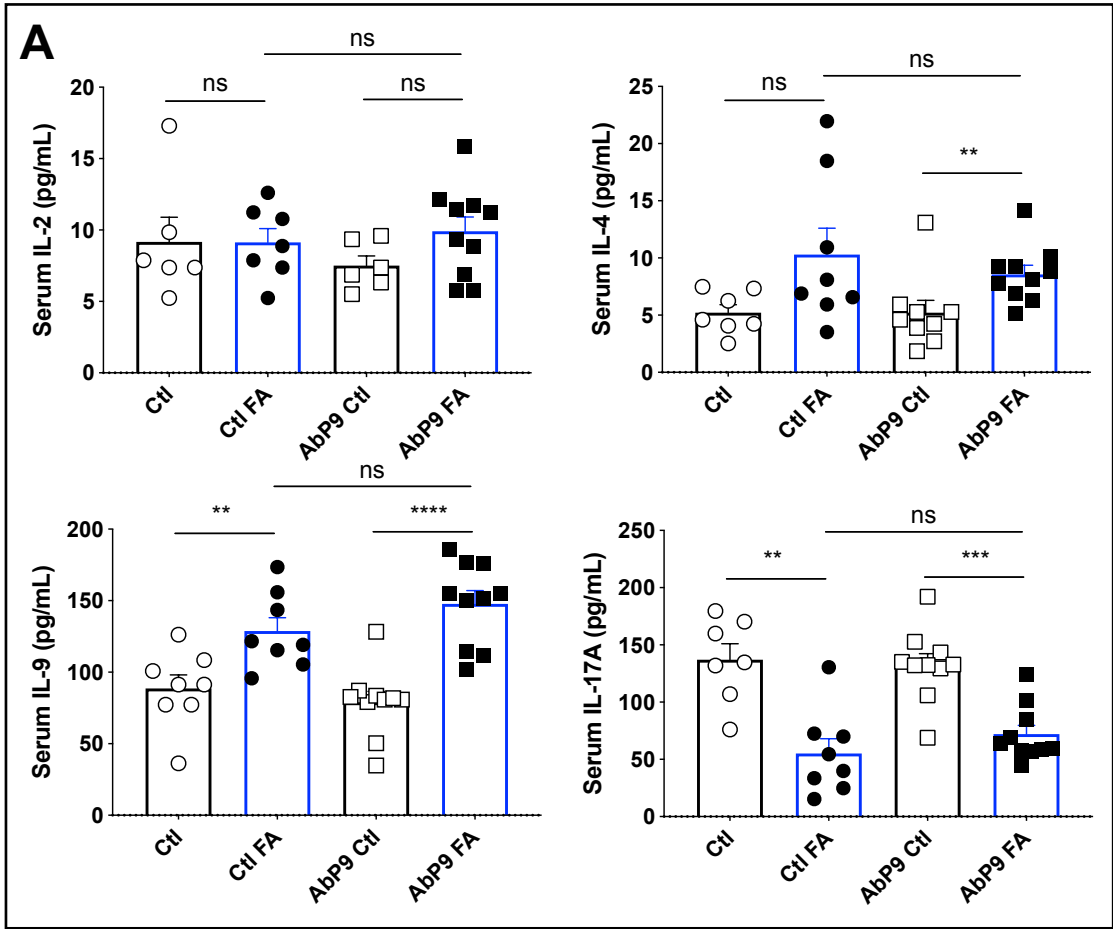












Partie 3 : Discussion

L'objectif de ma thèse visait à comprendre le rôle extra-hépatique de PCSK9 au-delà du métabolisme du cholestérol. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux aspects différents. Premièrement, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de la PCSK9 intestinale sur la lipémie postprandiale qui est, altérée chez les souris *Pcsk9*^{-/-} [214]. Deuxièmement, nous avons étudié l'impact de PCSK9 sur un autre aspect que le métabolisme lipidique : l'inflammation. En effet, de plus en plus d'études apportent des arguments en faveur d'un rôle de PCSK9 sur les réactions inflammatoires [281][282][283][286][386]. Nous nous sommes intéressés aux effets d'une délétion totale ou d'une inhibition de PCSK9 sur l'allergie alimentaire.

Ma première étude sur l'effet respectif de la PCSK9 extracellulaire d'origine hépatique et intracellulaire intestinale montre que seule la forme circulante de PCSK9 est un régulateur clef de la LPP. Considérant l'expression forte de PCSK9 dans l'intestin des modèles animaux (rats, souris) et chez l'Homme [120][214] ainsi que les études *in vitro* dans le modèle entérocytaire des Caco-2 montrant que l'inhibition de PCSK9 entraîne une baisse de la sécrétion d'ApoB48 [182], nous avons voulu déterminer qui de la PCSK9 circulante, d'origine hépatique, ou de la PCSK9 intracellulaire intestinale influence la LPP. Pour cela, nous avons développé un modèle de délétion de PCSK9 spécifiquement au niveau intestinal par le croisement de souris exprimant *Pcsk9* flanqué de séquence Flox (*Pcsk9*^{f/f}) avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le promoteur intestin-spécifique de la villine [177][384]. La caractérisation de ce modèle a montré une délétion totale et spécifique de l'intestin de PCSK9. Malgré une absence totale de la forme protéique au niveau intestinal, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un impact de l'absence de la PCSK9

intestinale sur l'homéostasie du cholestérol ou des triglycérides lors d'une expérience de jeûne/re-nutrition de nos souris. L'étude de la LPP dans ce modèle n'a révélé aucune influence de l'absence de PCSK9 intestinale sur ce phénomène. Nous ne pouvons pas exclure que des mécanismes de compensation se mettent en place, notamment via la PCSK9 circulante. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de comprendre le rôle de la PCSK9 intestinale, sûrement au-delà du métabolisme des lipoprotéines. Nous avons dans cette optique lancé une analyse transcriptomique à partir de muqueuses intestinales de souris contrôles floxées pour PCSK9 et des souris *i-Pcsk9*^{-/-}.

Ensuite, nous avons utilisé deux approches complémentaires qui nous ont permis de mettre en évidence que la PCSK9 circulante est un acteur clef de la régulation de la LPP. Tout d'abord, nous avons inhibé la forme circulante de PCSK9 par l'utilisation d'anticorps anti-PCSK9. Ensuite, nous avons sur-exprimé la PCSK9 humaine au niveau du foie des souris sauvages par injection d'adénovirus. Étant donné que les résultats de 2009 montrent que les souris *Pcsk9*^{-/-} sont capables d'éliminer plus rapidement leurs chylomicrons que les souris sauvages [214], nous pouvons dire que l'impact de la déficience en PCSK9 sur la LPP est majoritairement médié par l'augmentation de l'élimination des TRL. Prenant en compte que les chylomicrons et les VLDL sont éliminés de la circulation et captés par le foie via les récepteurs LDLR, LRP1, LRP5 ou syndecan-1 et que PCSK9 est capable de se lier et d'inhiber LRP1 à la surface des hépatocytes [168], nous avons voulu déterminer si le LDLR est indispensable dans l'effet de PCSK9 sur la LPP. En effet, l'étude des souris *Ldlr*^{-/-} traitées par anticorps anti-PCSK9 ne révèle aucune altération de la lipémie postprandiale, montrant que l'inhibition de PCSK9 exerce son effet sur la LPP de façon LDLR-dépendante.

Les études cliniques très récentes sur le lien entre PCSK9 et LPP chez l'Homme montrent que cette inhibition n'a pas d'impact sur la LPP chez les patients sains contrairement à ce que nous révélons chez la souris [216][217]. De plus, les patients porteurs d'une mutation LOF de PCSK9 présentent une LPP altérée [215]. Enfin, les dernières études cliniques montrent une diminution de la LPP chez les patients atteints d'un diabète de type 2 qui reçoivent une injection d'Alirocumab ou d'Evolocumab [218][219]. Nos expériences menées chez les souris diabétiques présentant une hyperlipémie postprandiale caractéristique des patients diabétiques et traitées par anti-PCSK9 montrent une réduction de la LPP. Tous ces résultats montrent les limites des modèles murins mais, en même temps, rassurent sur la véracité des résultats dans un contexte pathologique.

Ma thèse aura apporté des arguments montrant que la forme circulante de PCSK9 comparée à la forme intestinale est cruciale dans la régulation de la LPP. En allant un peu loin, nous montrons, avec ces résultats, que les thérapies anti-PCSK9 peuvent être utilisées afin de réduire le phénomène d'hyperlipémie postprandiale, facteur de risque indépendant des MCV, chez les patients diabétiques. Enfin, nous déterminons que l'effet de PCSK9 sur la LPP est LDLR-dépendant.

Notre seconde étude sur le rôle de PCSK9 dans l'allergie alimentaire est inédite, non seulement pour notre équipe experte dans le métabolisme lipidique et les MCV, mais également dans le champ de recherche de PCSK9. Nous avons saisi l'opportunité de collaborer avec l'équipe III de l'Institut du Thorax qui possède une expertise dans les allergies respiratoires et alimentaires grâce au Pr Antoine Magnan et au Dr Grégory Bouchaud. L'étude du modèle d'allergie alimentaire à la gliadine de blé développé précédemment par le Dr Bouchaud [387] a permis de montrer que,

d'une part, la déficience en PCSK9 et, d'autre part, l'inhibition de PCSK9 par un anticorps spécifique préviennent les symptômes de l'allergie alimentaire. En effet, nous mettons en évidence que la déficience et l'inhibition de PCSK9 empêchent l'apparition de l'œdème au niveau de l'oreille mesuré chez les souris sauvages allergiques et contrecarrent l'augmentation du transit intestinal induit par l'allergie alimentaire.

Étant donné que l'allergie alimentaire est un processus se déroulant en deux phases distinctes : la sensibilisation et le challenge, nous avons voulu disséquer les mécanismes pouvant être altérés en l'absence ou lors de l'inhibition de PCSK9 et pouvant expliquer l'absence de symptôme. La sensibilisation allergique passe par la mise en place de deux sous-populations immunitaires particulières : les lymphocytes Th2 et les plasmocytes B producteurs d'IgE spécifiques de l'allergène [367]. La mesure des niveaux circulants d'IgE spécifiques de la gliadine dans nos modèles de souris montre que l'absence ou l'inhibition de PCSK9 n'influence pas la production, ni la sécrétion de cette classe d'immunoglobulines. De même, l'étude par cytométrie en flux des populations immunitaires montre que la proportion des plasmocytes B à IgE est augmentée chez les souris allergiques quel que soit leur traitement ou leur génotype. Ces résultats suggèrent que PCSK9 n'influence pas le développement de cette population immunitaire en particulier.

L'exploration de l'autre branche de l'inflammation par la mesure des lymphocytes T, notamment des lymphocytes Th2, montre que l'absence et l'inhibition de PCSK9 altère l'augmentation de la proportion de cette population cellulaire lors de l'allergie. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer comment PCSK9 agit sur ces populations immunitaires. En effet, nous avons planifié d'effectuer des expériences *in vitro* à partir de splénocytes primaires de souris

sauvages ou *Pcsk9*^{-/-} et de les cultiver en présence de cocktails de cytokines en supplémentant le milieu de culture avec des protéines PCSK9 recombinantes. L'impact de PCSK9 sur la prolifération/différenciation de ces cellules sera analysé par cytométrie en flux.

Au-delà du non développement des lymphocytes T pro-inflammatoires en absence de PCSK9, nous n'avons pas observé de symptôme allergique. Prenant en compte que les symptômes de l'allergie sont médiés par des facteurs pro-inflammatoires (cytokines, histamine) sécrétés principalement par les mastocytes et les basophiles, nous posons l'hypothèse que la déficience et l'inhibition de PCSK9 circulant pourrait influencer la prolifération, la survie ou l'activité de ces cellules qui normalement réagissent en réponse à l'allergie alimentaire. Un argument favorable à cette hypothèse est que le cholestérol est un facteur crucial dans l'activation de ces populations immunitaires, notamment des mastocytes [388]. L'effet de PCSK9 sur ces cellules peut donc être indirectement dû au niveau circulant de cholestérol. Afin de tester cette hypothèse, nous avons prévu de mettre en place le protocole d'allergie alimentaire chez des souris *Ldlr*^{-/-} dans lesquelles PCSK9 est incapable de moduler la cholestérolémie [122]. Ces conditions expérimentales permettront de déterminer si l'effet sur les cellules immunitaires de PCSK9 est direct ou indirect via la régulation des niveaux circulants de cholestérol.

Enfin, lors de notre première étude, nous avons développé un modèle de souris *i-Pcsk9*^{-/-}. Etant donné que l'allergie alimentaire est une pathologie inflammatoire dont le développement est cantonné à l'intestin, il serait intéressant d'observer les effets de la déficience intestinale de PCSK9 sur cette pathologie. Cette approche pourrait aider à déterminer un rôle extra-hépatique de PCSK9 au-delà du métabolisme du cholestérol.

Durant la durée de ma thèse, j'ai essayé d'élucider et de comprendre le rôle extra-hépatique de PCSK9 surtout au niveau intestinal. Le développement de la souris *i-Pcsk9^{-/-}* est un véritable atout afin de dissocier les effets de la forme circulante et locale de PCSK9 sur les processus intestinaux. Malheureusement, la recherche effectuée autour du métabolisme des lipoprotéines n'a pas permis de montrer un rôle de la PCSK9 intestinale. Au contraire, nous avons renforcé les données et l'importance de la PCSK9 d'origine hépatique sur la modulation du métabolisme lipidique, notamment sur le phénomène de lipémie postprandiale. Pratiquement à mi-parcours, l'initiation du projet autour des effets de PCSK9 sur l'allergie alimentaire a permis d'ouvrir un nouveau champ de recherche sur PCSK9 et ses effets inflammatoires. Beaucoup de travail reste néanmoins à effectuer autour de cet axe afin de caractériser les effets de PCSK9 sur ce processus. Enfin, j'aime à croire que cette nouvelle perspective de recherche identifiera le premier rôle intestinal de PCSK9.

Bibliographie

- [1] “OMS : Maladies cardiovasculaires,” *OMS*, 2017. .
- [2] C. J. O'Donnell and R. Elosua, “Cardiovascular risk factors. Insights from framingham heart study,” *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 299–310, 2008.
- [3] S. Bayne-Jones, W. Walter J. Burdette, C. L. G. Cochran, Emmanuel Farber, Louis F. Fieser, Jacob Furth, John B. Hickam, and M. H. S. Leonard M. Schuman, “Report of the Public Advisory Health Committee To the of the Surgeon,” pp. 1–386, 1964.
- [4] T. H. E. H. Detection, “The effect of antihypertensive drug treatment on mortality in the presence of resting electrocardiographic abnormalities at baseline: The HDFP experience. The hypertension detection and follow-up program cooperative research group,” *Circulation*, vol. 70, no. 6, pp. 996–1003, 1984.
- [5] J. L. Goldstein and M. S. Brown, “Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 249, no. 16, pp. 5153–5162, 1974.
- [6] B. M. Rifkind, “Lipid research clinics coronary primary prevention trial: Results and implications,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 54, no. 5, pp. 30–34, Aug. 1984.
- [7] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, “Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S),” *Lancet*, vol. 344, no. 8934, pp. 1383–1389, 1994.
- [8] S. Sidney *et al.*, “Recent trends in cardiovascular mortality in the United States and public health goals,” *JAMA Cardiol.*, vol. 1, no. 5, pp. 594–599, 2016.
- [9] M. S. Shiels *et al.*, “Trends in premature mortality in the USA by sex, race, and ethnicity from 1999 to 2014: an analysis of death certificate data,” vol. 389, no. 10073, pp. 1043–1054, 2018.
- [10] T. A. Pearson, “Public policy approaches to the prevention of heart disease and stroke,” *Circulation*, vol. 124, no. 23, pp. 2560–2571, 2011.
- [11] M. F. Piepoli *et al.*, “Update on cardiovascular prevention in clinical practice: A position paper of the European Association of Preventive Cardiology of the European Society of Cardiology,” *Eur. J. Prev. Cardiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 181–205, 2020.

- [12] L. L. Salim Yusuf, Steven Hawken, Stephanie Ôunpuu, Tony Dans, Alvaro Avezum, Fernando Lanas, Matthew McQueen, Andrzej Budaj, Prem Pais, John Varigos, "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study," *Lancet (London, England)*, vol. 364, no. 6, pp. 937–952, 2004.
- [13] R. Doll, R. Peto, J. Boreham, and I. Sutherland, "Mortality in relation to smoking: 50 Years' observations on male British doctors," *Br. Med. J.*, vol. 328, no. 7455, pp. 1519–1528, 2004.
- [14] J. V. Eva Prescott, Merete Hippe, Peter Schnohr, Hans Ole Hein, "Smoking and risk of myocardial infarction in women and men: longitudinal population study," *Br. Med. J.*, vol. 316, no. 7137, pp. 1047–1051, 1998.
- [15] M. R. Law, J. K. Morris, and N. J. Wald, "Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: An evaluation of the evidence," *Br. Med. J.*, vol. 315, no. 7114, pp. 973–980, 1997.
- [16] B. Iversen, B. K. Jacobsen, and M. L. Løchen, "Active and passive smoking and the risk of myocardial infarction in 24,968 men and women during 11 year of follow-up: The Tromsø Study," *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 28, no. 8, pp. 659–667, 2013.
- [17] A. M. Joseph *et al.*, "The safety of transdermal nicotine as an aid to smoking cessation in patients with cardiac disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 335, no. 24, pp. 1792–1798, 1996.
- [18] A. R. and J. D. S. Joep Perk, "Prevention of Cardiovascular Disease : Risk Factor Detection," *ESC Textb. Cardiovasc. lar Med. 1st ed.*, pp. 243–270, 2006.
- [19] J. Niebauer *et al.*, "Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: Role of physical exercise," *Circulation*, vol. 96, no. 8, pp. 2534–2541, 1997.
- [20] M. H. Forouzanfar *et al.*, "Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," *Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1659–1724, 2016.
- [21] M. H. Forouzanfar *et al.*, "Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 317, no. 2, pp. 165–182, 2017.

- [22] Prospective Studies Collaboration *et al.*, "Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths.," *Lancet (London, England)*, vol. 370, no. 9602, pp. 1829–39, Dec. 2007.
- [23] G. L. Schwartz and S. G. Sheps, "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.," *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 14, no. 2, pp. 161–168, 2004.
- [24] A. Pugliese, "The multiple origins of Type 1 diabetes," *Diabet. Med.*, vol. 30, no. 2, pp. 135–146, 2013.
- [25] S. S. S. Soedamah-Muthu, J. J. H. Fuller, H. E. Mulnier, V. S. V. Raleigh, R. R. A. Lawrenson, and H. H. M. Colhoun, "High Risk of Cardiovascular Disease in A cohort study using the General Practice Research Database," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 4, pp. 798–804, 2006.
- [26] L. Rydén *et al.*, "ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 39, pp. 3035–3087, 2013.
- [27] N. Sarwar *et al.*, "Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies," *Lancet*, vol. 375, no. 9733, pp. 2215–2222, 2010.
- [28] G. Vazquez-Benitez *et al.*, "Preventable major cardiovascular events associated with uncontrolled glucose, blood pressure, and lipids and active smoking in adults with diabetes with and without cardiovascular disease: A contemporary analysis," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 5, pp. 905–912, 2015.
- [29] M. M. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, "Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 24, pp. 2545–2559, 2008.
- [30] M. Arca, G. Pigna, and C. Favoccia, "Mechanisms of Diabetic Dyslipidemia: Relevance for Atherogenesis," *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 10, no. 6, pp. 684–686, 2012.
- [31] C. Lorenzo *et al.*, "Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance have distinct lipoprotein and apolipoprotein changes: The insulin resistance atherosclerosis study," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 4, pp. 1622–1630, 2013.

- [32] J. D. Brunzell, W. R. Hazzard, D. Porte, and E. L. Bierman, "Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man," *J. Clin. Invest.*, vol. 52, no. 7, pp. 1578–1585, 1973.
- [33] I. J. Goldberg and H. N. Ginsberg, "Ins and Outs Modulating Hepatic Triglyceride and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Gastroenterology*, vol. 130, no. 4, pp. 1343–1346, 2006.
- [34] J. B. Martin Adiels, Sven-Olof Olofsson, Marja-Riitta Taskinenband, "Diabetic Dyslipidaemia," *Curr Opin Lipidol* 17238–246., pp. 238–246, 2006.
- [35] M. C. M. Lin, D. Gordon, and J. R. Wetterau, "Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: Insulin negatively regulates MTP gene expression," *J. Lipid Res.*, vol. 36, no. 5, pp. 1073–1081, 1995.
- [36] E. Christopoulou, V. Tsimihodimos, T. Filippatos, and M. Elisaf, "Apolipoprotein CIII and diabetes. Is there a link?," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 1–8, 2019.
- [37] H. Duez, B. Lamarche, K. D. Uffelman, R. Valero, J. S. Cohn, and G. F. Lewis, "Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1357–1363, 2006.
- [38] N. A. A. Vincenza Cifarelli, "Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis," *Compr Physiol.*, pp. 496–507, 2018.
- [39] S. Dash, C. Xiao, C. Morgantini, and G. F. Lewis, "New Insights into the Regulation of Chylomicron Production," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 35, no. 1, pp. 265–294, 2015.
- [40] C. Xiao, S. Dash, C. Morgantini, and G. F. Lewis, "Novel role of enteral monosaccharides in intestinal lipoprotein production in healthy humans," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1056–1062, 2013.
- [41] R. Valéro, M. Maraninchi, and J. P. Nogueira, "The role of the enterocyte in the dyslipidemia of insulin resistant states," *Med. des Mal. Metab.*, vol. 3, no. 6, pp. 567–574, 2009.
- [42] G. F. Watts and D. C. Chan, "Novel insights into the regulation of postprandial lipemia by glucagon-like peptides: Significance for diabetes," *Diabetes*, vol. 62, no. 2, pp. 336–338, 2013.

- [43] J. C. Cohen, T. D. Noakes, and S. A. Benade, "Serum triglyceride responses to fatty meals : effects of meal fat content," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 47, pp. 825–827, 1988.
- [44] C. Maffeis, M. G. Surano, S. Cordioli, S. Gasperotti, M. Corradi, and L. Pinelli, "A high-fat vs. a moderate-fat meal in obese boys: Nutrient balance, appetite, and gastrointestinal hormone changes," *Obesity*, vol. 18, no. 3, pp. 449–455, 2010.
- [45] C. Vors *et al.*, "Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: A lipid dose-effect trial," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 9, pp. 3427–3435, 2015.
- [46] J. C. Cohen and G. M. Berger, "Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans," *J. Lipid Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 597–602, 1990.
- [47] E. M. O'Reilly, B. J. Holub, M. Laidlaw, C. Garrioch, and M. G. Wlodek, "Development of a Standardized Clinical Protocol for Ranking Foods and Meals Based on Postprandial Triglyceride Responses: The Lipemic Index," *ISRN Vasc. Med.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [48] M. F. F. Chong, B. A. Fielding, and K. N. Frayn, "Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, no. 6, pp. 1511–1520, 2007.
- [49] B. Burton-Freeman, A. Linares, D. Hyson, and T. Kappagoda, "Strawberry modulates ldl oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 29, no. 1, pp. 46–54, 2010.
- [50] M. Naissides, J. C. L. Mamo, A. P. James, and S. Pal, "The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women," *Atherosclerosis*, vol. 177, no. 2, pp. 401–408, 2004.
- [51] K. D. Ono-Moore *et al.*, "Postprandial Inflammatory Responses and Free Fatty Acids in Plasma of Adults Who Consumed a Moderately High-Fat Breakfast with and without Blueberry Powder in a Randomized Placebo-Controlled Trial," *J. Nutr.*, vol. 146, no. 7, pp. 1411–1419, 2016.
- [52] G. Clemente *et al.*, "Effects of different dairy products on postprandial lipemia," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 13, no. 6, pp. 377–383, 2003.
- [53] C. Vors *et al.*, "Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: A randomized crossover clinical trial," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 97, no.

- 1, pp. 23–36, 2013.
- [54] M. I. Maraki and L. S. Sidossis, “The Latest on the Effect of Prior Exercise on Postprandial Lipaemia,” *Sport. Med.*, vol. 43, no. 6, pp. 463–481, 2013.
 - [55] T. E. Graham, “Exercise, postprandial triacylglyceridemia, and cardiovascular disease risk,” *Can. J. Appl. Physiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 781–799, 2004.
 - [56] N. Mero, M. Syvanne, B. Eliasson, U. Smith, and M. R. Taskinen, “Postprandial elevation of apoB-48-containing triglyceride-rich particles and retinyl esters in normolipemic males who smoke,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 2096–2102, 1997.
 - [57] B. Eliasson, N. Mero, M. R. Taskinen, and U. Smith, “The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers,” *Atherosclerosis*, vol. 129, no. 1, pp. 79–88, 1997.
 - [58] S. Boquist, F. Karpe, K. Danell-Toverud, and A. Hamsten, “Effects of atorvastatin on postprandial plasma lipoproteins in postinfarction patients with combined hyperlipidaemia,” *Atherosclerosis*, vol. 162, no. 1, pp. 163–170, 2002.
 - [59] A. C. Sposito, R. D. Santos, R. F. Amâncio, J. A. F. Ramires, M. J. Chapman, and R. C. Maranhão, “Atorvastatin enhances the plasma clearance of chylomicron-like emulsions in subjects with atherogenic dyslipidemia: Relevance to the in vivo metabolism of triglyceride-rich lipoproteins,” *Atherosclerosis*, vol. 166, no. 2, pp. 311–321, 2003.
 - [60] M. Syväne, H. Vuorinen-Markkola, H. Hilden, and M. R. Taskinen, “Gemfibrozil reduces postprandial lipemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 286–295, 1993.
 - [61] G. Harley Hartung, S. J. Lawrence, R. S. Reeves, and J. P. Foreyt, “Effect of alcohol and exercise on postprandial lipemia and triglyceride clearance in men,” *Atherosclerosis*, vol. 100, no. 1, pp. 33–40, 1993.
 - [62] J. S. Cohn, J. R. McNamara, S. D. Cohn, J. M. Ordovas, and E. J. Schaefer, “Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages,” *J. Lipid Res.*, vol. 29, no. 4, pp. 469–479, 1988.
 - [63] C. L. Redard, P. A. Davis, and B. O. Schneeman, “Dietary fiber and gender: Effect on postprandial lipemia,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 52, no. 5, pp. 837–845, 1990.

- [64] N. D. Knuth and J. F. Horowitz, "The Elevation of Ingested Lipids within Plasma Chylomicrons Is Prolonged in Men Compared with Women," *J. Nutr.*, vol. 136, no. 6, pp. 1498–1503, 2006.
- [65] J. S. Issa, J. Diament, and N. Forti, "Postprandial lipemia: influence of aging," *Arq. Bras. Cardiol.*, vol. 85, no. 1, pp. 15–9, 2005.
- [66] Y. Nabeno, Y. Fukuchi, Y. Matsutani, and M. Naito, "Influence of aging and menopause on postprandial lipoprotein responses in healthy adult women," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 14, no. 3, pp. 142–150, 2007.
- [67] K. G. Jackson *et al.*, "Impact of age and menopausal status on the postprandial triacylglycerol response in healthy women," *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 1, pp. 246–252, 2010.
- [68] G. S. Zaman, S. Rahman, and J. Rahman, "Postprandial lipemia in pre- and postmenopausal women," *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 65–70, 2012.
- [69] Y. D. I. Chen, S. Swami, R. Skowronski, A. Coulston, and G. M. Reaven, "Differences in postprandial lipemia between patients with normal glucose tolerance and noninsulin-dependent diabetes mellitus," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 76, no. 1, pp. 172–177, 1993.
- [70] C. Geltner, M. Lechleitner, B. Föger, A. Ritsch, H. Drexel, and J. R. Patsch, "Insulin improves fasting and postprandial lipemia in type 2 diabetes," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 256–263, 2002.
- [71] G. D. Kolovou *et al.*, "Postprandial lipemia in men with metabolic syndrome, hypertensives and healthy subjects," *Lipids Health Dis.*, vol. 4, pp. 1–8, 2005.
- [72] V. Sahade, S. França, and L. F. Adan, "The influence of weight excess on the postprandial lipemia in adolescents," *Lipids Health Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2013.
- [73] G. Vansant, A. Mertens, and E. Muls, "Determinants of postprandial lipemia in obese women," *Int. J. Obes.*, vol. 23, pp. 14–21, 1999.
- [74] W. B. KANNEL, "Cholesterol in the Prediction of Atherosclerotic Disease," *Ann. Intern. Med.*, vol. 90, no. 1, p. 85, 1979.
- [75] M. F. Piepoli *et al.*, "2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice," *Eur. Heart J.*, vol. 37, no. 29, pp. 2315–2381, 2016.

- [76] F. Mach *et al.*, “2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk,” *Atherosclerosis*, vol. 290, no. August, pp. 140–205, 2019.
- [77] L. E. Akioyamen *et al.*, “Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: A systematic review and meta-analysis,” *BMJ Open*, vol. 7, no. 9, pp. 1–13, 2017.
- [78] B. Sjouke *et al.*, “Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: Prevalence, genotype-phenotype relationship, and clinical outcome,” *Eur. Heart J.*, vol. 36, no. 9, pp. 560–565, 2015.
- [79] P. M. Ridker *et al.*, “Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 12, pp. 1119–1131, 2017.
- [80] J. Danesh and M. B. Pepys, “C-reactive protein and coronary disease: Is there a causal link?,” *Circulation*, vol. 120, no. 21, pp. 2036–2039, 2009.
- [81] Y. C. Doo *et al.*, “Associations between C-reactive protein and circulating cell adhesion molecules in patients with unstable angina undergoing coronary intervention and their clinical implication,” *Clin. Cardiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 47–51, 2005.
- [82] U. Ikeda, M. Takahashi, and K. Shimada, “C-Reactive Protein Directly Inhibits Nitric Oxide Production by Cytokine-stimulated Vascular Smooth Muscle Cells,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 42, no. 5, pp. 607–611, 2003.
- [83] P. Duewell *et al.*, “NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals,” *Nature*, vol. 464, no. 7293, pp. 1357–1361, 2010.
- [84] C. C. Patterson, A. E. Smith, J. W. G. Yarnell, A. Rumley, Y. Ben-Shlomo, and G. D. O. Lowe, “The associations of interleukin-6 (IL-6) and downstream inflammatory markers with risk of cardiovascular disease: The Caerphilly Study,” *Atherosclerosis*, vol. 209, no. 2, pp. 551–557, 2010.
- [85] Ms. Hendrik B. Sager, MD*; Timo Heidt, MD*; Maarten Hulsmans, PhD; Partha Dutta, DVM, PhD; Gabriel Courties, PhD; Matthew Sebas, BA; Gregory R. Wojtkiewicz and P. Benoit Tricot, MSc; Yoshiko Iwamoto, BS; Yuan Sun, MD, PhD; Ralph Weissleder, MD, PhD; Peter Libby,

- MD; Filip K. Swirski, PhD; Matthias Nahrendorf, MD, "Targeting Interleukin-1 β Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction," *Circulation*, vol. 132, pp. 1880–1890, 2015.
- [86] A. Gisterå and G. K. Hansson, "The immunology of atherosclerosis," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 13, no. 6, pp. 368–380, 2017.
- [87] M. Jankowich, G. Choudhary, T. H. Taveira, and W. C. Wu, "Age-, race-, and gender-specific prevalence of diabetes among smokers," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 93, no. 3, pp. e101–e105, 2011.
- [88] A. Endo, "The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors," *Journal of lipid research*, vol. 33, pp. 1569–1582, 1992.
- [89] A. Endo, M. Kuroda, and Y. Tsujita, "ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by penicillium citrinum," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 29, no. 12, pp. 1346–1348, 1976.
- [90] P. P. Toth and M. Banach, "Statins: Then and Now," *Methodist Debaquey Cardiovasc. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 23–31, 2019.
- [91] R. K. Akyea, J. Kai, N. Qureshi, B. Iyen, and S. F. Weng, "Sub-optimal cholesterol response to initiation of statins and future risk of cardiovascular disease," *Heart*, vol. 105, no. 13, pp. 975–981, 2019.
- [92] R. Schnitzer-Polokoff, D. Compton, G. Boykow, H. Davis, and R. Burrier, "Effects of acyl-CoA: Cholesterol O-acyltransferase inhibition on cholesterol absorption and plasma lipoprotein composition in hamsters," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.*, vol. 99, no. 4, pp. 665–670, 1991.
- [93] S. W. Altmann *et al.*, "Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption," *Science (80-.)*, vol. 303, no. 5661, pp. 1201–1204, 2004.
- [94] J. W. Clader, "The Discovery of Ezetimibe: A View from Outside the Receptor," *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [95] T. Sudhop *et al.*, "Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption by Ezetimibe in Humans," *Circulation*, vol. 106, no. 15, pp. 1943–1948, 2002.

- [96] A. Catapano, P. P. Toth, J. E. Tomassini, and A. M. Tershakovec, "The efficacy and safety of ezetimibe coadministered with statin therapy in various patient groups," *Clin. Lipidol.*, vol. 8, no. 1, pp. 13–41, 2013.
- [97] C. P. Cannon *et al.*, "Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 25, pp. 2387–2397, 2015.
- [98] K. Simons and W. L. C. Vaz, "Model systems, lipid rafts, and cell membranes," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 33, pp. 269–295, 2004.
- [99] S. Ishibashi, M. Schwar, P. K. Frykman, J. Herz, and D. W. Russell, "Disruption of Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice I. POSTNATAL LETHALITY REVERSED BY BILE ACID AND VITAMIN SUPPLEMENTATION," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 30, pp. 18024–18031, 1996.
- [100] M. Schwarz *et al.*, "Disruption of Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 30, pp. 18024–18031, 1996.
- [101] I. Björkhem, "Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver," *New Compr. Biochem.*, vol. 12, no. C, pp. 231–278, 1985.
- [102] A. H. Payne and D. B. Hales, "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones," *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 6, pp. 947–970, 2004.
- [103] O. F. Kuzu, M. A. Noory, and G. P. Robertson, "The role of cholesterol in cancer," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 8, pp. 2063–2070, 2016.
- [104] C. Perego, L. Da Dalt, A. Pirillo, A. Galli, A. L. Catapano, and G. D. Norata, "Cholesterol metabolism, pancreatic β -cell function and diabetes," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 9, pp. 2149–2156, 2019.
- [105] K. J. Anstey, K. Ashby-Mitchell, and R. Peters, "Updating the evidence on the association between serum cholesterol and risk of late-life dementia: Review and meta-analysis," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 56, no. 1, pp. 215–228, 2017.
- [106] L. Y. Yang, A. Kuksis, J. J. Myher, and G. Steiner, "Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: Structural studies," *J. Lipid Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 125–136, 1995.
- [107] L. Yao *et al.*, "Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy

- humans: Solubilization of cholesterol after a meal," *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 654–660, 2002.
- [108] H. R. Davis and S. W. Altmann, "Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1791, no. 7, pp. 679–683, 2009.
- [109] M. H. Lee *et al.*, "Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 1, pp. 79–83, 2001.
- [110] K. Lu *et al.*, "Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: Genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 69, no. 2, pp. 278–290, 2001.
- [111] M. A. Valasek, S. L. Clarke, and J. J. Repa, "Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPAR α -dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse," *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 12, pp. 2725–2735, 2007.
- [112] C. L. J. Vrans *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux," *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 10, pp. 2046–2054, 2009.
- [113] T. Kikuchi *et al.*, "Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression," *Mol. Metab.*, vol. 5, no. 11, pp. 1092–1102, 2016.
- [114] L. Yu *et al.*, "Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol," *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 5, pp. 671–680, 2002.
- [115] L. Yu *et al.*, "Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 25, pp. 16237–16242, 2002.
- [116] E.-G. Yoo, "Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management," *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 1, p. 7, 2016.
- [117] M. Norlin and K. Wikvall, "Enzymes in the Conversion of Cholesterol into Bile Acids," *Curr. Mol. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 199–218, 2007.
- [118] W. M. SPERRY., "LIPIDS WITH SPECIAL REFERENCE TO CERTAIN PROBLEMS OF

- STEROL METABOLISM . * of Lipid Excretion . IV," *J. Biol. Chem.*, vol. 71, pp. 351–378, 1927.
- [119] A. E. van der Velde *et al.*, "Direct Intestinal Cholesterol Secretion Contributes Significantly to Total Fecal Neutral Sterol Excretion in Mice," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 3, pp. 967–975, Sep. 2007.
- [120] N. G. Seidah *et al.*, "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation," *PNAS*, 2003.
- [121] M. Abifadel *et al.*, "Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia," *Nat. Genet.*, 2003.
- [122] K. N. Maxwell and J. L. Breslow, "Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype," *PNAS*, 2004.
- [123] J. Cohen, A. Pertsemlidis, I. K. Kotowski, R. Graham, C. K. Garcia, and H. H. Hobbs, "Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9," *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 2, pp. 161–165, 2005.
- [124] N. G. Seidah, M. S. Sadr, M. Chrétien, and M. Mbikay, "The multifaceted proprotein convertases: Their unique, redundant, complementary, and opposite functions," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 30, pp. 21473–21481, 2013.
- [125] T. A. L. Samantha K. Sarkar, Alexander C.Y. Foo, Angela Matyas, Tanja Kosenko, Natalie K. Goto, Ariela Vergara-Jaque, "A transient amphipathic helix in PCSK9's prodomain facilitates low-density lipoprotein binding," *J Biol Chem*, vol. 295, no. 8, pp. 2285–2298, 2020.
- [126] S. Poirier *et al.*, "Dissection of the Endogenous Cellular Pathways of PCSK9-induced Low Density Lipoprotein Receptor Degradation EVIDENCE FOR AN INTRACELLULAR ROUTE," 2009.
- [127] D. W. Zhang *et al.*, "Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 25, pp. 18602–18612, 2007.
- [128] T. S. Fisher *et al.*, "Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 28, pp. 20502–20512, 2007.
- [129] D. Cunningham *et al.*, "Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to

- familial hypercholesterolemia," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, no. 5, pp. 413–419, May 2007.
- [130] M. C. McNutt, T. A. Lagace, and J. D. Horton, "Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 29, pp. 20799–20803, 2007.
- [131] A. Grefhorst, M. C. McNutt, T. A. Lagace, and J. D. Horton, "Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 6, pp. 1303–1311, 2008.
- [132] B. G. Nordestgaard *et al.*, "Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 45, pp. 3478–3490, 2013.
- [133] P. D. Stenson, M. Mort, E. V. Ball, K. Shaw, A. D. Phillips, and D. N. Cooper, "The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine," *Hum. Genet.*, vol. 133, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [134] M. Abifadel *et al.*, "Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia," *Atherosclerosis*, vol. 223, no. 2, pp. 394–400, 2012.
- [135] J. Cameron, Ø. L. Holla, T. Ranheim, M. A. Kulseth, K. E. Berge, and T. P. Leren, "Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 9, pp. 1551–1558, 2006.
- [136] M. Abifadel *et al.*, "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.*, vol. 16, no. 9, 2014.
- [137] S. Benjannet *et al.*, "NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: Zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 47, pp. 48865–48875, 2004.
- [138] T. Fasano, X. M. Sun, D. D. Patel, and A. K. Soutar, "Degradation of LDLR protein mediated by 'gain of function' PCSK9 mutants in normal and ARH cells," *Atherosclerosis*, vol. 203, no. 1, pp. 166–171, 2009.

- [139] M. T. Lipari *et al.*, "Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 52, pp. 43482–43491, 2012.
- [140] S. Benjannet, D. Rhainds, J. Hamelin, N. Nassoury, and N. G. Seidah, "The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 41, pp. 30561–30572, 2006.
- [141] J. Cameron *et al.*, "Characterization of novel mutations in the catalytic domain of the PCSK9 gene," *J. Intern. Med.*, vol. 263, no. 4, pp. 420–431, 2008.
- [142] N. G. Seidah, Z. Awan, M. Chrétien, and M. Mbikay, "PCSK9: A key modulator of cardiovascular health," *Circ. Res.*, vol. 114, no. 6, pp. 1022–1036, 2014.
- [143] N. Bergeron, B. A. P. Phan, Y. Ding, A. Fong, and R. M. Krauss, "Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition a new therapeutic mechanism for reducing cardiovascular disease risk," *Circulation*, vol. 132, no. 17, pp. 1648–1666, 2015.
- [144] T. Dewpura *et al.*, "PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans," *FEBS J.*, vol. 275, no. 13, pp. 3480–3493, 2008.
- [145] Z. Zhao *et al.*, "Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 79, no. 3, pp. 514–523, 2006.
- [146] B. Cariou *et al.*, "PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 12, pp. 2191–7, Dec. 2009.
- [147] M. J. Bottomley *et al.*, "Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 2, pp. 1313–1323, 2009.
- [148] G. Dubuc *et al.*, "A new method for measurement of total plasma PCSK9: Clinical applications," *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 140–149, 2010.
- [149] G. Dubuc *et al.*, "Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase

- neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1454–1459, 2004.
- [150] J. J. Hyun, H. S. Lee, K. S. Kim, Y. K. Kim, D. Yoon, and W. P. Sahng, "Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 2, pp. 399–409, 2008.
- [151] J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver," *J Clin Invest*, vol. 109, no. 9, pp. 1125–1131, 2002.
- [152] R. Sato, "Sterol metabolism and SREBP activation," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 501, no. 2, pp. 177–181, 2010.
- [153] M. S. Brown, A. Radhakrishnan, and J. L. Goldstein, *Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap*, vol. 87. 2018.
- [154] S. Rashid *et al.*, "Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 15, pp. 5374–9, Apr. 2005.
- [155] P. Costet *et al.*, "Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 10, pp. 6211–6218, 2006.
- [156] H. Li, B. Dong, S. W. Park, H. S. Lee, W. Chen, and J. Liu, "Hepatocyte nuclear factor 1 α plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 42, pp. 28885–28895, 2009.
- [157] S. Kourimate *et al.*, "Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 15, pp. 9666–9673, 2008.
- [158] Y. Duan *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by ligands and dephosphorylation induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and low density lipoprotein receptor expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 28, pp. 23667–23677, 2012.
- [159] C. Langhi *et al.*, "Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes," *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 6, pp. 949–55, Mar. 2008.
- [160] H. Li and J. Liu, "The novel function of HINFP as a co-activator in sterol-regulated transcription

- of PCSK9 in HepG2 cells," *Biochem. J.*, vol. 443, no. 3, pp. 757–768, 2012.
- [161] M. Melone, L. Wilsie, O. Palyha, A. Strack, and S. Rashid, "Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 59, no. 19, pp. 1697–1705, 2012.
- [162] M. X. Miranda *et al.*, "The Sirt1 activator SRT3025 provides atheroprotection in Apoe^{-/-} mice by reducing hepatic Pcsk9 secretion and enhancing Ldlr expression," *Eur. Heart J.*, vol. 36, no. 1, pp. 51–59, 2015.
- [163] X. W. Chen *et al.*, "SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion," *Elife*, vol. 2013, no. 2, pp. 1–23, 2013.
- [164] V. S. Tagliabracci *et al.*, "A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome," *Cell*, vol. 161, no. 7, pp. 1619–1632, 2015.
- [165] A. Ben Djoudi Ouadda *et al.*, "Ser-phosphorylation of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin-Kexin 9) by Fam20C (Family with Sequence Similarity 20, Member C) kinase enhances its ability to degrade the LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor)," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, no. 10, pp. 1996–2013, 2019.
- [166] R. Essalmani *et al.*, "In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4257–4263, 2011.
- [167] S. Poirier *et al.*, "The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 4, pp. 2363–2372, 2008.
- [168] M. Canuel, X. Sun, M. C. Asselin, E. Paramithiotis, A. Prat, and N. G. Seidah, "Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1)," *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013.
- [169] A. Roubtsova *et al.*, "Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 4, pp. 785–791, 2011.
- [170] P. Labonté *et al.*, "PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81

- expression," *Hepatology*, vol. 50, no. 1, pp. 17–24, 2009.
- [171] R. S. Wright *et al.*, "Effects of Renal Impairment on the Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Inclisiran: An Analysis of the ORION-7 and ORION-1 Studies," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 95, no. 1, pp. 77–89, 2020.
- [172] K. K. Ray *et al.*, "Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol.," *N. Engl. J. Med.*, p. NEJMoa1912387, 2020.
- [173] M. Sioud, "Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization," *J. Mol. Biol.*, vol. 348, no. 5, pp. 1079–1090, 2005.
- [174] Z. Meng and M. Lu, "RNA interference-induced innate immunity, off-target effect, or immune adjuvant?," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. MAR, pp. 1–7, 2017.
- [175] U. Landmesser *et al.*, "Effect of inclisiran, the siRNA against PCSK9, on platelets, immune cells and immunological biomarkers - a pre-specified analysis from ORION-1," *Cardiovasc. Res.*, 2020.
- [176] D. S. Kazi *et al.*, "Cost-Effectiveness of PCSK9 inhibitor therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or atherosclerotic cardiovascular disease," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 316, no. 7, pp. 743–753, 2016.
- [177] A. Zaid *et al.*, "Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration," *Hepatology*, vol. 48, no. 2, pp. 646–654, 2008.
- [178] L. R. Brunham *et al.*, "Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 4, pp. 1052–1062, 2006.
- [179] F. Briand *et al.*, "Both the peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-Derived cholesterol," *Clin. Transl. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 127–133, 2009.
- [180] A. E. van der Velde *et al.*, "Direct Intestinal Cholesterol Secretion Contributes Significantly to Total Fecal Neutral Sterol Excretion in Mice," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 3, pp. 967–975, 2007.

- [181] R. E. Temel *et al.*, "Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport," *Cell Metab.*, vol. 12, no. 1, pp. 96–102, 2010.
- [182] E. Levy *et al.*, "PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells," *Atherosclerosis*, vol. 227, no. 2, pp. 297–306, 2013.
- [183] C. Le May *et al.*, "Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1484–1493, 2013.
- [184] M. Peach *et al.*, "Effect of evolocumab on cholesterol synthesis and absorption," *J. Lipid Res.*, vol. 57, no. 12, pp. 2217–2224, 2016.
- [185] G. F. Watts *et al.*, "Factorial effects of evolocumab and atorvastatin on lipoprotein metabolism," *Circulation*, vol. 135, no. 4, pp. 338–351, 2017.
- [186] D. Pertsemlidis, E. H. Kirchman, and E. H. Ahrens, "Regulation of Cholesterol Metabolism in the Dog," *J. Clin. Invest.*, vol. 52, no. 9, pp. 2368–2378, 1973.
- [187] J. N. Van Der Veen *et al.*, "Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-intestinal Excretion of Plasma Cholesterol," 2009.
- [188] L. Jakulj *et al.*, "Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 6, pp. 783–794, 2016.
- [189] F. Moreau *et al.*, "In vivo evidence for transintestinal cholesterol efflux in patients with complete common bile duct obstruction," *J. Clin. Lipidol.*, vol. 13, no. 1, pp. 213–217.e1, 2019.
- [190] W. Dijk, C. Le May, and B. Cariou, "Beyond LDL: What Role for PCSK9 in Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism?," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 6, pp. 420–434, Jun. 2018.
- [191] A. Baass *et al.*, "Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents," *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 9, pp. 1637–1645, 2009.
- [192] S. G. Lakoski, T. A. Lagace, J. C. Cohen, J. D. Horton, and H. H. Hobbs, "Genetic and Metabolic Determinants of Plasma PCSK9 Levels," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 7, pp. 2537–2543, Jul. 2009.

- [193] S. Laugier-Robiolle *et al.*, "Glycaemic control influences the relationship between plasma PCSK9 and LDL cholesterol in type 1 diabetes," *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 19, no. 3, pp. 448–451, 2017.
- [194] M. C. G. J. Brouwers *et al.*, "Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: ," *Atherosclerosis*, vol. 217, no. 1, pp. 263–267, 2011.
- [195] M. Morena *et al.*, "Plasma PCSK9 concentrations during the course of nondiabetic chronic kidney disease: Relationship with glomerular filtration rate and lipid metabolism," *J. Clin. Lipidol.*, vol. 11, no. 1, pp. 87–93, 2017.
- [196] F. Boccarda *et al.*, "Impact of protease inhibitors on circulating PCSK9 levels in HIV-infected antiretroviral-naïve patients from an ongoing prospective cohort," *Aids*, vol. 31, no. 17, pp. 2367–2376, 2017.
- [197] M. C. G. J. Brouwers, M. M. J. Van Greevenbroek, R. J. Konrad, J. S. Troutt, N. C. Schaper, and C. D. A. Stehouwer, "Circulating PCSK9 is a strong determinant of plasma triacylglycerols and total cholesterol in homozygous carriers of apolipoprotein ε2," *Clin. Sci.*, vol. 126, no. 9, pp. 679–684, 2014.
- [198] K. Ouguerram *et al.*, "Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1448–1453, 2004.
- [199] R. P. Naoumova *et al.*, "Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: Long-term follow-up and treatment response," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 12, pp. 2654–2660, 2005.
- [200] X. M. Sun *et al.*, "Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 9, pp. 1161–1169, 2005.
- [201] I. K. Kotowski *et al.*, "A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 78, no. 3, pp. 410–422, 2006.

- [202] J. Mayne *et al.*, “Differential effects of PCSK9 loss of function variants on serum lipid and PCSK9 levels in Caucasian and African Canadian populations,” *Lipids Health Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [203] J. M. Anderson *et al.*, “Influence of PCSK9 polymorphisms on plasma lipids and response to atorvastatin treatment in Brazilian subjects,” *J. Clin. Lipidol.*, vol. 8, no. 3, pp. 256–264, 2014.
- [204] M. D. Jonathan C. Cohen, Ph.D., Eric Boerwinkle, Ph.D., Thomas H. Mosley, Jr., Ph.D., and Helen H. Hobbs, “Sequence Variations in PCSK9, Low LDL, and Protection against Coronary Heart Disease,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 1264–1272, 2006.
- [205] W. P. Sahng, Y. A. Moon, and J. D. Horton, “Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 48, pp. 50630–50638, 2004.
- [206] F. Lalanne *et al.*, “Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells,” *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 1312–1319, 2005.
- [207] S. Rashid *et al.*, “Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9,” *PNAS*, 2005.
- [208] H. Sun, A. Samarghandi, N. Zhang, Z. Yao, M. Xiong, and B. B. Teng, “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.*, vol. 32, no. 7, pp. 1585–1595, 2012.
- [209] M. S. Sabatine *et al.*, “Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 18, pp. 1713–1722, May 2017.
- [210] J. G. Robinson *et al.*, “Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 16, pp. 1489–1499, 2015.
- [211] P. P. Toth *et al.*, “Effect of alirocumab on specific lipoprotein non-high-density lipoprotein cholesterol and subfractions as measured by the vertical auto profile method: Analysis of 3 randomized trials versus placebo,” *Lipids Health Dis.*, vol. 15, no. 1, 2016.
- [212] K. K. Ray *et al.*, “Alirocumab vs usual lipid-lowering care as add-on to statin therapy in

- individuals with type 2 diabetes and mixed dyslipidaemia: The ODYSSEY DM-DYSLIPIDEMIA randomized trial," *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 20, no. 6, pp. 1479–1489, 2018.
- [213] K. K. Ray *et al.*, "Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol," *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 15, pp. 1430–1440, 2017.
- [214] C. Le May *et al.*, "Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 5, pp. 684–690, 2009.
- [215] T. C. Ooi *et al.*, "The Effect of PCSK9 Loss-of-Function Variants on the Postprandial Lipid and ApoB-Lipoprotein Response," *J Clin Endocrinol Metab*, 2017.
- [216] D. C. Chan, G. F. Watts, R. Somaratne, S. M. Wasserman, R. Scott, and P. H. R. Barrett, "Comparative effects of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) inhibition and statins on postprandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 38, no. 7, pp. 1644–1655, 2018.
- [217] G. Reyes-Soffer *et al.*, "Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans," *Circulation*, vol. 135, pp. 352–362, 2017.
- [218] B. Burggraaf *et al.*, "Reduced Fasting And Postprandial Triglyceride Levels By Alirocumab In Male Diabetes Patients On Intensive Insulin Treatment By Improved Chylomicron Metabolism," *Atherosclerosis*, vol. 287, no. 2019, p. e44, 2019.
- [219] M. R. Taskinen *et al.*, "Impact of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition with evolocumab on the postprandial responses of triglyceride-rich lipoproteins in type II diabetic subjects," *J. Clin. Lipidol.*, no. 2019, 2020.
- [220] M. E. Roehrich *et al.*, "Insulin-secreting β -cell dysfunction induced by human lipoproteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 18368–18375, 2003.
- [221] M. Cnop, J. C. Hannaert, A. Y. Gruppig, and D. G. Pipeleers, "Low density lipoprotein can cause death of islet β -cells by its cellular uptake and oxidative modification," *Endocrinology*, vol. 143, no. 9, pp. 3449–3453, 2002.
- [222] N. Sattar *et al.*, "Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials," *Lancet*, vol. 375, no. 9716, pp. 735–742, 2010.

- [223] D. Preiss *et al.*, “Risk of Incident Diabetes With Intensive-Dose Compared With Moderate-Dose Statin Therapy,” *Jama*, vol. 305, no. 24, pp. 2556–2564, 2011.
- [224] C. R. Dormuth *et al.*, “Higher potency statins and the risk of new diabetes: Multicentre, observational study of administrative databases,” *BMJ*, vol. 348, no. May, pp. 1–9, 2014.
- [225] P. Kohli *et al.*, “Risk of new-onset diabetes and cardiovascular risk reduction from high-dose statin therapy in pre-diabetics and non-pre-diabetics: An analysis from TNT and IDEAL,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 65, no. 4, pp. 402–404, 2015.
- [226] D. I. Swerdlow and D. Preiss, “Genetic insights into statin-associated diabetes risk,” *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 27, no. 2, pp. 125–130, 2016.
- [227] J. Besseling, J. J. P. Kastelein, J. C. Defesche, B. A. Hutten, and G. K. Hovingh, “Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 313, no. 10, pp. 1029–1036, 2015.
- [228] C. Langhi *et al.*, “PCSK9 is expressed in pancreatic δ -cells and does not alter insulin secretion,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 4, pp. 1288–1293, Dec. 2009.
- [229] M. Mbikay *et al.*, “PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities,” *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 4, pp. 701–706, Feb. 2010.
- [230] L. Da Dalt *et al.*, “PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor,” *Eur. Heart J.*, Jul. 2018.
- [231] L. A. Lotta *et al.*, “Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Genetic Variants and Risk of Type 2 Diabetes,” *JAMA*, vol. 316, no. 13, p. 1383, Oct. 2016.
- [232] A. F. Schmidt *et al.*, “PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 5, no. 2, pp. 97–105, 2017.
- [233] B. A. Ference *et al.*, “Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 22, pp. 2144–2153, 2016.
- [234] H. M. Colhoun *et al.*, “No effect of PCSK9 inhibitor alirocumab on the incidence of diabetes in a pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies,” *Eur. Heart J.*, vol. 37, no. 39, pp. 2981–2989, 2016.

- [235] M. S. Sabatine *et al.*, “Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 5, no. 12, pp. 941–950, 2017.
- [236] S. Ramin-Mangata *et al.*, “Circulating PCSK9 levels are not associated with the conversion to type 2 diabetes,” *Atherosclerosis*, vol. 293, no. September 2019, pp. 49–56, 2020.
- [237] V. Bhalla and K. R. Hallows, “Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1845–1854, 2008.
- [238] S. Sheng, M. D. Carattino, J. B. Bruns, R. P. Hughey, and T. R. Kleyman, “Furin cleavage activates the epithelial Na⁺ channel by relieving Na⁺ self-inhibition,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 290, no. 6, pp. 1488–1496, 2006.
- [239] V. Sharotri, D. M. Collier, D. R. Olson, R. Zhou, and P. M. Snyder, “Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 23, pp. 19266–74, Jun. 2012.
- [240] J.-M. Berger *et al.*, “PCSK9-deficiency does not alter blood pressure and sodium balance in mouse models of hypertension,” *Atherosclerosis*, vol. 239, no. 1, pp. 252–259, Mar. 2015.
- [241] N. T. Tran *et al.*, “PCSK9 variation and association with blood pressure in African Americans: Preliminary findings from the HyperGEN and REGARDS studies,” *Front. Genet.*, vol. 6, no. APR, pp. 1–7, 2015.
- [242] P. P. Toth *et al.*, “Efficacy and safety of lipid lowering by alirocumab in chronic kidney disease,” *Kidney Int.*, vol. 93, no. 6, pp. 1397–1408, 2018.
- [243] D. M. Charytan *et al.*, “Efficacy and Safety of Evolocumab in Chronic Kidney Disease in the FOURIER Trial,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 73, no. 23, pp. 2961–2970, 2019.
- [244] B. Emini Veseli *et al.*, “Animal models of atherosclerosis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 816, no. May, pp. 3–13, 2017.
- [245] M. Denis *et al.*, “Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice,” *Circulation*, vol. 125, no. 7, pp. 894–901, 2012.
- [246] N. Ferri *et al.*, “Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured

- smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels," *Atherosclerosis*, vol. 220, no. 2, pp. 381–386, 2012.
- [247] and S. F. Ilaria Giunzioni, Hagai Tavori, Roman Covarrubias, Amy S. Major, Lei Ding, Youmin Zhang, Rachel M. DeVay, Liang Hong, Daping Fan, Irene M. Predazzi, Shirya Rashid, MacRae F. Linton, "Local Effects of Human PCSK9 on the Atherosclerotic Lesion Ilaria," *J. Pathol.*, vol. 238, no. 1, pp. 52–62, 2016.
- [248] A. Liu and J. Frostegård, "PCSK9 plays a novel immunological role in oxidized LDL-induced dendritic cell maturation and activation of T cells from human blood and atherosclerotic plaque," *J. Intern. Med.*, vol. 284, no. 2, pp. 193–210, 2018.
- [249] G. Millonig *et al.*, "Network of Vascular-Associated Dendritic Cells in Intima of Healthy Young Individuals," *Arterioscler. Thromb.*, pp. 503–509, 2001.
- [250] A. Yilmaz *et al.*, "Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques," *Atherosclerosis*, vol. 176, no. 1, pp. 101–110, 2004.
- [251] Y. Q. Chen, J. S. Troutt, and R. J. Konrad, "PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day," *Lipids*, vol. 49, no. 5, pp. 445–455, 2014.
- [252] S. Poirier *et al.*, "Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 3, pp. 838–850, 2006.
- [253] I. Postmus *et al.*, "PCSK9 SNP rs11591147 is associated with low cholesterol levels but not with cognitive performance or noncardiovascular clinical events in an elderly population," *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 2, pp. 561–566, 2013.
- [254] R. C. BRUFFAERTS, R., MORTIER, Ph., KIEKENS, G., AUERBACH, R. P., CUIJPERS, P., DEMYTTENAERE, K., GREEN, J. G., NOCK, M. K., KESSLER, "PCSK9 variants, LDL-cholesterol, and neurocognitive impairment: The REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke (REGARDS) study," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017.
- [255] A. J. Hooper, A. D. Marais, D. M. Tanyanyiwa, and J. R. Burnett, "The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population," *Atherosclerosis*, vol. 193, no. 2, pp. 445–448, 2007.

- [256] D. An *et al.*, "Identification of PCSK9 as a novel serum biomarker for the prenatal diagnosis of neural tube defects using iTRAQ quantitative proteomics," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. December, pp. 1–11, 2015.
- [257] M. S. Sabatine *et al.*, "Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 16, pp. 1500–1509, 2015.
- [258] R. P. Giugliano *et al.*, "Cognitive function in a randomized trial of evolocumab," *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 7, pp. 633–643, 2017.
- [259] P. D. Harvey *et al.*, "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," *Eur. Heart J.*, vol. 39, no. 5, pp. 374–381, 2018.
- [260] A. Milasan, F. Dallaire, G. Mayer, and C. Martel, "Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–13, 2016.
- [261] C. Martel *et al.*, "Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice," vol. 123, no. 4, pp. 1571–1579, 2013.
- [262] Y. L. Hwee *et al.*, "Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration," *Am. J. Pathol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1328–1337, 2009.
- [263] C. Martel and G. J. Randolph, "Atherosclerosis and transit of HDL through the lymphatic vasculature," *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2013.
- [264] A. R. Tall and L. Yvan-Charvet, "Cholesterol, inflammation and innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 104–116, 2015.
- [265] S. Acton, A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger, "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor," *Science (80-.)*, vol. 271, no. 5248, pp. 518–520, 1996.
- [266] I. Akihiro *et al.*, "Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation," *New English J. Med.*, vol. 323, no. 16, pp. 1120–1123, 1990.
- [267] Y. S. Bae *et al.*, "Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: Toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent

- activation of NADPH oxidase 2," *Circ. Res.*, vol. 104, no. 2, pp. 210–218, 2009.
- [268] J. Sun *et al.*, "Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines," *Nat. Med.*, vol. 13, no. 6, pp. 719–724, 2007.
- [269] I. Bot *et al.*, "Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice," *Circulation*, vol. 115, no. 19, pp. 2516–2525, 2007.
- [270] J. Wang *et al.*, "Pharmaceutical stabilization of mast cells attenuates experimental atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice," *Atherosclerosis*, vol. 229, no. 2, pp. 304–309, 2013.
- [271] H. M. Heikkilä *et al.*, "Mast cells promote atherosclerosis by inducing both an atherogenic lipid profile and vascular inflammation," *J. Cell. Biochem.*, vol. 109, no. 3, pp. 615–623, 2010.
- [272] and D. N. G. Lianxi Liao, Ruth M. Starzyk, "Molecular Determinants of Oxidized Low-Density Lipoprotein–Induced Leukocyte Adhesion and Microvascular Dysfunction," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 437–444, 1997.
- [273] Z. Meng *et al.*, "Oxidized low-density lipoprotein induces inflammatory responses in cultured human mast cells via toll-like receptor 4," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 31, no. 6, pp. 842–853, 2013.
- [274] J. B. Atkinson, C. W. Harlan, G. C. Harlan, and R. Virmani, "The association of mast cells and atherosclerosis: A morphologic study of early atherosclerotic lesions in young people," *Hum. Pathol.*, vol. 25, no. 2, pp. 154–159, 1994.
- [275] S. Willems *et al.*, "Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 48, pp. 3699–3706, 2013.
- [276] M. Moreno *et al.*, "Circulating tryptase as a marker for subclinical atherosclerosis in obese subjects," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–6, 2014.
- [277] J. Wang *et al.*, "IgE stimulates human and mouse arterial cell apoptosis and cytokine expression and promotes atherogenesis in Apoe^{-/-} mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 9, pp. 3564–3577, 2011.
- [278] M. Kinoshita, M. Okada, M. Kara, Y. Furukawa, and A. Matsumori, "Mast cell tryptase in mast

- cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 9, pp. 1858–1863, 2005.
- [279] J. O. Kokkonen and P. T. Kovanen, "Stimulation of mast cells leads to cholesterol accumulation in macrophages in vitro by a mast cell granule-mediated uptake of low density lipoprotein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 8, pp. 2287–2291, 1987.
- [280] M. Lee-Rueckert and P. T. Kovanen, "Extracellular modifications of HDL in vivo and the emerging concept of proteolytic inactivation of pre β -HDL," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 22, no. 5, pp. 394–402, 2011.
- [281] S. Li *et al.*, "Association of plasma PCSK9 levels with white blood cell count and its subsets in patients with stable coronary artery disease," *Atherosclerosis*, vol. 234, no. 2, pp. 441–445, Jun. 2014.
- [282] Z. Tang *et al.*, "PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF- κ B activation in THP-1-derived macrophages," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 30, no. 4, pp. 931–938, 2012.
- [283] S. Kühnast *et al.*, "Alirocumab inhibits atherosclerosis, improves the plaque morphology, and enhances the effects of a statin," *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 10, pp. 2103–2112, 2014.
- [284] D. J. Dwivedi *et al.*, "Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis," *Shock*, vol. 46, no. 6, pp. 672–680, 2016.
- [285] K. R. Walley *et al.*, "PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome," *Sci Transl Med Oct.*, vol. 15, no. 6258, pp. 258–143, 2014.
- [286] K. R. Feingold, A. H. Moser, J. K. Shigenaga, S. M. Patzek, and C. Grunfeld, "Inflammation stimulates the expression of PCSK9," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 374, no. 2, pp. 341–4, Sep. 2008.
- [287] J. D. Proto *et al.*, "Hypercholesterolemia induces T cell expansion in humanized immune mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 6, pp. 2370–2375, Jun. 2018.
- [288] J. O. Kokkonen and P. T. Kovanen, "Low density lipoprotein degradation by rat mast cells. Demonstration of extracellular proteolysis caused by mast cell granules," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 27, pp. 14756–63, 1985.

- [289] A. L. Warshaw, W. A. Walker, and K. J. Isselbacher, "Protein Uptake by the Intestine: Evidence for Absorption of Intact Macromolecules," *Gastroenterology*, vol. 66, no. 5, pp. 987–992, 1974.
- [290] O. Pabst and A. M. Mowat, "Oral tolerance to food protein," *Mucosal Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 232–239, 2012.
- [291] A. Goubier *et al.*, "Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance Anne," vol. 29, no. 3, pp. 464–475, 2013.
- [292] A. W. Thomson and P. A. Knolle, "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 11, pp. 753–766, 2010.
- [293] J. L. Turnbull, H. N. Adams, and D. A. Gorard, "Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 41, no. 1, pp. 3–25, 2015.
- [294] H. A. Sampson *et al.*, "Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: Summary report - Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, no. 2, pp. 391–397, 2006.
- [295] K. D. Stone, C. Prussin, and D. D. Metcalfe, "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, pp. S73–S80, 2010.
- [296] P. Biermé, A. Nowak-Węgrzyn, and J. C. Caubet, "Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies," *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 29, no. 6, pp. 697–703, 2017.
- [297] P. Teng *et al.*, "Guidelines of Care for the Management of Atopic Dermatitis Part 4: Prevention of Disease Flares and Use of Adjunctive Therapies and Approaches," *Gynecol Oncol.*, vol. 136, no. 3, pp. 554–561, 2015.
- [298] J. M. Spergel, "Non immunoglobulin E-mediated immune reactions to foods," *Allergy, Asthma Clin. Immunol.*, vol. 2, no. 2, pp. 78–85, 2006.
- [299] D. Simon *et al.*, "Eosinophilic esophagitis is characterized by a non-IgE-mediated food hypersensitivity," *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 71, no. 5, pp. 611–620, 2016.
- [300] E. Young, M. D. Stoneham, A. Petrukevitch, J. Barton, and R. Rona, "A population study of food intolerance," *Lancet*, vol. 343, no. 8906, pp. 1127–1130, 1994.

- [301] T. Zuberbier *et al.*, "Prevalence of adverse reactions to food in Germany - A population study," *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 59, no. 3, pp. 338–345, 2004.
- [302] A. H. Liu *et al.*, "National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 126, no. 4, pp. 798-806.e14, 2010.
- [303] S. L. Prescott *et al.*, "A global survey of changing patterns of food allergy burden in children," *World Allergy Organ. J.*, vol. 6, no. 1, p. 21, Dec. 2013.
- [304] Y. Hu, J. Chen, and H. Li, "Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999," *Pediatr. Int.*, vol. 52, no. 5, pp. 820–824, 2010.
- [305] C. Venter *et al.*, "Time trends in the prevalence of peanut allergy: Three cohorts of children from the same geographical location in the UK," *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 65, no. 1, pp. 103–108, 2010.
- [306] K. Pyrhönen, S. Näyhä, M. Kaila, L. Hiltunen, and E. Läärä, "Occurrence of parent-reported food hypersensitivities and food allergies among children aged 1-4 yr," *Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 20, no. 4, pp. 328–338, 2009.
- [307] M. Ben-Shoshan *et al.*, "Is the prevalence of peanut allergy increasing? A 5-year follow-up study in children in Montreal," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 123, no. 4, pp. 783–788, 2009.
- [308] A. Cianferoni and J. M. Spergel, "Food allergy: review, classification and diagnosis," *Allergol. Int.*, vol. 58, no. 4, pp. 457–66, Dec. 2009.
- [309] H. Renz *et al.*, "Food allergy," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, 2018.
- [310] K. D. Jackson, L. J. D. Howie, and L. J. Akinbami, "Trends in allergic conditions among children: United States, 1997-2011.," *NCHS Data Brief*, no. 121, pp. 1–8, 2013.
- [311] A. M. Branum and S. L. Lukacs, "Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations.," *NCHS Data Brief*, no. 10, pp. 1–8, Oct. 2008.
- [312] M. S. Motosue, M. F. Bellolio, H. K. Van Houten, N. D. Shah, and R. L. Campbell, "National trends in emergency department visits and hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children," *Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 29, no. 5, pp. 538–544, 2018.

- [313] R. J. Mullins, B. K. Wainstein, E. H. Barnes, W. K. Liew, and D. E. Campbell, "Increases in anaphylaxis fatalities in Australia from 1997 to 2013," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 46, no. 8, pp. 1099–1110, 2016.
- [314] J. O. B. Hourihane, T. P. Dean, and J. O. Warner, "Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: Results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges," *Br. Med. J.*, vol. 313, no. 7056, pp. 518–521, 1996.
- [315] S. H. Sicherer, T. J. Furlong, H. H. Maes, R. J. Desnick, H. A. Sampson, and B. D. Gelb, "Genetics of peanut allergy: A twin study," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 106, no. 1 I, pp. 53–56, 2000.
- [316] M. M. Amoli *et al.*, "Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy," *Genes Immun.*, vol. 3, no. 4, pp. 220–224, 2002.
- [317] E. J. Campos Alberto *et al.*, "IL-10 gene polymorphism, but not TGF- β 1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population," *Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 19, no. 8, pp. 716–721, 2008.
- [318] X. Liu *et al.*, "Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 113, no. 3, pp. 489–495, 2004.
- [319] S. J. Brown *et al.*, "Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 127, no. 3, pp. 661–667, 2011.
- [320] David P Strachan, "Hay fever, hygiene, and household size," *Br. Med. J.*, vol. 229, pp. 1259–1260, 1989.
- [321] M. Wills-Karp, J. Santeliz, and C. L. Karp, "The germless theory of allergic disease: Revisiting the hygiene hypothesis," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 1, no. 1, pp. 69–75, 2001.
- [322] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body," *Plos Biol.*, 2016.
- [323] K. Honda and D. R. Littman, "The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease," *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 75–84, 2016.
- [324] R. Rachid and T. A. Chatila, "The role of the gut microbiota in food allergy," *Curr. Opin.*

- Pediatr.*, vol. 28, no. 6, pp. 748–753, 2016.
- [325] and C. R. N. Severine Cao, Taylor J. Feehley, “The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens,” *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 22, pp. 4258–4266, 2014.
 - [326] R. B. Canani *et al.*, “The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary allergens,” *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 243–249, 2016.
 - [327] L. Macia *et al.*, “Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome,” *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015.
 - [328] N. Singh *et al.*, “Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis,” *Immunity*, vol. 40, no. 1, pp. 128–139, 2014.
 - [329] N. Arpaia *et al.*, “Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation,” *Nature*, vol. 504, no. 7480, pp. 451–455, 2013.
 - [330] Y. Furusawa *et al.*, “Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells,” *Nature*, vol. 504, no. 7480, pp. 446–450, 2013.
 - [331] P. M. Smith *et al.*, “The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis,” *Science (80-.)*, no. August, pp. 569–574, 2013.
 - [332] F. Hayashi *et al.*, “The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5,” *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1099–1103, 2001.
 - [333] A. T. Stefká *et al.*, “Commensal bacteria protect against food allergen sensitization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 36, pp. 13145–13150, 2014.
 - [334] R. Tachdjian *et al.*, “In vivo Regulation of the Allergic Response by the Interleukin 4 Receptor Alpha Chain Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif,” *J. allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 5, pp. 1128–1136, 2010.
 - [335] M. Noval Rivas *et al.*, “A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 1, pp. 201–212, 2013.

- [336] B. Rodriguez *et al.*, "Infant gut microbiota is protective against cow's milk allergy in mice despite immature ileal T-cell response," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 79, no. 1, pp. 192–202, 2012.
- [337] O. C. Thompson-Chagoyan, J. M. Vieites, J. Maldonado, C. Edwards, and A. Gil, "Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy - A Spanish prospective case-control 6-month follow-up study," *Pediatr. Allergy Immunol.*, vol. 21, no. 2 PART 2, 2010.
- [338] I. Adlerberth *et al.*, "Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 120, no. 2, pp. 343–350, 2007.
- [339] M. B. Azad *et al.*, "Infant gut microbiota and food sensitization: Associations in the first year of life," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 45, no. 3, pp. 632–643, 2015.
- [340] S. H. Sicherer, A. W. Burks, and H. A. Sampson, "Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children.," *Pediatrics*, vol. 102, no. 1, 1998.
- [341] S. H. Sicherer *et al.*, "Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 126, no. 6, pp. 1191–1197, 2010.
- [342] G. Lack, D. Fox, K. Northstone, and J. Golding, "Factors Associated with the Development of Peanut Allergy in Childhood," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 11, pp. 977–985, 2003.
- [343] S. Bunyavanich *et al.*, "Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 133, no. 5, pp. 1373–1382, 2014.
- [344] G. Lack, "Update on risk factors for food allergy," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 129, no. 5, pp. 1187–1197, 2012.
- [345] T. Tsakok *et al.*, "Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 4, pp. 1071–1078, 2016.
- [346] E. X. L. Loo *et al.*, "Predictors of allergen sensitization in Singapore children from birth to 3 years," *Allergy, Asthma Clin. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [347] P. E. Martin *et al.*, "Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 45, no. 1, pp. 255–264, 2015.

- [348] J. H. Delong, K. H. Simpson, E. Wambre, E. A. James, D. Robinson, and W. W. Kwok, "Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 127, no. 5, pp. 1211-1218.e3, 2011.
- [349] H. L. Weiner *et al.*, "Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 809–837, 1994.
- [350] K. Suzuki, S. Kawamoto, M. Maruya, and S. Fagarasan, *GALT. Organization and dynamics leading to IgA synthesis*, 1st ed., vol. 107, no. C. Elsevier Inc., 2010.
- [351] J. Ngan and L. S. Kind, "Suppressor T Cells for IgE and IgG in Peyer ' s Patches of Mice Made Tolerant by the Oral Administration of Ovalbumin Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision • No Triage ! Every submission reviewed by p," 2018.
- [352] T. Worbs *et al.*, "Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 3, pp. 519–527, 2006.
- [353] S. Ménard, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, "Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens," *Mucosal Immunol.*, vol. 3, no. 3, pp. 247–259, 2010.
- [354] J. H. Niess *et al.*, "CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance," *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5707, pp. 254–258, 2005.
- [355] N. A. Mabbott, D. S. Donaldson, H. Ohno, I. R. Williams, and A. Mahajan, "Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium," *Mucosal Immunol.*, vol. 6, no. 4, pp. 666–677, 2013.
- [356] J. L. Coombes *et al.*, "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 8, pp. 1757–1764, 2007.
- [357] G. Matteoli *et al.*, "Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction," *Gut*, vol. 59, no. 5, pp. 595–604, 2010.
- [358] H. Hammad and B. N. Lambrecht, "Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity,"

- Immunity*, vol. 43, no. 1, pp. 29–40, Jul. 2015.
- [359] D. K. Chu *et al.*, “IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 1, pp. 187–200.e8, 2013.
 - [360] A. B. Blázquez and M. C. Berin, “Gastrointestinal Dendritic Cells Promote Th2 Skewing via OX40L,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 7, pp. 4441–4450, 2008.
 - [361] M. Noval Rivas, O. T. Burton, H. C. Oettgen, and T. Chatila, “IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 138, no. 3, pp. 801–811.e9, 2016.
 - [362] C. Galand *et al.*, “IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 138, no. 5, pp. 1356–1366, 2016.
 - [363] V. Soumelis *et al.*, “Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 7, pp. 673–680, 2002.
 - [364] H. Han, T. D. Thelen, M. R. Comeau, and S. F. Ziegler, “Thymic stromal lymphopoietin-mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 12, pp. 5442–5452, 2014.
 - [365] M. Noti *et al.*, “Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 1005–1013, 2013.
 - [366] J. B. Lee *et al.*, “IL-25 and CD4⁺ TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 4, pp. 1216–1225.e5, 2016.
 - [367] D. Vercelli and R. S. Geha, “Regulation of isotype switching,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 4, no. 6, pp. 794–797, 1992.
 - [368] L. K. Johnston, K. B. Chien, and P. J. Bryce, “The Immunology of Food Allergy,” *J. Immunol.*, vol. 192, no. 6, pp. 2529–2534, 2014.
 - [369] O. Boyman *et al.*, “EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders,” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 70, no. 7, pp. 727–754, 2015.
 - [370] O. T. Burton and H. C. Oettgen, “Beyond immediate hypersensitivity: Evolving roles for IgE

- antibodies in immune homeostasis and allergic diseases,” *Immunol. Rev.*, vol. 242, no. 1, pp. 128–143, 2011.
- [371] S. Palaniyandi, E. Tomei, Z. Li, D. H. Conrad, and X. Zhu, “CD23-Dependent Transcytosis of IgE and Immune Complex across the Polarized Human Respiratory Epithelial Cells,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 6, pp. 3484–3496, 2011.
- [372] V. Trendelenburg, N.ENZIAN, J. Bellach, S. Schnadt, B. Niggemann, and K. Beyer, “Detection of relevant amounts of cow’s milk protein in non-pre-packed bakery products sold as cow’s milk-free,” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 70, no. 5, pp. 591–597, 2015.
- [373] S. D. Narisety *et al.*, “A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 135, no. 5, pp. 1275-1282.e6, 2015.
- [374] M. Worm *et al.*, “Guideline for the management of IgE-mediated food allergies,” *Allergo J.*, vol. 24, no. 7, pp. 38–77, 2015.
- [375] A. Muraro *et al.*, “EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy,” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 69, no. 8, pp. 1008–1025, 2014.
- [376] S. M. Jones, A. W. Burks, and C. Dupont, “State of the art on food allergen immunotherapy: Oral, sublingual, and epicutaneous,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 133, no. 2, pp. 318–323, 2014.
- [377] G. B. Pajno *et al.*, “EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy,” *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 73, no. 4, pp. 799–815, 2018.
- [378] R. Berni Canani *et al.*, “Effect of Lactobacillus GG on tolerance acquisition in infants with cow’s milk allergy: A randomized trial,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 129, no. 2, 2012.
- [379] J. Hol *et al.*, “The acquisition of tolerance toward cow’s milk through probiotic supplementation: A randomized, controlled trial,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 121, no. 6, pp. 1448–1454, 2008.
- [380] M. L. K. Tang *et al.*, “Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 135, no. 3, pp. 737-744.e8, 2015.
- [381] A. Hogenkamp, L. M. Knippels, J. Garssen, and B. C. van Esch, “Supplementation of Mice with

- Specific Nondigestible Oligosaccharides during Pregnancy or Lactation Leads to Diminished Sensitization and Allergy in the Female Offspring,” *J. Nutr.*, vol. 145, no. 5, pp. 996–1002, 2015.
- [382] O. DA and S. JKH, “Prebiotics in infants for prevention of allergic disease and food allergy,” no. 3, 2013.
- [383] K. Grimshaw *et al.*, “Modifying the infant’s diet to prevent food allergy,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 102, no. 2, pp. 179–186, 2017.
- [384] F. el Marjou *et al.*, “Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium,” *Genesis*, vol. 39, no. 3, pp. 186–93, Jul. 2004.
- [385] L. Castan *et al.*, “Acid-Hydrolyzed Gliadins Worsen Food Allergies through Early Sensitization,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 62, no. 17, p. 1800159, Sep. 2018.
- [386] K. R. Walley *et al.*, “PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 258, pp. 258ra143-258ra143, Oct. 2014.
- [387] L. Castan *et al.*, “Acid-Hydrolyzed Gliadins Worsen Food Allergies through Early Sensitization,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 62, no. 17, p. 1800159, Sep. 2018.
- [388] X. Zhang *et al.*, “Dietary cholesterol is essential to mast cell activation and associated obesity and diabetes in mice,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 6, pp. 1690–1700, 2019.

Annexe

1^e article : Blanchard, C., Moreau, F., Ayer, A., Toque, L., **Garçon, D.**, Arnaud, L., Borel, F., Aguesse, A., Neunlist, M., Cariou, B., et al. (2017). Roux - en - Y gastric bypass reduces plasma cholesterol in diet - induced obese mice by affecting trans - intestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption. *Int. J. Obes.*

2^e article : Blanchard, C., Moreau, F., Chevalier, J., Ayer, A., **Garçon, D.**, Arnaud, L., Pais De Barros, J.-P., Gautier, T., Neunlist, M., Cariou, B., et al. (2017). Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice. *Obes. Surg.*

3^e article : Valentin Blanchard, **Damien Garçon**, Catherine Jaunet, Kevin Chemello, Stéphanie Billon- Crossouard, Audrey Aguesse, Aya Garfa, Gilles Famchon, Amada Torres, Cédric Le May, Matthieu Pichelin⁶, Edith Bigot-Corbel³, Gilles Lambert, Bertrand Cariou, Samy Hadja, M.C. (2020). A high-throughput mass spectrometry – based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 33, 1–36.

ORIGINAL ARTICLE

Roux-en-Y gastric bypass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting trans-intestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption

C Blanchard^{1,2,8}, F Moreau^{1,8}, A Ayer¹, L Toque¹, D Garçon¹, L Arnaud¹, F Borel^{1,2}, A Aguesse^{3,4}, M Croyal^{3,4}, M Krempf^{3,4}, X Prieur¹, M Neunlist^{5,6}, B Cariou^{1,7} and C Le May¹

OBJECTIVE: Bariatric surgery appears as the most efficient therapeutic alternative in morbidly obese patients. In addition to its efficiency to decrease body weight, it also improves metabolic complications associated to morbid obesity, including dyslipidemia. Although the cholesterol-lowering effect varies with the bariatric procedures, the underlying molecular mechanisms remain poorly defined. This study aims to assess the consequence of both restrictive (sleeve gastrectomy; SG) and malabsorptive (Roux-en-Y gastric bypass; RYGB) procedures on cholesterol metabolism in mice.

SUBJECTS: Ten-week-old C57BL6/J males were fed with a high-fat diet for 8–14 weeks before sleeve or RYGB surgery.

RESULTS: SG has a modest and transient effect on plasma cholesterol levels, linked to a reduction in food intake. In contrast, modified RYGB led to a sustained $\approx 35\%$ reduction in plasma cholesterol concentrations with a drastic increase in fecal cholesterol output. Mechanistically, RYGB exerts a synergistic effect on cholesterol metabolism by inducing the trans-intestinal cholesterol efflux and reducing the intestinal cholesterol absorption.

CONCLUSIONS: In mice, RYGB, but not sleeve, strongly favors plasma cholesterol elimination by concomitantly increasing trans-intestinal cholesterol excretion and by decreasing intestinal cholesterol absorption. Our models open new perspective for deciphering the hypocholesterolemic effects of bariatric procedures.

International Journal of Obesity (2018) 42, 552–560; doi:10.1038/ijo.2017.232

INTRODUCTION

Obesity is a major public health issue, with increased prevalence from 4 to 28% for men and from 6 to 36% for women in Europe (from 2003 to 2008).¹ Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension and dyslipidemia, pulling a reduction of both quality of life and life expectancy.² Currently, bariatric surgery emerges as the therapeutic alternative of choice for morbidly obese patients and is in full progress worldwide.³

A number of different surgical methods have been developed but sleeve gastrectomy (SG) and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) are the two most commonly used procedures in clinical practice.³ During the SG procedure, $\approx 80\%$ of the initial volume of the stomach is removed. SG belongs to the restrictive bariatric techniques that act by increasing satiety. The RYGB is one of the 'malabsorptive' techniques. During RYGB, a small gastric pouch (1–2% of total gastric volume) is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy that promotes a delay of digestion and absorption of nutrients. These two techniques lead to significant body weight reduction and improvement of frequently associated comorbidities (high blood pressure, diabetes and dyslipidemia) with a global higher efficiency for RYGB compared to SG.⁴

Dyslipidemia is clearly improved after bariatric surgery, but in a different manner according to the surgical techniques.⁴ In a large

meta-analysis, both SG and RYGB decrease plasma triglyceride and increase high-density lipoprotein cholesterol levels in a similar extent. In contrast, the decrease of plasma low-density lipoprotein cholesterol is more pronounced after a malabsorptive procedure (RYGB, biliopancreatic diversion) than a restrictive surgery (SG, gastric banding).⁴ These clinical observations suggest that the underlying cellular and molecular mechanisms differ between the bariatric procedures to modulate low-density lipoprotein cholesterol metabolism.

The liver is the master regulator of cholesterol metabolism and mainly acts by regulating the endogenous cholesterol synthesis and the uptake of cholesterol containing chylomicron remnants and low-density lipoprotein particles. Beyond the liver, the small intestine is the second major organ involved in cholesterol homeostasis.⁵ First, its anatomical multi-folded structure and the presence of specialized cholesterol transporters allow the efficient absorption of dietary cholesterol. More importantly, it also ensures the re-uptake of newly secreted cholesterol from biliary and non-biliary origins.^{5,6} Indeed, the existence of a non-biliary route contributing to fecal sterol loss was suspected decades ago in dogs, rats and later in humans with impaired biliary secretion, but definitively demonstrated in mice in 2007.⁷ This pathway named trans-intestinal cholesterol excretion or TICE exports plasma cholesterol directly via the intestinal barrier to the intestinal lumen.⁷ In C57BL6 mice under standard chow diet, TICE is

¹Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France; ²Service de Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes, Nantes, France; ³Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France; ⁴CRNHO, West Human Nutrition Research Center, CHU, Nantes, France; ⁵INSERM UMR 1235, Nantes France; ⁶CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France and ⁷Institut du thorax, CHU Nantes, Department of Endocrinology, Nantes, France. Correspondence: Dr C Le May, l'Institut du Thorax INSERM UMR 1087-CNRS UMR 6291, 44000 Nantes, France.

E-mail: cedric.lemay@univ-nantes.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 6 February 2017; revised 10 August 2017; accepted 27 August 2017; accepted article preview online 28 September 2017; advance online publication, 14 November 2017

responsible for 33% of the fecal cholesterol loss, that is, twice the amount excreted by the biliary pathway.⁸ Very recently, *in vivo* kinetic studies performed in humans have shown that TICE may contribute to 35% of the fecal cholesterol loss.⁹ More importantly, the pharmacological induction of TICE by ezetimibe can considerably increase the fecal neutral sterol excretion.^{8,9}

The objective of our study is to better understand the effect of bariatric surgeries on cholesterol homeostasis by assessing the consequence of two mouse models of bariatric surgery, that is, the SG and the RYGB on the intestinal cholesterol absorption, biliary excretion and TICE.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Ten-week-old C57Bl/6 mice (purchased from Charles River; L'Arbresle, France) had free access to water and high-fat diet (DIO diet 35% kcal from fat, Laboratoire Safe, Augy, France; caseine 25.8%, mineral AIN 1.30%, vitamins 1.30%, phosphate bicalcique 1.70%, calcium carbonate 0.7%, citrate potassium 2.10%, choline bitartrate 0.026%, sucrose 8.9%, cystine 0.384%, cellulose 6.5%, lard 31.7%, soybean oil 3.3% and maltodextrine 16.29%) for 8 (SG) or 10–14 weeks (RYGB) prior bariatric surgeries. The initial number of mice used in each experimental group was estimated according to previous studies implying bariatric surgery in rodents.^{10–16} Before surgery, mice were randomized on body weight and plasma cholesterol and three groups were performed: sham; pair-fed (which received the same quantity of food than SG or RYGB groups); and SG/RYGB. To promote weight gain, mice dedicated to the RYGB surgery (sham, pair-fed and bypass) received in addition to the high-fat diet, water containing 20% fructose (w/v). No blinding was performed. All experiments were approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study no. 01953.01).

Bariatric surgery

Surgical procedures that are resumed in supplemental files have been fully described in a manuscript and videos published in the Journal of Visualized Experiment.¹⁷ Briefly, the SG procedure consists to remove 80% of the stomach by discarding the greater curvature and the entire fundus of the stomach. During RYGB, a gastrojejunostomy without stomach excision is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy.

Food intake measurement

Mice were allowed to recover 1 week after surgery and were housed in individual cage. Each day, the amount of solid diet placed in the cage was weighted and the residual food was measured 24 h later. The average daily food intake was measured from day 7 after surgery to day 28 in the SG group, and from day 7 after surgery to day 35 in the RYGB group.

Glucose homeostasis assessment

For longitudinal studies, blood glucose levels were measured every Monday in fed condition (to allow a homogenous gastric emptying, food was removed at 08.00 AM and measurement performed at 11.00 AM). Oral glucose tolerance tests were performed 3 weeks after surgeries in 6 h-fasted mice. Blood glucose values were measured using a glucometer (One Touch, Lifescan, Issy les moulineaux, France) at 0, 15, 30, 60 and 120 min after an oral gavage of 20% D-glucose solution (2 g kg⁻¹).

Biochemistry

Plasma samples were collected after 3 h fasting to allow gastric emptying. Plasma total cholesterol and triglyceride concentrations were determined using a commercially available kit (SOBIODA, Montbonnot-Saint-Martin, France). Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) levels were assayed in duplicates using an enzyme-linked immunosorbent assay following the manufacturer's instructions (Circulex CY-8079, CycLex Co, Ina, Nagano, Japan).

Fecal, biliary and TICE

Three days before measurement, mice were anesthetized with isoflurane and received 0.3 mg of cholesterol-D7 in 100 µl intralipid by intrapenile

injection and oral gavage of 0.6 mg cholesterol-D5 in 200 µl olive oil, and were placed in individual cage for 3 days. Daily feces production was collected every 24 h for 3 days. The third day mice were fasted for 3 h, then anesthetized with a xylazine/ketamine solution (10/80 mg kg⁻¹, intraperitoneal injection) and placed onto a heat pad. Perfusion solution composition as well as surgical procedures to realize bile duct diversion and proximal intestinal cannulation was performed as previously described.^{7,18} Biliary and alimentary intestinal limbs were simultaneously perfused using a stable output flux of 5 ml h⁻¹ for 2 h. Blood, bile and intestinal perfusate samples were collected after the procedure and D7/D5 cholesterol content was further analyzed by gas chromatography–mass spectrometry.

RNA analysis

The intestinal mucosa was collected as previously described¹⁸ and total RNA from tissues was purified using Trizol (Life Technology, les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from cell samples was purified with the NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed and real-time quantitative PCR was performed using the TaqMan 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers were designed using the Primer Express 3.1 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and described below. Results are represented as arbitrary units indicating relative expressions by calculation based on the comparative Ct (also called ΔCt) methods after normalization to cyclophilin or 36B4 as the reference genes (indicated in the figure legend where applicable).

Western blot

The intestinal mucosa was collected as previously described¹⁹ and was homogenized in a RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA). Total lysate proteins were resolved on NuPAGE 4–12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen, Waltham, MA, USA) under reducing conditions and transferred using Iblot system onto a nitrocellulose membrane (Invitrogen). Membranes were probed with antibodies raised against the mouse low-density lipoprotein receptor (LDLR) antibody (R&D Systems Europe, Lille, France) and β-actin (Millipore, Molsheim, France). Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Statistics

All results are reported as means ± s.e.m. Statistical significance was analyzed using analysis of variance test and non-parametric Mann–Whitney test, with Graphprism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). The values of *P* < 0.05 were considered as significant.

RESULTS

SG and RYGB reduce body weight and improve glucose homeostasis

To assess the effects of bariatric surgeries on cholesterol metabolism, we adapted two models of bariatric surgeries routinely performed in clinical practice, in mice: SG (Supplementary Figure S1A) and a modified version of the RYGB (RYGB; Supplementary Figure S1B). Mice had similar body weight prior surgery. SG operated mice displayed a significant weight loss 14 days after surgery compared to sham control mice (28.7 vs 31.8 g; *P* = 0.008; Figure 1a), and a trend for epididymal fat pad weight reduction (–27%, *P* = 0.10). Both pair-fed and SG mice show a 15% reduction of food intake compared to sham control mice (Figure 1c). The extent of body weight change was more important following RYGB surgery compared to SG. Two weeks after surgery, RYGB-operated mice lost 20% of their pre-operative body weight (*P* < 0.001; Figure 1b). While we observed a significant reduction of food consumption in the RYGB mice in the first 10 days following the surgery, there was no further significant change in food intake after surgery recovery from day 10 to day 35 (Figure 1d; Supplementary Figure S3). Consistently, the epididymal fat pad weight was reduced by more than 80% in the RYGB group compared to the sham group (respectively:

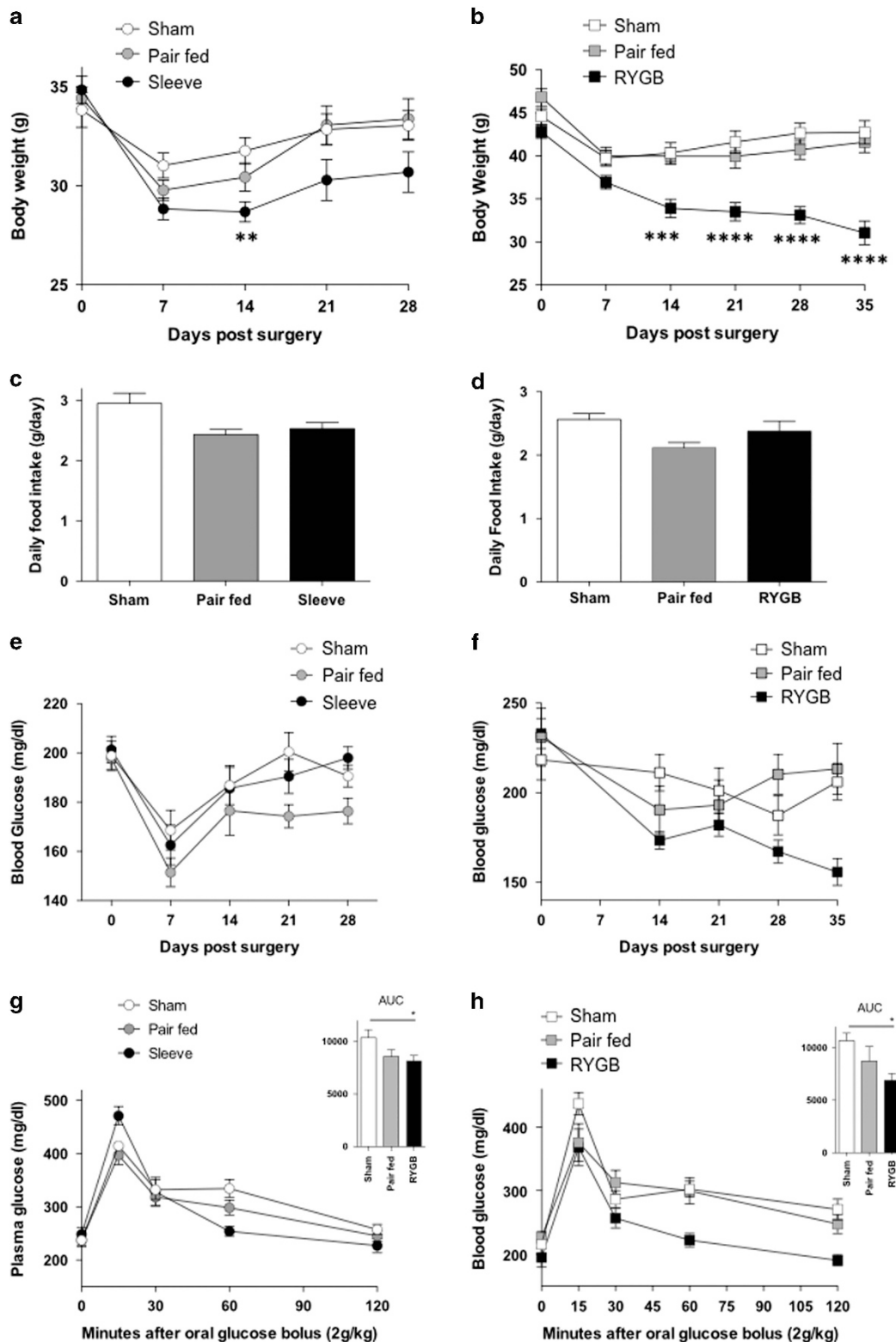


Figure 1. Effect of SG and RYGB on body weight (**a, b**); on daily food intake (**c, d**); on plasma glucose (**e, f**); and on oral glucose tolerance test (**g, h**). Inserts represent area under the curve. Data are shown as mean value $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Mann–Whitney test between sham and SG and RYGB groups. (**a, c, e, g**) Sham $n = 22$; pair fed $n = 24$; sleeve $n = 24$. (**b, d, f, h**) Sham $n = 14$; pair fed $n = 8$; RYGB $n = 19$.

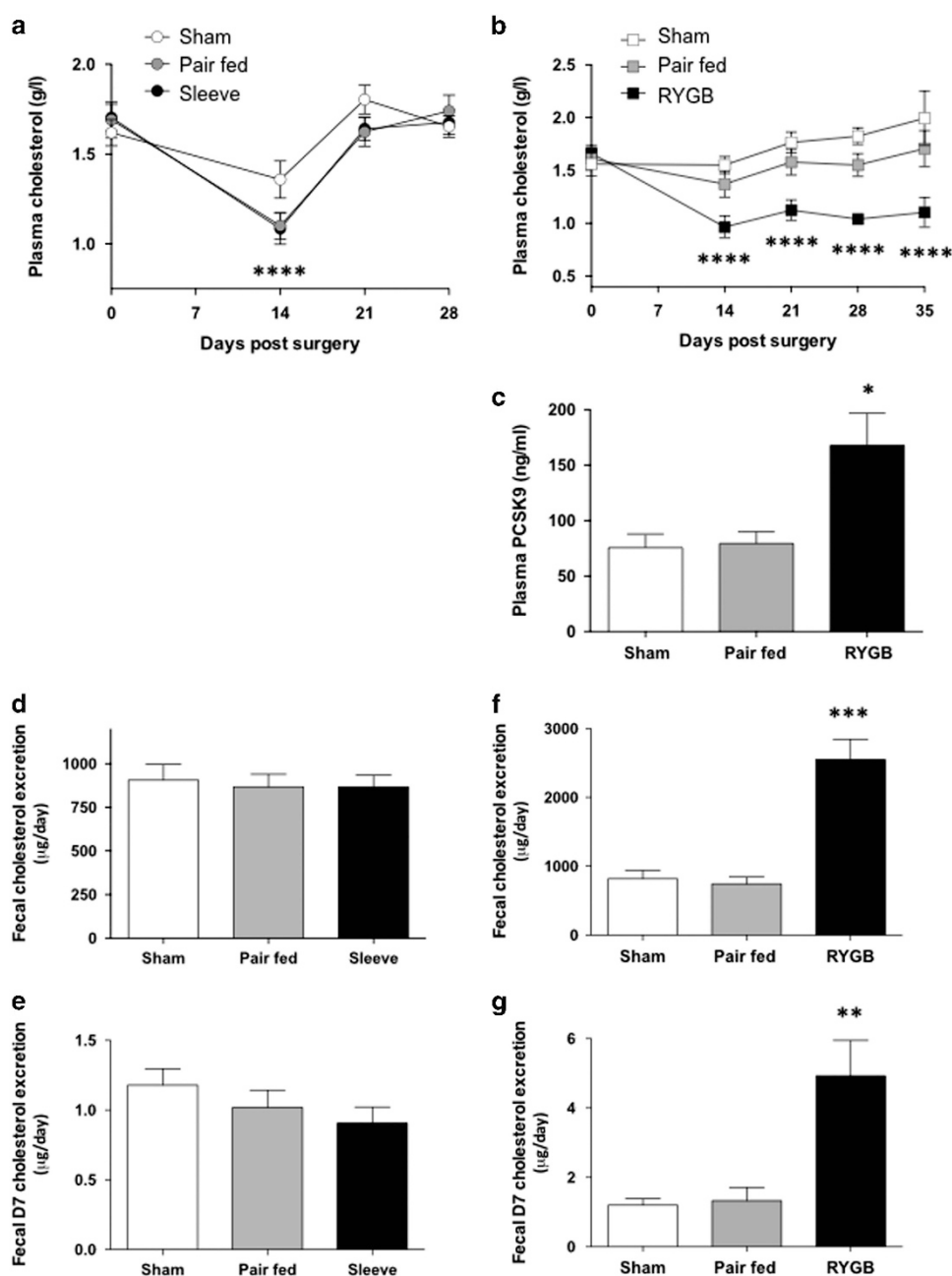


Figure 2. Effect of SG and RYGB on plasma cholesterol (a, b); effect of RYGB surgery on circulating PCSK9 levels (c); effect of SG and RYGB on fecal cholesterol excretion (d, f); and effect of SG and RYGB on fecal D7 cholesterol excretion (e, g). Data are shown as mean value $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Mann–Whitney test between sham and SG and RYGB groups. (a, d, e) Sham $n = 22$; pair fed $n = 24$; sleeve $n = 24$. (b, c, f, g) Sham $n = 14$; pair fed $n = 8$; RYGB $n = 19$.

1947 $\pm$ 123 and 352 $\pm$ 132 mg, $P < 0.0001$). Five weeks post surgery, the body weight loss reached 28% of the pre-operative weight in the RYGB group compared to only 4 and 9% in the sham and pair-fed groups (Figure 1b). Longitudinal random-fed blood glucose follow-up as well as oral glucose tolerance tests showed a significant improvement in glucose homeostasis after SG and RYGB surgeries (Figures 1e–h).

RYGB reduces plasma cholesterol concentrations by stimulating fecal cholesterol excretion

Following several weeks of high-fat diet, all mice were equally hypercholesterolemic with plasma cholesterol levels prior surgery over 1.5 g l⁻¹ (Figures 2a and b). Two weeks after SG, a significant

reduction of plasma total cholesterol was observed in both SG (–36.3%; $P < 0.0001$) and pair-fed groups (–34.9%; $P < 0.0001$), with also a trend for decrease in sham group (–16.1%, $P = 0.06$; Figure 2a).

This mild hypocholesterolemic effect was transient and lost 3 weeks after SG. The fecal cholesterol output measured 2 weeks after the SG was not significantly altered (Figure 2d). In contrast, RYGB surgery induced a strong and persistent cholesterol-lowering effect with a significant reduction of 42%, 32.4%, 37.5% and 33.7% of plasma total cholesterol concentrations 2, 3, 4 and 5 weeks after surgery, respectively ($P < 0.0001$). Importantly, no hypocholesterolemic effect was observed in the pair-fed group compared to sham control mice, suggesting that RYGB reduced plasma cholesterol levels independently of change in food intake.

Table 1. Q-PCR analysis of hepatic gene expression after RYGB: effect of bypass surgery on hepatic gene expression

	Sham	RYGB
<i>Cholesterol metabolism</i>		
SREBP2	1.00 ± 0.09	1.40 ± 0.26
HMG-CoA reductase	1.00 ± 0.12	0.96 ± 0.33
LDLR	1.00 ± 0.07	0.38 ± 0.12*
<i>LDLR inhibitor</i>		
PCSK9	1.00 ± 0.11	2.13 ± 0.49*
IDOL	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.09
<i>Remnant metabolism</i>		
LRP1	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.10
CD36	1.00 ± 0.09	0.47 ± 0.07*
ABCA1	1.00 ± 0.13	1.44 ± 0.10*
<i>Biliary cholesterol excretion</i>		
ABCG5	1.00 ± 0.05	0.37 ± 0.13*
ABCG8	1.00 ± 0.08	0.58 ± 0.19
<i>Bile acid metabolism</i>		
CYP7A1	1.00 ± 0.21	0.81 ± 0.30
FXR	1.00 ± 0.09	1.23 ± 0.11
SHP	1.00 ± 0.13	1.25 ± 0.21

Abbreviations: LDLR, low-density lipoprotein receptor; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; Q-PCR, quantitative PCR; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass. mRNA levels are normalized to cyclophilin mRNA levels. Values are means ± s.e.m. and are standardized to values measured in the sham group arbitrary set to 1. * $P < 0.05$; Mann-Whitney test between sham and RYGB groups. $n = 7$ per group.

Fast protein liquid chromatography analysis showed a disappearance of the large high-density lipoprotein peak after RYGB compared to the sham control mice (Supplementary Figure S2). Interestingly, the fecal cholesterol excretion was highly induced (+356%, $P = 0.0002$), 5 weeks after RYGB (Figure 2f). Moreover, we confirmed that plasma D7 cholesterol is excreted almost four times more in the RYGB compared to sham groups ($P = 0.006$; Figure 2g), suggesting that pathways involved in plasma cholesterol elimination are significantly increased following RYGB.

RYGB-induced hypocholesterolemia is not due to reduced plasma PCSK9 concentrations

PCSK9 is an endogenous inhibitor of the LDLR and a master regulator of plasma cholesterol homeostasis.²⁰ Thus, we determined whether the sustained hypocholesterolemic effect observed after RYGB could be linked to a reduction of PCSK9 expression. However, hepatic PCSK9 mRNA levels were significantly increased in the RYGB compared to sham group (Table 1). Consistently, plasma PCSK9 levels were significantly higher in the RYGB group compared to controls (Figure 2c). Altogether, these data indicate that PCSK9 is not involved in the hypocholesterolemic effect of RYGB.

RYGB does not affect biliary cholesterol efflux but induces TICE

Two pathways have been involved in the plasma cholesterol elimination, the classical hepatobiliary route and the newly described TICE pathway. To better understand their respective roles in the increased cholesterol fecal loss, we concomitantly measured the effect of RYGB on these two pathways. As shown in Figures 3a and b, RYGB did not affect the biliary efflux of cholesterol (Figure 3a) or plasma-injected D7 cholesterol (Figure 3b). Consistently, hepatic gene expression of the human sterol transporters ABCG5 and ABCG8 is reduced by 63% ($P < 0.05$) and 19% (not significant) in RYGB compared to sham

groups (Table 1). In contrast, the TICE was increased by 66% compared to sham procedure 5 weeks after RYGB (Figure 3c). The trans-intestinal efflux of D7 cholesterol also tended to be increased (+48.5%, $P = 0.20$), but it failed to reach significance due to higher heterogeneity of the results (Figure 3d).

RYGB surgery reduces intestinal cholesterol absorption

Finally, using the dual isotope ratio method, we measured the intestinal ability of sham control and RYGB-operated mice to absorb orally administrated cholesterol. Five weeks after surgery, fractional cholesterol absorption was about $40.8\% \pm 6.3$ in the sham group (Figure 3e), while intestinal cholesterol absorption was reduced by 36% in the RYGB group ($26.1\% \pm 4.4$). Intestinal mucosa mRNA expression analysis in the three intestinal limbs (biliary, alimentary and common) did not reveal any change in Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) transporter but found a significant decrease in CD36 and SRBI in the alimentary limb (Table 2).

RYGB alters fecal and plasma bile acids levels

To determine whether RYGB alters bile acid homeostasis in our model, we analyzed the plasma and fecal bile acids contents by mass spectrometry. We found a significant increase in total plasma bile acids levels (Figure 4a) as well as some relative changes in plasma bile acids composition after RYGB (Figure 4b). Almost all classes of bile acids were induced following RYGB but the highest changes involved cholic acid, beta and omega muricholic acid, lithocholic acid and ursodeoxycholic acid (Figure 4c). Our data also revealed an increased fecal elimination of alpha and beta muricholic acid in the RYGB compared to sham group (Figure 4d). At the hepatic level, the mRNA expression of bile acid target genes such as *CYP7A1*, *FXR* and *SHP* was unaltered (Table 1).

DISCUSSION

Bariatric surgery is the most efficient approach to reduce body weight and metabolic complications related to morbid obesity. In humans, plasma low-density lipoprotein cholesterol levels are clearly reduced after bariatric surgery, but the magnitude of the low-density lipoprotein cholesterol lowering seems to be dependent on the surgical procedures.⁴ In this study, we aim to unravel the underlying mechanisms sustaining the improvement of the hypercholesterolemia with the 2 most frequent bariatric procedures: SG and RYGB.

To address this question, we developed two mice models of SG and a modified RYGB, as described before.¹⁰ As expected,^{11–13} we observed that RYGB, and in a lesser extent SG, induce a significant reduction of body weight and adiposity as well as a significant improvement of glucose homeostasis, thereby validating our surgical models.

Importantly, we demonstrated for the first time a differential effect between SG and RYGB on cholesterol metabolism in mice. On the one hand, SG induces a modest and transient hypocholesterolemic effect, and importantly this change occurs without affecting the hepatobiliary, the trans-intestinal and the global fecal output of plasma cholesterol. This slight effect is likely due to a reduction in food intake since it was similarly observed in pair-fed mice. However, it is important to notice that previous studies reported more persistent hypocholesterolemic effect of SG in mice and rats.^{14–16} On the other hand, RYGB induces a strong and sustained cholesterol-lowering effect with an improved pattern of circulating lipoproteins. In contrast to what observed in SG, such beneficial effect does not appear to be linked to a modification in food intake as (i) our RYGB model does not affect the stomach size and the daily food intake compared to sham mice and (ii) we observed a significant reduction of total cholesterol in the RYGB

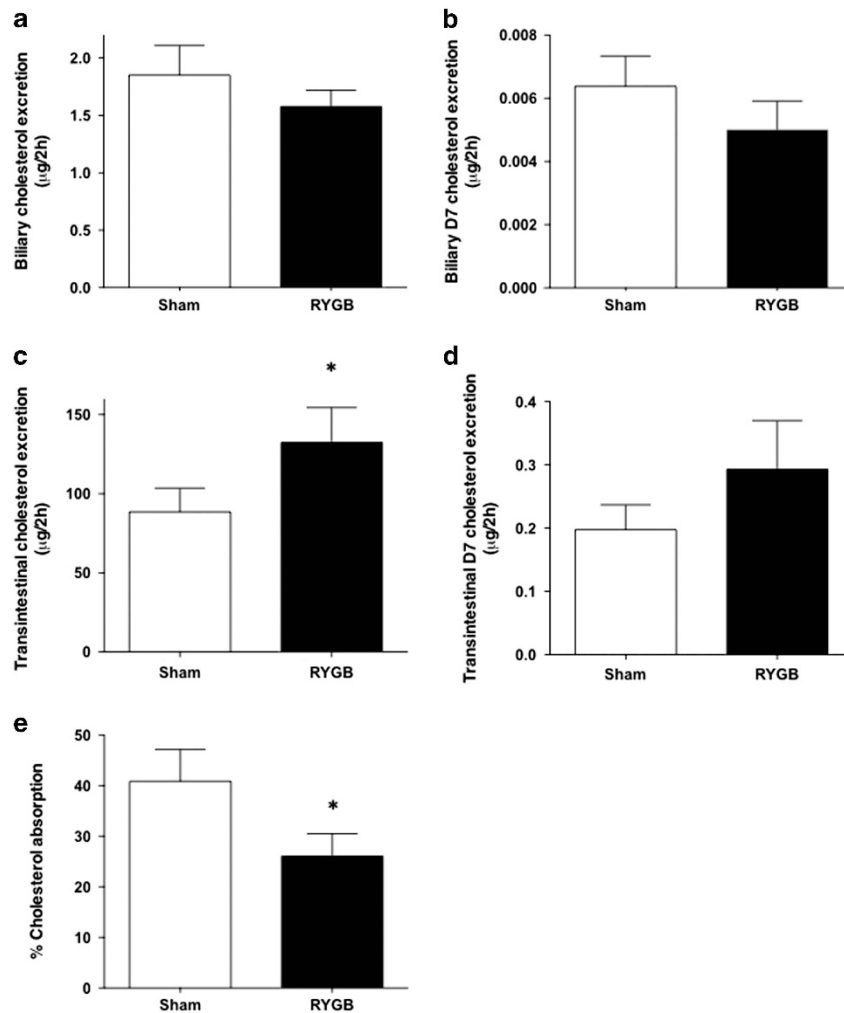


Figure 3. Effect of RYGB on biliary cholesterol excretion, sham $n = 8$, RYGB $n = 5$ (a); on D7 biliary cholesterol excretion, sham $n = 8$, RYGB $n = 5$ (b); on TICE, sham $n = 12$, RYGB $n = 8$ (c); on trans-intestinal D7 cholesterol excretion, sham $n = 12$, RYGB $n = 8$ (d); and on intestinal cholesterol absorption, sham $n = 8$, RYGB $n = 9$ (e). Histograms represents means $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; Mann–Whitney test between sham and RYGB groups.

Table 2. Q-PCR analysis of intestinal gene expression after RYGB: effect of bypass surgery on intestinal gene expression

	Alimentary limb		Biliary limb		Common limb	
	Sham	RYGB	Sham	RYGB	Sham	RYGB
PCSK9	1.00 $\pm$ 0.18	12.47 $\pm$ 2.29*	1.00 $\pm$ 0.12	2.53 $\pm$ 0.72*	1.00 $\pm$ 0.13	13.13 $\pm$ 4.43*
LDLR	1.00 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.14*	1.00 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.23
NPC1L1	1.00 $\pm$ 0.18	1.60 $\pm$ 0.28	1.00 $\pm$ 0.31	1.24 $\pm$ 0.60	1.00 $\pm$ 0.19	1.86 $\pm$ 0.51
ABCG5	1.00 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.19	1.03 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.13	1.33 $\pm$ 0.22
ABCG8	1.00 $\pm$ 0.17	0.73 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.24	0.93 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.22	1.28 $\pm$ 0.24
CD36	1.00 $\pm$ 0.12	0.37 $\pm$ 0.16*	1.00 $\pm$ 0.26	0.53 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.18	1.08 $\pm$ 0.26
SRBI	1.00 $\pm$ 0.21	0.18 $\pm$ 0.02*	1.00 $\pm$ 0.22	1.98 $\pm$ 0.58	1.00 $\pm$ 0.22	0.92 $\pm$ 0.23

Abbreviations: LDLR, low-density lipoprotein receptor; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; Q-PCR, quantitative PCR; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass. mRNA levels are normalized to cyclophilin mRNA levels. Values are means $\pm$ s.e.m. and are standardized to values measured in the sham group arbitrary set to 1. * $P < 0.05$; Mann–Whitney test between Sham and RYGB groups. $n = 7$ per group.

group compared to the pair-fed group. Thus, our mice models mimic the differential effects of SG and RYGB on plasma cholesterol levels in humans,⁴ which was a prerequisite to further decipher the underlying molecular mechanisms.

The reduction of plasma cholesterol induced by the RYGB seems to be mainly driven by an increase of fecal cholesterol output. To date, two routes have been described to be

quantitatively involved in this process, the hepatobiliary and the TICE pathways (reviewed in⁶). In mice, the TICE has been demonstrated to be the main route for plasma cholesterol efflux and appears twice as much efficient than the biliary pathway under basal condition.⁸ More recently, both *ex vivo* studies on human intestinal biopsies,¹⁸ and *in vivo* kinetic measurement demonstrated that TICE is also active in humans.⁹ Whereas the

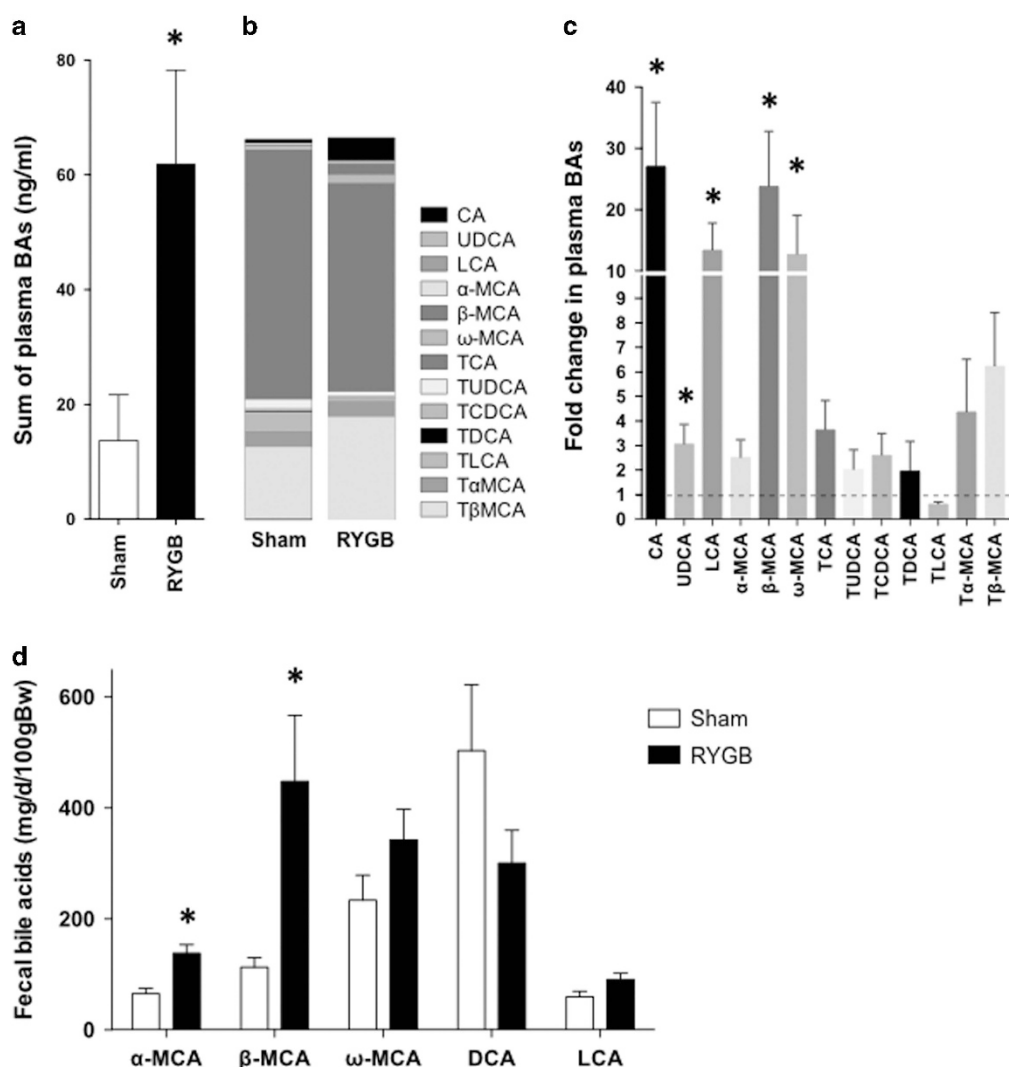


Figure 4. Effect of RYGB on plasma bile acids concentration (**a**); on relative plasma composition (**b**); and on induction of plasma bile acids (**c**). Effect of RYGB on fecal bile acids excretion (**d**). Histograms represent mean values $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$. Mann-Whitney test between sham and RYGB groups. (**a, b, c**) sham $n = 11$, RYGB $n = 10$; (**d**) sham $n = 7$, RYGB $n = 9$. CA, Cholic Acid; DCA, deoxycholic acid; LCA, LithoCholic Acid; MCA, MuriCholic Acid; TCA, TauroCholic Acid; TCDCA, TauroChenoDeoxyCholic Acid; TDCA, TauroDeoxyCholic Acid; TLCA, TauroLithoCholic Acid; T-MCA, TauroMuriCholic Acid; TUDCA, TauroUrsoDeoxyCholic Acid; UDCA, UrsoDeoxyCholic Acid.

biliary pathway appears to be the main route of cholesterol elimination under unstimulated condition,⁹ the TICE could be strongly induced pharmacologically to increase the fecal sterol loss.⁹ Finally, a fraction of the cholesterol excreted by these two routes can be reabsorbed by the small intestine. Therefore, the fractional cholesterol absorption efficiency can also largely modulate the fecal excretion of plasma cholesterol.

Five weeks after surgery, RYGB does not significantly alter the biliary efflux of both total unlabeled or D7 cholesterol. Consistently, the hepatic mRNA levels of the main biliary cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8^(ref. 21) were not increased, but rather reduced after RYGB. In addition, both HMG-CoA reductase and SREBP2 mRNA levels are unaffected following RYGB (Table 1), suggesting that the endogenous synthesis of cholesterol was not altered. Surprisingly, we found a significant reduction of hepatic LDLR gene expression and an increase of hepatic PCSK9 mRNA levels. In accordance with our results, another study recently reported that RYGB and biliary diversion strongly induce PCSK9 hepatic expression in mice.²² At the protein level, we confirmed that circulating plasma PCSK9 levels were significantly increased after RYGB and that hepatic LDLR protein content was reduced

(data not shown). Finally, hepatic LRP1 mRNA levels remain unaltered after surgery. Together, these data suggest that RYGB does not reduce plasma cholesterol by increasing hepatic plasma cholesterol clearance or hepatobiliary cholesterol efflux.

One of our key findings is that the TICE is significantly increased 5 weeks after RYGB. This pathway is to date poorly characterized and only few molecular determinants of the TICE have been identified. Nevertheless, it has been previously demonstrated that the TICE appears to be regulated by multiple cholesterol transporters.^{8,18} At the basolateral side of the enterocyte, we have shown that both statins and PCSK9 can modulate the TICE.¹⁸ Indeed, PCSK9-deficient mice display an increased TICE compared to wild-type littermates, while acute PCSK9 intravenous injection decreases intestinal LDLR content and conversely reduces TICE.¹⁸ At the apical side, it has been reported that ABCG5/ABCG8 deficiency only reduces by 40% the apical intestinal cholesterol efflux,⁸ whereas it almost fully blocks biliary cholesterol secretion. This apical mechanistically redundancy has been further proven by studies showing that ABCB1 contributes to 20% of the apical cholesterol efflux^{8,18} and that the pharmacological inhibition of NPC1L1 by ezetimibe significantly increases TICE.^{9,23} In the present

work, a drastic induction of PCSK9 mRNA levels in the three intestinal limbs (biliary, alimentary and common) was observed following RYGB, with a concomitant slight LDLR mRNA level reduction in the biliary limb. Furthermore, RYGB did not modify *ABCG5*, *ABCG8* and *NPC1L1* gene expression in the three intestinal limbs. Taken together, our data suggest that a regulation of the known TICE modulators, at least at the transcriptional level, seems to be not involved in the induction of the TICE following RYGB. Additional transcriptomic and/or proteomic studies are warranted to identify such new modulators of TICE in the context of RYGB. Similarly, it is difficult to dissociate the relative contribution of TICE and cholesterol malabsorption in the RYGB-induced hypocholesterolemic effect as both pathways are interconnected.

The increased intestinal PCSK9 gene expression observed 5 weeks after RYGB is intriguing. It has been suggested that PCSK9 is critical for liver regeneration after hepatectomy. Indeed, hepatic PCSK9 mRNA levels are strongly induced in days following partial hepatectomy, and PCSK9-deficient mice exhibit impaired liver regeneration.²⁴ Intestinal remodeling, especially hyperplasia, is known to occur after either mini gastric bypass or RYGB, with increased jejunum diameter, higher villi and deeper crypts than in sham rats.²⁵ We also noticed such microscopic changes in the three limbs (data not shown). Thus, one could hypothesize that PCSK9 may have a role in the intestinal cell proliferation and regeneration after RYGB. The metabolic consequences of bariatric surgeries in PCSK9-deficient mice are currently under investigation to assess the functional role of such increased intestinal PCSK9 expression.

In addition to the contribution of the TICE in the hypocholesterolemic phenotype following RYGB, we also highlighted a significant reduction of the intestinal ability to absorb cholesterol. These results are in agreement with the literature. Pihlajamäki *et al.*²⁶ first found a 26% decrease in intestinal cholesterol absorption one year after RYGB in humans. Similar results were confirmed later by Benetti *et al.*²⁷ As potential mechanistic explanations, it is well admitted that RYGB delays the contact between bile salts and the dietary bolus, impairing micelle formation and reducing the time of exposure for nutrients with intestinal absorption area. We next determined whether RYGB can alter the gene expression of intestinal cholesterol transporters. As detailed before, neither *NPC1L1* nor *ABCG5/ABCG8* gene expression is altered in the small intestine from RYGB-operated mice. In contrast, CD36 and SRBI mRNA levels are reduced in the alimentary limb after RYGB. The functional importance of SRBI in cholesterol absorption is still controversial with discrepant results obtained from either *in vitro* or mouse studies.^{28–30} In accordance with a potential link between decreased intestinal CD36 expression and reduced cholesterol intestinal absorption, Nauli *et al.*³¹ reported that CD36-deficient mice showed a significant reduction of lymphatic transport of dietary cholesterol.

We found that plasma bile acids were drastically increased following RYGB in mice. These data are in accordance with others studies reporting significant increase in plasma bile acids in different species such as humans,^{32–34} rats^{34–36} and pigs.³⁴ In humans, the rise in plasma bile acids in obese patients following bariatric surgeries strongly correlates with improved glucose tolerance and lipid metabolism.^{32,37} Mouse models demonstrated that the nuclear receptor FXR is required for mediating the beneficial effect of SG on glucose homeostasis, potentially via changes in gut microbiota.¹² In our model, we did not measure significant changes in hepatic expression of key genes of bile acid metabolism such as *FXR*, *SHP* and *CYP7A1*. However, it would be interesting to study whether RYGB can affect cholesterol metabolism in FXR-deficient mice. Another potential link between bile acids and cholesterol metabolism is the regulation of TICE. If neither the luminal bile acid concentration nor bile acid hydrophobicity seems to affect TICE,³⁸ it was recently reported that the pharmacological FXR activation strongly activates TICE.³⁹

Finally, it has been previously demonstrated that hydrophobic bile acids, such as cholic acid (CA) and deoxycholic acid (DCA) intestinal cholesterol absorption whereas hydrophilic bile acids, such as muricholic acid (MCA), can strongly repress it.⁴⁰ More work will be required to fully characterize the impact of bile acids alteration on the cholesterol metabolism change observed after RYGB.

CONCLUSION

We developed two models of bariatric surgeries in mice that resume the hypocholesterolemic effect observed in patients operated of SG or RYGB. Our data show that SG had a weak and transient effect on cholesterolemia that seems mostly due to food intake reduction. By contrast, RYGB exerts a strong and sustained hypocholesterolemic action. RYGB strongly favors plasma cholesterol elimination by concomitantly increasing TICE and by decreasing intestinal cholesterol absorption. From a clinical perspective, these data suggest that malabsorptive procedures (RYGB) should be preferred in obese patients with established hypercholesterolemia and/or high cardiovascular risk.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in the setting of the animals care protocol. This work was supported by grants from: La région des Pays de la Loire; the fondation d'avenir; the Casden bank; the AFC; the Fondation Leducq Grant (13CVD03).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB, FM, BC and CLM: designed the study; CB, FM, AA, LT, FB, DG, LA, AA, MC, MK and CLM: performed the experiments and collected the data; CB, FM, AA, LT, FB, DG, XP, MN, BC and CLM: analyzed the data and arranged the figures; CB, BC and CLM: wrote the first draft of the manuscript. FM, XP and MN: initially reviewed the manuscript. All authors edited and approved the final draft of the manuscript.

REFERENCES

- Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 2008; **8**: 200.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; **289**: 187–193.
- Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery Worldwide 2008. *Obes Surg* 2009; **19**: 1605–1611.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fairbairn K *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; **292**: 1724–1737.
- Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 6429–6439.
- Temel RE, Brown JM. A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol Sci* 2015; **36**: 440–451.
- van der Velde AE, Vriens CL, Van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007; **133**: 967–975.
- van der Veen JN, van Dijk TH, Vriens CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009; **284**: 19211–19219.
- Jakulj L, van Dijk TH, Freark de Boer J, Koottte RS, Schonewille M, Paalvast Y *et al.* Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metab* 2016; **6**: 783–794.
- Yin DP, Gao Q, Ma LL, Yan W, Williams PE, McGuinness OP *et al.* Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Ann Surg* 2011; **254**: 73–82.

- 11 Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 2008; **8**: 201–211.
- 12 Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 2014; **509**: 183–188.
- 13 Hao Z, Mumphy MB, Townsend RL, Morrison CD, Münzberg H, Ye J et al. Body composition, food intake, and energy expenditure in a murine model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2016; **26**: 2173–2182.
- 14 Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pérez HE, Hofmann SM, Jandacek R et al. Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology* 2011; **141**: e1–e4.
- 15 Myronovych A, Kirby M, Ryan KK, Zhang W, Jha P, Setchell KD et al. Vertical sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis while increasing serum bile acids in a weight-loss-independent manner. *Obesity (Silver Spring)* 2014; **22**: 390–400.
- 16 Pressler JW, Haller A, Sorrell J, Wang F, Seeley RJ, Tso P et al. Vertical sleeve gastrectomy restores glucose homeostasis in apolipoprotein A-IV KO mice. *Diabetes* 2015; **64**: 498–507.
- 17 Ayer A, Borel F, Moreau F, Prieur X, Neunlist M, Cariou B et al. Techniques of sleeve gastrectomy and modified roux-en-Y gastric bypass in mice. *J Vis Exp* 2017; **20**: 121.
- 18 Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E et al. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 1484–1493.
- 19 Nik AM, Carlsson P. Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme. *Biotechniques* 2013; **55**: 42–44.
- 20 Si-Tayeb K, Idriss S, Champion B, Caillaud A, Pichelin M, Arnaud L et al. Urine-sample-derived human induced pluripotent stem cells as a model to study PCSK9-mediated autosomal dominant hypercholesterolemia. *Dis Model Mech* 2016; **9**: 81–90.
- 21 Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16237–16242.
- 22 Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE, Brucker RM et al. Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. *Nat Commun* 2015; **6**: 7715.
- 23 Jakulj L, Vissers MN, van Roomen CP, van der Veen JN, Vriens CL, Kunne C et al. Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett* 2010; **584**: 3625–3628.
- 24 Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008; **48**: 646–654.
- 25 Cavin JB, Voiteiller E, Cluzeaud F, Kapel N, Marmuse JP, Chevallier JM et al. Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared with Roux-en-Y gastric bypass in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; **311**: G492–G500.
- 26 Pihlajamäki J, Grönlund S, Simonen M, Käkälä P, Moilanen L, Pääkkönen M et al. Cholesterol absorption decreases after Roux-en-Y gastric bypass but not after gastric banding. *Metabolism* 2010; **59**: 866–872.
- 27 Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A, Veronelli A, Masci E, Frigè F et al. Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care* 2013; **36**: 1443–1447.
- 28 Mardones P, Quiñones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M et al. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001; **42**: 170–180.
- 29 Cai L, Eckhardt ER, Shi W, Zhao Z, Nasser M, de Villiers WJ et al. Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2004; **45**: 253–262.
- 30 Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Coméra C et al. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006; **281**: 7214–7219.
- 31 Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB et al. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1197–1207.
- 32 Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 2009; **17**: 1671–1677.
- 33 Jansen PL, van Werven J, Aarts E, Berends F, Janssen I, Stoker J et al. Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Dis* 2011; **29**: 48–51.
- 34 Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach M, Daoudi M et al. Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. *Int J Obes (Lond)* 2016; **40**: 1260–1267.
- 35 Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on bile acid metabolism in normal and obese diabetic rats. *PLoS One* 2015; **10**: e0122273.
- 36 Gao F, Zhang X, Zhou L, Zhou S, Zheng Y, Yu J et al. Type 2 diabetes mitigation in the diabetic Goto-Kakizaki rat by elevated bile acids following a common-bile-duct surgery. *Metabolism* 2016; **65**: 78–88.
- 37 Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013; **37**: 1553–1559.
- 38 van der Velde AE, Vriens CL, van den Oever K, Seemann I, Oude Elferink RP, van Eck M et al. Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; **295**: G203–G208.
- 39 de Boer JF, Schonewille M, Boesjes M, Wolters H, Bloks VW, Bos T et al. Intestinal farnesoid X receptor controls transintestinal cholesterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2017; **152**: e6.
- 40 Wang DQ, Tazuma S, Cohen DE, Carey MC. Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res* 2003; **285**: G494–G502.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice

Claire Blanchard^{1,2} · François Moreau³ · Julien Chevalier⁴ · Audrey Ayer³ · Damien Garcon³ · Lucie Arnaud³ · Jean-Paul Pais de Barros⁵ · Thomas Gautier⁵ · Michel Neunlist^{4,6} · Bertrand Cariou¹ · Cédric Le May³

Published online: 20 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract

Background Increased lipopolysaccharide (LPS) translocation due to altered intestinal permeability has been suggested as a mechanism for obesity-associated insulin resistance. The goal of this study was to assess the effect of sleeve gastrectomy (SG) on intestinal barrier permeability in diet-induced obese mice.

Materials and Methods Four weeks after surgery, the effects of SG on intestinal permeabilities were assessed ex vivo and in vivo in male C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. Gene expression of tight junction proteins and inflammatory cytokines was measured in jejunum, colon, liver, and inguinal adipose tissue. Plasma LPS was quantified by HPLCMS/MS spectrometry.

Results SG significantly reduced body weight and improved glucose homeostasis, as expected. SG decreased paracellular ($p = 0.01$) and transcellular permeability ($p = 0.03$) in the jejunum; and increased mRNA levels of the tight junction proteins Jam A ($p = 0.02$) and occludin ($p = 0.01$). In contrast

in the distal colon, paracellular permeability tended to be increased ($p = 0.07$) while transcellular permeability was significantly induced ($p = 0.03$) after SG. In vivo, the paracellular permeability was significantly increased 3 weeks after SG ($p = 0.02$). Plasma LPS level were increased after SG ($p = 0.03$), as well as mRNA levels of adipose and hepatic inflammatory markers ($p = 0.02$).

Conclusions SG significantly modifies intestinal permeability in a differential manner between the proximal and distal intestine. These changes promote LPS translocation in plasma, induce a low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue and liver, but do not impair the SG-induced glucose homeostasis improvement.

Keywords Sleeve gastrectomy · LPS · Intestinal permeability · Inflammation · Glucose homeostasis

Introduction

Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM). Among bariatric procedures, sleeve gastrectomy (SG) is the most frequently used in many countries. Randomized prospective studies have demonstrated that bariatric surgery is an efficient strategy to improve glycemic control or even cure T2DM [1]. Several molecular mechanisms sustain these beneficial effects of bariatric surgery, including stimulation of incretin secretion and modulation of bile acid signaling [2]. Previous works suggested that alterations in intestinal permeability could underlie the metabolic complications of obesity. In rodents, several studies built the concept that the consumption of a high-fat diet induces microbiome modifications, decreases the expression of tight junction proteins, and increases intestinal permeability that favors plasma LPS translocation [3–8].

✉ Claire Blanchard
Claire.blanchard@chu-nantes.fr

¹ l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, CHU Nantes, University of Nantes, Nantes, France

² Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU Hôtel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 cedex 1 Nantes, France

³ L'institut du Thorax, INSERM-CNRS, University of Nantes, Nantes, France

⁴ INSERM U913, 44093 Nantes, France

⁵ Plateforme de Lipidomique-uBourgogne, INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, Dijon, France

⁶ Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Nantes, France

Accordingly, increased intestinal permeability induces a chronic inflammatory response and promotes systemic insulin resistance [3, 8–10].

In humans, the effects of obesity and bariatric surgery on intestinal permeability have been poorly explored and have produced varying results [11]. In healthy subjects, a positive correlation was observed between the permeability of the colon and the amount of visceral fat [12]. One team reported that no change in intestinal permeability occurs in the presence of obesity [13], but did observe a slight increase in intestinal permeability in obese patients in a subsequent study [14]. A third study showed that obese patients display increased gastroduodenal permeability but no differences in the permeability of the small intestine or the colon [15]. Intestinal permeability, as measured by the lactulose/mannitol ratio, was not significantly altered in patients 6 months after RYGB [16]. However, a significant increase in claudin 3 and 4 levels was found 8 months after RYGB, whereas occludin and ZO-1 levels decreased in this timeframe [17].

Based on these discordant results, our study aims to assess the short-term effects of SG on intestinal paracellular and transcellular permeabilities and the subsequent effects on LPS translocation, white adipose tissue and hepatic inflammation, and glucose homeostasis in diet-induced obese mice.

Materials and Methods

Animals

Ten-week-old C57Bl/6 mice (Charles River) had free access to water and high-fat diet for 8 weeks prior to surgery (DIO diet 35% kcal from fat, Safe). As the maximal metabolic benefit appears to be reached 3 to 4 weeks after bariatric procedures [18], we did measure the functional consequence of SG on intestinal permeability during this period. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Surgical Procedures

Prior surgery, mice were matched on body weight and plasma cholesterol and divided in three experimental groups. Sham and Pairfed control mice were only subjected to a sham operation (laparotomy and mobilization of the stomach). Sham and SG mice were fed *ad libitum* when Pairfed mice received the same amount of food consumed by the SG mice 24 h before. A SG

was performed as follows on the third group of mice. After laparotomy, the stomach was externalized, and the pylorus vessels were sutured along the greater stomach curvature with 8.0 Prolene single sutures (Ethicon®, Johnson & Johnson). Then, a gastrostomy was performed on the anatomical line present between the pyloric region and the cardiac region of the stomach and the incision site was sutured with 8.0 Prolene using a running suture from the gastro-esophageal junction. Eighty percent of the stomach was removed. The muscle layer of the abdominal wall and the skin was closed using interrupted sutures with 5.0 Prolene. After surgery, isoflurane was stopped and O₂ flow (0.8 L/min) was continued until the mice were fully recovered. Mice were individually housed in a 30 °C incubator for the next 5 days. All groups had free access to Highfat Geldiet (lard 10%, liquid sugar 10%, water 57%; Safe) for 5 days and the DIO diet was reintroduced 3 days after surgery. Buprenorphine (0.1 mg/kg, twice daily), meloxicam (1 mg/kg), and marbofloxacin (10 mg/kg) were subcutaneously administered for 3 days after surgery and metoclopramide (1 mg/kg) was maintained for 5 days.

Food Intake Measurement

The food intake was measured for each mouse daily for up to 4 weeks after surgery by substrating the uneaten food from a pre-weighed amount of solid diet placed in the cage 24 h before.

Oral Glucose Tolerance Test

Two weeks after surgery, 6-h-fasted mice received an oral bolus of D-glucose (2 g/kg) and plasma glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60, and 120 min after gavage by tail bleeding (Glucometer-One Touch Verio®).

Total Transit Time and Colonic Motility Measurement

Total transit time (TTT) and colonic motility were evaluated as previously reported [19]. Mouse was housed in individual cage, and produced feces were harvested every 15 min for 2 h. The fecal water content was estimated by subtracting the fresh fecal weight by the dry fecal weight (after feces lyophilization).

Intestinal Permeability Assessment

In vivo intestinal barrier function was assessed by measuring the paracellular transport of fluorescein-conjugated sulfonic acid (F-SA) in plasma [19]. Ex

Table 1 Table of used primers

Gene	Protein name	Forward primer	Reverse primer
ZO1	Zonula Occludens	1 AAGAATATGGTCTTCGATTGGC	ATTTTCTGTCACAGTACCATTATCTTC
Occludin	Occludin	GGTTAAAAATGTGTCTGCAGG	GAGGCTGCCTGAAGTCATCCA
JAM A	Junctional Adhesion Molecule A	ATAACAGCCAGATCACAGCTCC	TGGAGGTACAAGCACAGTGAG
IFN γ	Interferon Gamma	CTGGAGGAACTGGCAAAGGAT	GGTTGTTGACCTCAAACCTTGGC
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha	GAACCTTCGGGGTGATCGGTCC	GCCACTCCAGCTGCTCCTCC
IL1B	Interleukine 1 beta	TCCTGTGTGATGAAAGACGGCAC	GTGCTGATGTACCAGTTGGGGAAC
S6 ribosomal	protein S6	GAAGCGCAAGTCTGTTCTGTG	GTCTGGGCTTCTTACCTTC
SAA1 Serum	amyloide A1	CCCAGACTCTGCAAATCTCATTC	AAAGCTCTCTCTTGCATCACTG
SAA2 Serum	amyloide A2	ACCTGTGGTTCGGAGGATGAA	TGGCTGGAAAGATGGAGACAA
SAA3 Serum	amyloide A3	TGCCATCATCTTTGCATCTTGA	CCGTGAACCTTCTGAACAGCCT
SAA4 Serum	amyloide A3	CTCTGTTCTTTGTTCTGGGAG	CTAGGTTGTCCCGATAGGCTC
Haptoglobin	Haptoglobin	GCTATGTGGAGCACTTGGTTC	CACCCATTGCTTCTCGTCGTT

vivo, jejunal, or colonic intestinal biopsies were mounted in Ussing chambers and paracellular and transcellular permeabilities were determined by respectively quantifying the incoming transport of F-SA and horseradish peroxidase (HRP) as described before [19].

mRNA Levels Analysis

Total RNA was extracted from tissues using NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel). cDNA was synthesized using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Real-time quantitative PCR

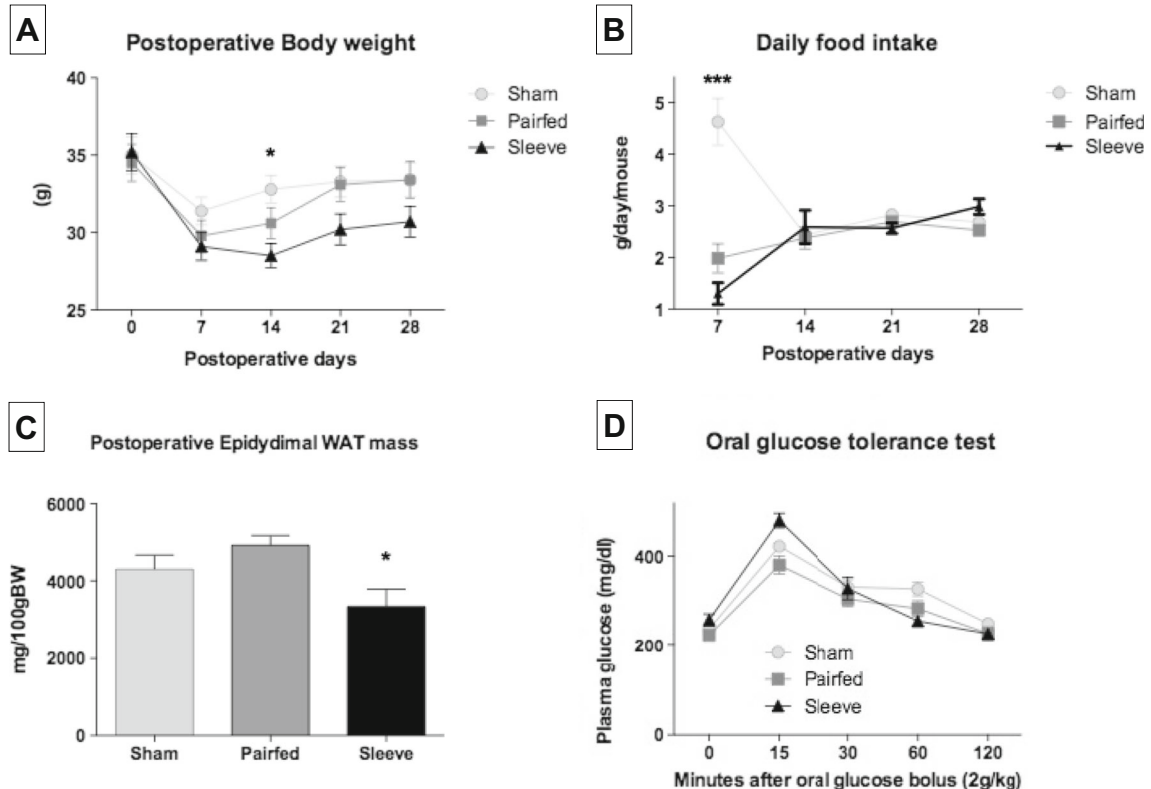


Fig. 1 Effect of sleeve gastrectomy (Sleeve) on body weight (a), on daily food intake (b), on epididymal WAT mass (c), and oral glucose tolerance. Data are mean values $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

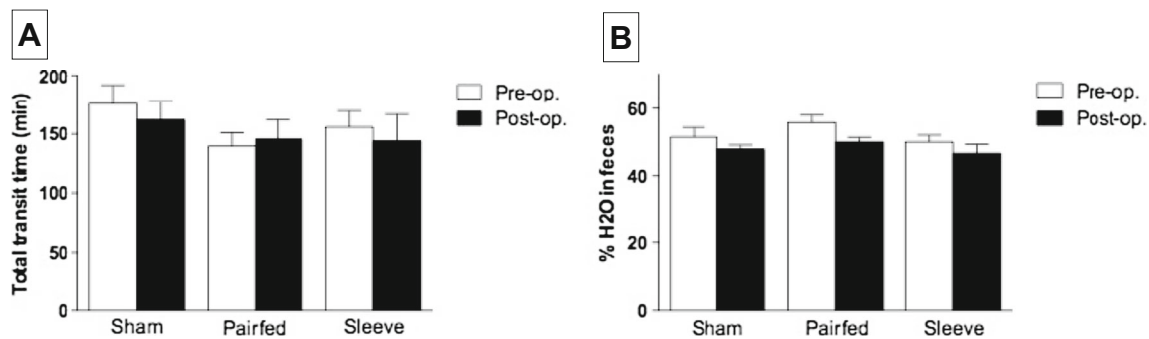


Fig. 2 Effect of sleeve on total transit time (a) and fecal water content (b). Histograms represent mean values $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

(qPCR) was performed using primers described in Table 1 using Absolute Blue SYBR Green Fluorescein mix (Life Technologies), and reactions were run on a StepOne + thermocycler (Life Technologies).

Plasma LPS Measurement

Plasma LPS was separated by reverse-phase HPLC and quantitated by MS/MS spectrometry, as described before [20].

Fig. 3 Ex vivo measurement of the effect of sleeve on jejunal paracellular (a) and transcellular permeability (b). Consequences of sleeve on jejunal mRNA levels of Jam A (c), Occludin (d), and ZO-1 (e). Values are normalized with S6 and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$

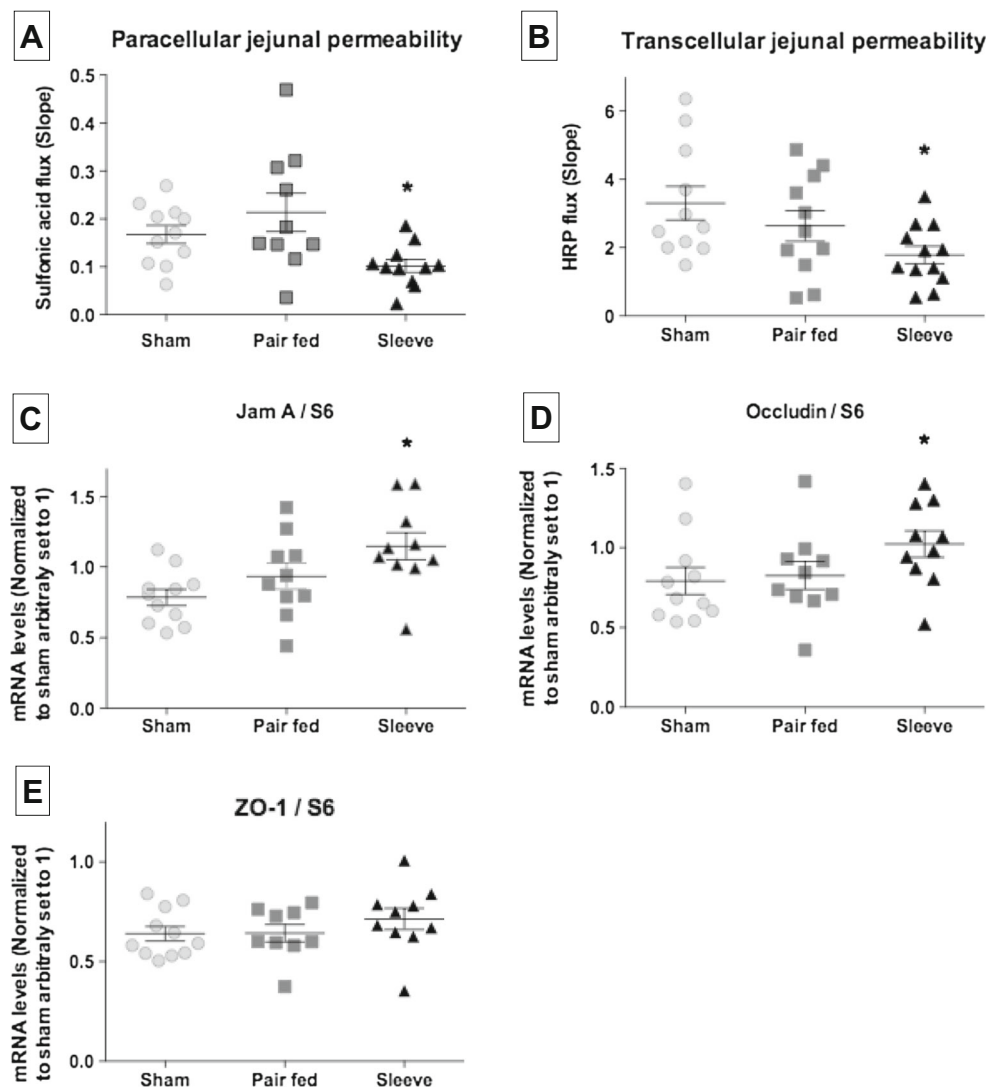
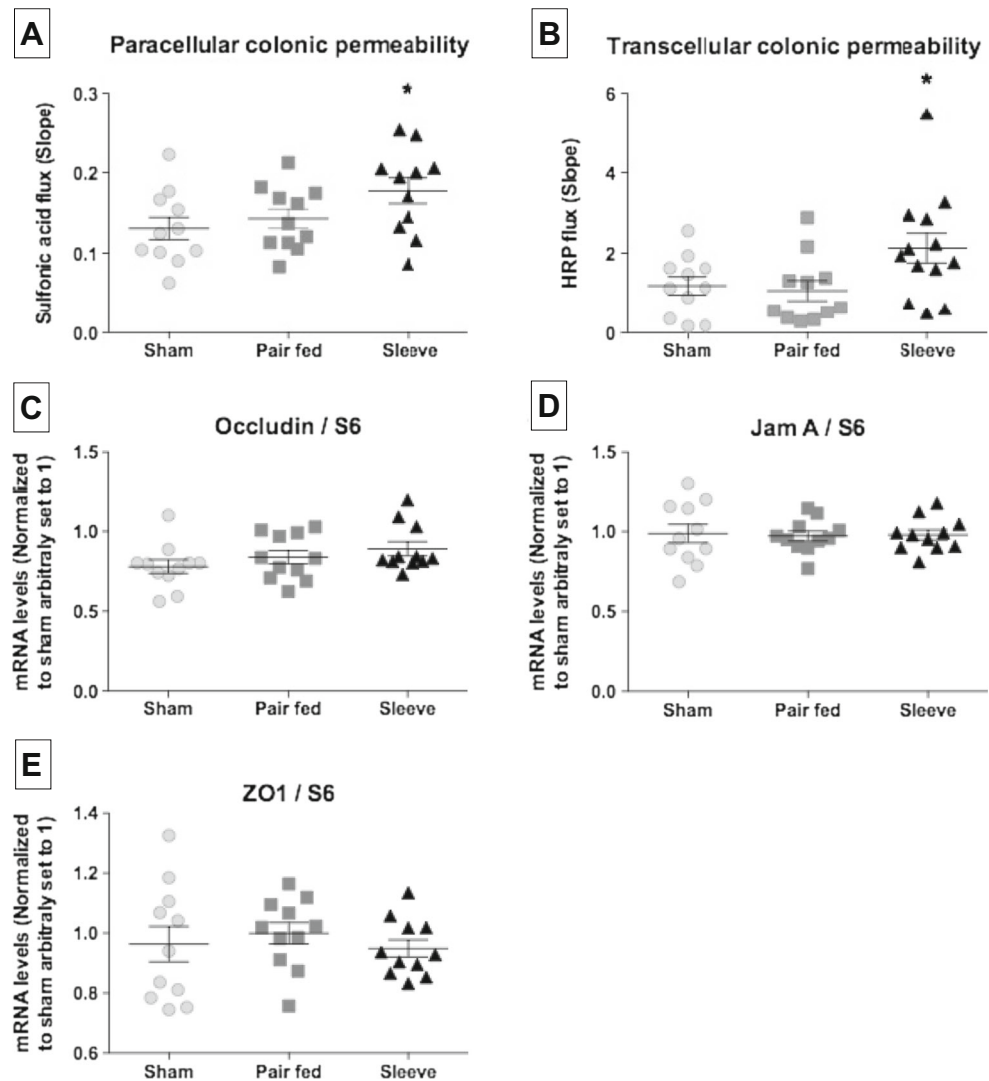


Fig. 4 Ex vivo measurement of the effect of sleeve on colonic paracellular (a) and transcellular permeability (b). Consequences of sleeve on colonic mRNA levels of Jam A (c), Occludin (d), and ZO-1 (e). Values are normalized with S6 and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$



Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by Prism5 (GraphPad) using non parametric Mann-Whitney test or Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test.

Results

SG is an Efficient Procedure in Obese Mice

Eight weeks after a HFD, 40 male mice were randomized based on body weight and plasma total cholesterol and divided into 3 experimental groups (Sham, Pair-fed, SG). The average body weight before surgery was 35.8 ± 3.9 g. The average duration of the procedure was 41 ± 7 min. The survival rate was 86% after SG. Compared to baseline, SG led to significant reductions in body weight at 2 (−8%, $p = 0.03$) and 4 weeks post-surgery (−5.5%, $p = 0.13$, Fig. 1a). There was a

significant reduction in body weight in the SG group compared to the sham group on day 14 (−13%, $p = 0.02$) and day 21 (−9%, $p = 0.02$, Fig. 1a). One week after the surgery, we observed a significant difference in food intake between the sham and SG/pair-fed groups ($p < 0.0001$, Fig. 1b). Four weeks after surgery, epididymal white adipose tissue mass was decreased in the SG group compared to the sham (−22%, $p = 0.08$) and pair-fed groups (−32%, $p = 0.01$, Fig. 1c). An oral glucose tolerance test (oGTT) confirmed that glucose homeostasis was significantly improved 2 weeks after SG compared to the control groups ($p = 0.002$, Fig. 1d).

SG Does Not Alter Intestinal TTT or Fecal Water Content

We first assessed the effects of SG on intestinal function by measuring TTT and fecal water content from the three groups 2 weeks after surgery. As shown in Fig. 2a, b, there were no differences in these parameters among the three groups.

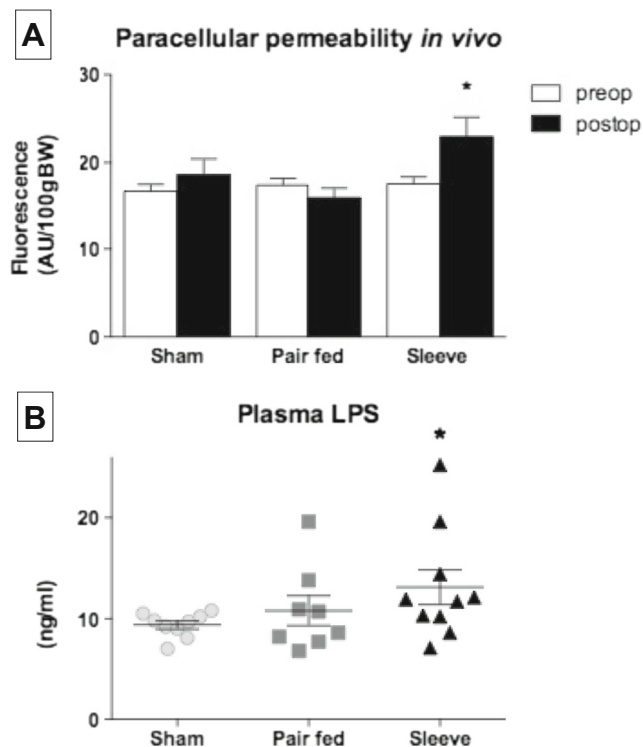


Fig. 5 In vivo measurement of the effect of sleeve on paracellular permeability (**a**). Consequences of sleeve on plasma lipopolysaccharides (LPS) 4 weeks after surgery (**b**). Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$

SG Affects Differently Jejunal and Colon Permeabilities

SG decreased both paracellular permeability, as reflected by reduced F-SA transport (-39% , $p = 0.01$), and transcellular permeability, with reduced HRP flux (-45% , $p = 0.03$) measured ex vivo in jejunal biopsies (Fig. 3a, b). Consistently, these jejunal alterations were associated with higher mRNA expression of Jam A ($+31\%$, $p = 0.02$; Fig. 3c) and occludin ($+34\%$, $p = 0.01$; Fig. 3d) in the SG group, whereas ZO-1 mRNA levels were not significantly altered ($p = 0.27$; Fig. 3e). In contrast, both ex-vivo paracellular and transcellular permeabilities were respectively increased in the distal colon of SG mice ($+26\%$, $p = 0.07$ and $+44\%$, $p = 0.03$; Fig. 4a, b), whereas expressions of occludin, Jam A and ZO-1 mRNA were unchanged (Fig. 4c–e).

Effects of SG on In Vivo Paracellular Permeability, LPS Translocation, and Pro-inflammatory Markers Expression

We next measured the consequence of SG on in vivo paracellular permeability. While sham surgery has no effect on the paracellular transport of F-SA in plasma, SG increases significantly plasma F-SA concentrations 3 weeks after surgery (Fig. 5a). Thus, SG overall increases paracellular permeability, despite the reduced jejunal permeability observed ex vivo. Consistently, 4 weeks after surgery, plasma LPS levels were

significantly increased in the SG compared to the sham control mice ($+28\%$, $p = 0.03$) (Fig. 5b), suggesting that the increased colonic paracellular permeability favors LPS translocation. There were no modifications in the intestinal gene expression of pro-inflammatory cytokines (IL6, TNF α , and IFN γ) in the SG compared to the control group (*data not shown*). In contrast, in inguinal white adipose tissue, there was a significant increase in IL1 β mRNA levels in the SG compared to the sham group ($+30\%$, $p = 0.02$), with a trend for TNF α mRNA levels ($+33\%$, $p = 0.11$), whereas there was no change in IL1 β expression ($p = 0.35$) (Fig. 6a–c). As LPS also exerts some hepatic pro-inflammatory actions, we measured the expression of several hepatic acute-phase proteins. A significant increase in hepatic SAA2, SAA3, and haptoglobin mRNA levels was observed after SG (Fig. 6e, f, h). A trend for an increase in hepatic SAA4 mRNA levels was also noticed (Fig. 6g).

Discussion

Increased LPS translocation due to altered intestinal permeability has been suggested as a mechanism for the chronic inflammatory state and insulin resistance that are associated with morbid obesity. Using a mouse model, we investigated the effect of SG on intestinal permeability, LPS translocation and inflammation.

First, we observed a significant body weight reduction and a glucose homeostasis improvement, thereby validating our SG surgical model [21, 22]. Then, we more specifically examined intestinal function. Neither TTT nor fecal water content was significantly modified following SG. While it is known that gastric emptying is increased after SG, only one small study has shown a decrease in intestinal transit time 4 months after SG in humans [23].

For the first time, we showed that ex vivo jejunal intestinal permeability decreased 4 weeks after SG. The increased jejunal mRNA expression of tight junction proteins such as Jam A and occludin might have contributed to the reduced proximal intestinal permeability. One striking and novel finding is the fact that SG differentially affects intestinal permeability all along the gastrointestinal tract, with an increase ex vivo in the permeability of the colon after SG. It seems that the alteration of the colonic permeability plays a predominant role since there is an overall increase in vivo of the paracellular permeability 3 to 4 weeks after SG. In contrast to what was observed in the jejunum, no change was observed in the intestinal mRNA expression of tight junction proteins suggesting that alteration occurs at the protein level. Further studies are warranted to decipher the underlying mechanisms sustaining these permeability modifications. As the gut permeability in human could be different from laboratory rodents [24], it would be interesting to test the effect of SG in guinea pigs that share more similarities with humans [24]. One limitation of our study was the fact that the weight loss was less

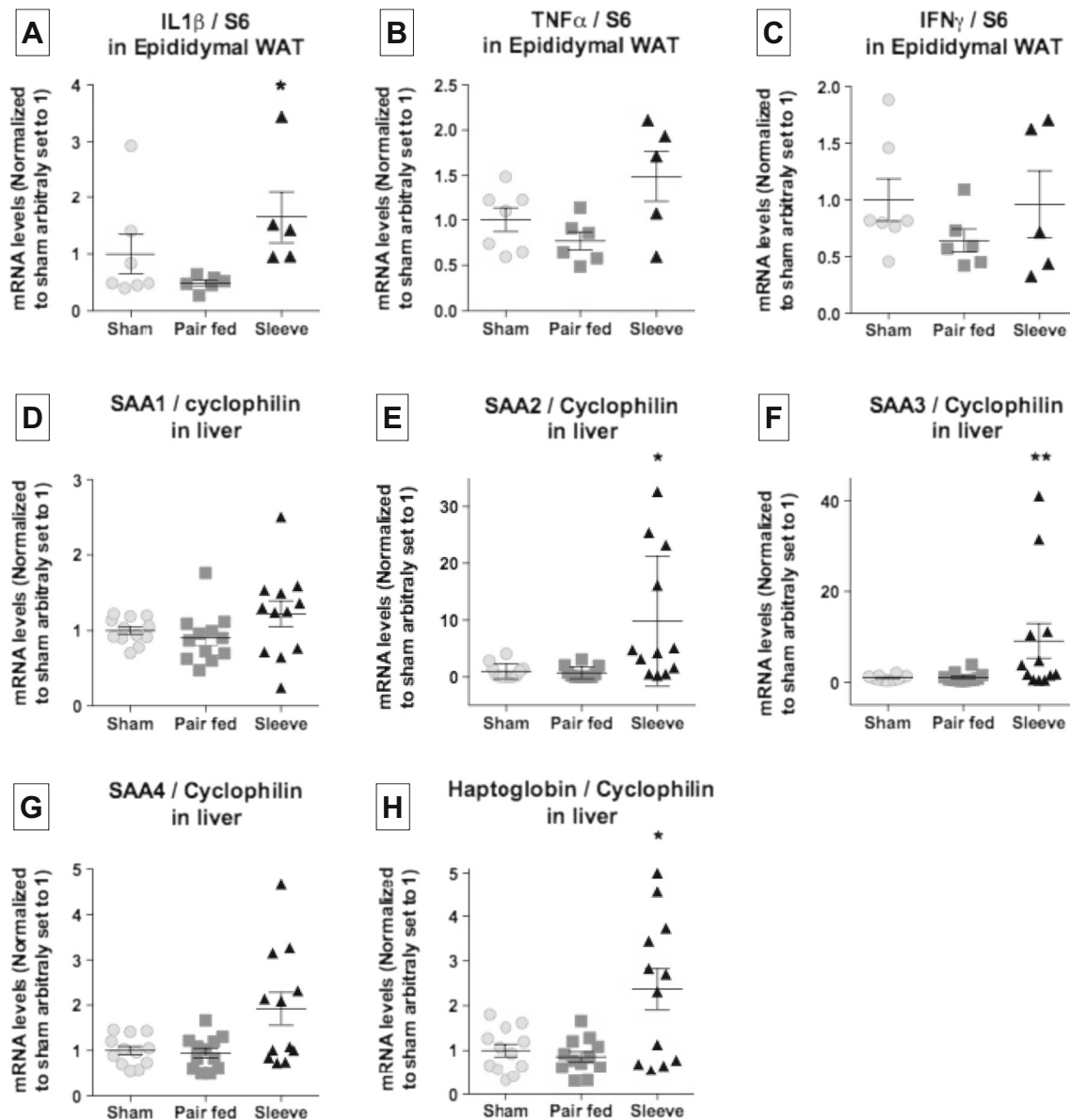


Fig. 6 Effect of sleeve on adipose (a–c) and hepatic gene expression (d–h). Values are normalized with S6 or cyclophilin and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

severe in the pair fed group than in the SG group. Indeed, we cannot rule out the possibility that an age- and body weight-matched group of mice would present similar gut permeability change than the SG group. To date, the effect of caloric restriction has been poorly explored. In 1992, one study showed that caloric restriction does not affect and prevent the aging induced increased intestinal permeability [25].

Few clinical studies have examined the impact of bariatric surgery on intestinal permeability. Based on the lactulose/mannitol ratio, it was reported that intestinal permeability was not modified 6 months after RYGB surgery in 16 obese patients [16]. In accordance with our mice data, one study performed 8 months after RYGB showed increased expression of tight

junction proteins and decreased paracellular permeability in the proximal intestine in humans [17].

In accordance with an increased in vivo permeability, plasma LPS levels were significantly increased in SG-operated compared to control mice. In contrast, it has been reported in humans that plasma LPS levels decrease rapidly after bariatric surgery, with a concomitant decrease of CRP levels [26, 27]. The reason for this discrepancy remains unclear and requires further investigation. Importantly, we found that this increase in plasma LPS following SG was associated with a pro-inflammatory state in inguinal adipose tissue and in the liver. Importantly, despite this low-grade inflammation, glucose homeostasis was improved after SG, suggesting that the other

beneficial metabolic effects of SG overcome the increased colonic permeability. If it is well admitted that bariatric surgeries induce a rapid glucose homeostasis improvement, the precise molecular mechanisms responsible for this beneficial effects are not fully characterized. Indeed, it was reported by several studies (reviewed in [28]) that reduced caloric intake, modification of gastro-intestinal peptides, alteration of bile acid fluxes, and microbiota changes can contribute to improvement in glucose homeostasis. Thus, it could be emphasized that the overall effect of SG on glucose homeostasis is the result of several positive and negative parameters and that the increased LPS influx by itself is not sufficient to alter glucose homeostasis.

Conclusion

SG induces significant modifications of intestinal paracellular and transcellular permeability. These changes potentially favor LPS translocation in plasma, thus promoting a low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue and liver. However, they do not negate the beneficial effects of SG on glucose homeostasis. As a future work, it would be interesting to assess the long-term effect of SG on intestinal permeability and also the consequence of other bariatric procedures, i.e., RYGB.

Acknowledgements We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal Facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in creating the animal care protocol. We thank the American Journal experts for the final editing of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflicts of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Source of Funding Région Pays de La Loire (France), CASDEN, Fondation Genavie.

References

1. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2008;351:2683–93.
2. Wu Q, Zhang X, Zhong M, et al. Effects of bariatric surgery on Serum bile acid composition and conjugation in a diabetic rat model. *Obes Surg*. 2016;26:2384–92.
3. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470–81.
4. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:692–703.
5. De La Serre CB, Ellis CL, Lee J, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G440–8.
6. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:19.
7. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut Microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31:283–93.
8. Trøseid M, Nestvold TK, Rudi K, et al. Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes Care*. 2013;36:3627–32.
9. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol*. 2011;9:e1001212.
10. Burcelin R, Garidou L, Pomié C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol*. 2012;24:67–74.
11. Genser L, Poitou C, Brot-Laroche E, et al. Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity? *Med Sci (Paris)*. 2016;32:461–9.
12. Gummesson A, Carlsson LM, Storlien LH, et al. Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:2280–2.
13. Brignardello J, Morales P, Diaz E, et al. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32:1307–14.
14. Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012;31:735–40.
15. Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:E607–15.
16. Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, et al. Changes in intestinal permeability after roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2014;24:184–90.
17. Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, et al. Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11:45–53.
18. Yin DP, Gao Q, Ma LL, et al. Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Ann Surg*. 2011;254:73–82.
19. Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S, et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25:e183–93.
20. Pais de Barros JP, Gautier T, Sali W, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. *J Lipid Res*. 2015;56:1363–9.
21. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014;509:183–8.
22. Arapis K, Cavin JB, Gillard L, et al. Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. *PLoS One*. 2015;10:e0121414.
23. Melissas J, Leventi A, Klinaki I, et al. Alterations of global gastrointestinal motility after sleeve gastrectomy: a prospective study. *Ann Surg*. 2013;258:976–82.
24. Delahunty T, Hollander D. A comparison of intestinal permeability between humans and three common laboratory animals. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1987;86:565–7.
25. Ma TY, Hollander D, Dadufalza V, et al. Effect of aging and caloric restriction on intestinal permeability. *Exp Gerontol*. 1992;27:321–33.

26. Monte SV, Caruana JA, Ghanim H, et al. Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery*. 2012;151:587–93.
27. Clemente-Postigo M, Roca-Rodríguez Mdel M, Camargo A, et al. Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11:933–9.
28. Cho YM. A gut feeling to cure diabetes: potential mechanisms of diabetes remission after bariatric surgery. *Diabetes Metab J*. 2014;38:406–15.

A high-throughput mass spectrometry–based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins

Running head: Multiplex assay for apolipoprotein quantification

Valentin Blanchard^{1*}, Damien Garçon², Catherine Jaunet³, Kevin Chemello¹, Stéphanie Billon-Crossouard^{4,5}, Audrey Aguesse^{4,5}, Aya Garfa⁵, Gilles Famchon³, Amada Torres⁴, Cédric Le May², Matthieu Pichelin⁶, Edith Bigot-Corbel³, Gilles Lambert¹, Bertrand Cariou⁶, Samy Hadjadj^{5,6}, Michel Krempf^{4,5,7}, Kalyane Bach-Ngohou^{3,8}, Mikaël Croyal^{4,5*}.

Affiliations: ¹Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DÉTRO), Plateforme CYROI, Saint-Denis de La Réunion, France. ²L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, Nantes, France. ³Department of Biochemistry, CHU de Nantes, Nantes, France. ⁴NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, F-44000 Nantes, France. ⁵CRNH-O Mass Spectrometry Core Facility, F-44000 Nantes, France. ⁶L'institut du thorax, INSERM, CNRS, University of Nantes, CHU Nantes, Nantes, France. ⁷ELSAN, clinique Bretéché, Nantes, France. ⁸INSERM U1235, University of Nantes, Nantes, France.

*Correspondence should be addressed to Mikaël Croyal or Valentin Blanchard: Phone: +33(0) 240 083 075 - E-mail: mikaël.croyal@univ-nantes.fr, valentin.blanchard@univ-reunion.fr.

ABBREVIATIONS

CV, coefficient of variation

CVD, cardiovascular disease

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

FA, formic acid

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol

IS, internal standard

LC-HRMS, liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry

LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol

LOQ, limit of quantification

QC, quality control

SNP, single-nucleotide polymorphism

SPE, solid-phase extraction

TFA, trifluoroacetic acid

ABSTRACT

Apolipoproteins govern lipoprotein metabolism and are promising biomarkers of metabolic and cardiovascular diseases. Unlike immunoassays, mass spectrometry enables the quantification and phenotyping of multiple apolipoproteins. Hence, here we aimed to develop an LC–MS/MS assay that can simultaneously quantitate 18 human apolipoproteins [A-I, A-II, A-IV, A-V, B48, B100, C-I, C-II, C-III, C-IV, D, E, F, H, J, L1, M, and (a)] and determined apoE, apoL1, and apo(a) phenotypes in human plasma and serum samples. The plasma and serum apolipoproteins were trypsin digested through an optimized procedure and peptides were extracted and analyzed by LC–MS/MS. The method was validated according to standard guidelines in samples spiked with known peptide amounts. The LC–MS/MS results were compared with those obtained with other techniques, and reproducibility, dilution effects, and stabilities were also assessed. Peptide markers were successfully selected for targeted apolipoprotein quantification and phenotyping. After optimization, the assay was validated for linearity, lower limits of quantification, accuracy (biases: –14.8% to 12.1%), intra-assay variability (CVs: 1.5%–14.2%), and inter-assay repeatability (CVs: 4.1%–14.3%). Bland–Altman plots indicated no major statistically significant differences between LC–MS/MS and other techniques. The LC–MS/MS results were reproducible over five repeated experiments (CVs: 1.8%–13.7%), and we identified marked differences among the plasma and serum samples. The LC–MS/MS assay developed here is rapid, requires only small sampling volumes, and incurs reasonable costs, thus making it amenable for a wide range of studies of apolipoprotein metabolism. We also highlight how this assay can be implemented in laboratories.

KEYWORDS: apolipoproteins, mass spectrometry, proteomics, lipoprotein metabolism, metabolic disease, assay development, isotopic labeling, lipid metabolism, plasma lipid, serum lipid.

INTRODUCTION

Apolipoproteins govern lipoprotein regulation and metabolism. They constitute a family of multifunctional proteins that structure lipoprotein particles and direct their metabolism through binding to cell-surface receptors and regulation of enzyme activities (1, 2). As apolipoproteins are involved in pro- and anti-atherosclerotic processes, they are important circulating biomarkers of metabolic dysfunction and atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) (1, 3, 4).

The primary clinical application of plasma apolipoprotein measurements is the early detection of metabolic diseases leading to CVD (3–5). Plasma concentrations of apolipoprotein (apo)B100 and apoA-I have been reported to predict the risk of CVD better than those of low- and high-density lipoprotein cholesterol (LDL-C and HDL-C, respectively) (1, 3, 4). ApoC-III and lipoprotein (a) [Lp(a)] are also considered as powerful CVD risk factors (6, 7). Additionally, postprandial metabolism is important in atherogenesis, particularly in the context of obesity, insulin resistance and diabetes. ApoB48, apoCs, and apoE have become predominant markers of CVD-related risk in this emerging field (4, 8). Furthermore, the phenotyping of the major apoE isoforms and other apolipoproteins or apolipoprotein-like proteins (1, 2, 4, 5, 9) is used to diagnose mixed dyslipidemias (10–12).

Immunoassays used for apolipoprotein quantification are associated with many drawbacks, and their standardization is limited to the major apolipoproteins (3, 4). In contrast, mass spectrometry enables the analysis of multiple proteins from a small sample volume at a high throughput rate. Protocols usually involve the analysis of protein mixtures after enzymatic proteolysis, which are then analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), often in combination with upstream cleaning methods to reduce sample complexity (13). Thus, LC-MS/MS allows a high level of multiplexing, enabling simultaneous quantification of several proteins (14–16) and providing further information on a patient's metabolic profile by targeting specific polymorphisms that cannot be detected by immunoassays (3, 12, 16, 17).

However, LC-MS/MS suffers from non-negligible between-lab variability stemming from the lack of harmonized protocols (3). Here, we describe a multiplexed LC-MS/MS method that can simultaneously quantitate 18 human apolipoprotein species and determine pathogenic variants resulting from CVD-associated single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Each experimental step was developed, optimized, and validated in agreement with standard procedures for analytical method validations (<https://clsi.org/>) (18, 19), and major pitfalls were highlighted.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design and rationale – The present multiplex LC-MS/MS assay has been developed and validated according to the Tier 2 level of guidelines for Development and Application of Targeted Mass Spectrometry Measurements of Peptides and Proteins (20). All required information relative to the guidelines is described below. The assay was validated on 160 healthy humans and patients samples without any specific inclusion or exclusion criteria to get a broad range of lipid phenotypes.

Selection of peptide markers – Apo sequences were BLAST searched using the UNIPROT tool (www.uniprot.org), and theoretical peptides were searched using ExPASy (http://web.expasy.org/peptide_mass). Peptide candidates were selected *in silico* to maximize the sensitivity, specificity, and stability (21). Each candidate was then experimentally sought and characterized by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) from concentrated lipoprotein fractions after trypsin digestion (21). The most specific and detectable peptides were selected for assay sensitivity optimization.

Biological samples – Human EDTA plasma samples (80 males, 80 females; non-fasted; Supplemental Table S1) and paired samples of serum ($n = 160$), Li-heparin ($n = 72$), and citrate plasma ($n = 54$) were provided by the French Blood Bank (Nantes, France). Samples were immediately dispatched in single use aliquots (40 μ L) and the first LC-MS/MS assay in individuals was performed within the 14 days after collection and after a single freeze/thaw cycle. Pooled samples were prepared for each matrix by mixing

equal fractions from each individual sample. Ethics approval for sample collection was acquired from the institutional review board of Nantes University Hospital, and written informed consent was obtained from each subject. Pooled bovine EDTA plasma (6 males, 6 females) was purchased from Patricell Ltd. (Nottingham, UK) and used as a surrogate matrix for method validation as bovine apolipoprotein sequences are distinct than those of humans. Samples were stored at -80 °C until use.

Standard samples and quality controls – Synthetic labeled and unlabeled proteotypic peptides were provided by Thermo Scientific Biopolymers (Darmstadt, Germany). Stock solutions (1 mM) were prepared in 50% acetonitrile containing 0.1% formic acid (FA) and stored at -20 °C until use. A mixed solution of unlabeled peptides was constituted and serially diluted in water to obtain seven standard solutions (Table 1). Quality control (QC) samples were prepared at three concentration levels, including lower and upper limits of quantification (LOQ). Concentrated solutions were prepared in water and then diluted 10-fold in bovine EDTA plasma (QC samples) or in water (control samples) (Table 1). Labeled peptides (i.e., containing [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_2$]K, [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$]R, or [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$]I in the C-terminal position) were used as internal standards (ISs). A mixed solution of ISs (35 μM) was prepared and added to digestion buffer (ammonium bicarbonate, 50 mM) to a final concentration of 1.75 μM .

General procedure for sample preparation – Samples were prepared with the ProteinWorks™ eXpress kit (Waters, Milford, MA, USA), according to the manufacturer's instructions (Supplemental Table S2). Samples (40 μL) were incubated for 10 min at 80 °C in digestion buffer containing ISs (100 μL) and RapidGest detergent solution (7 mg/mL, 10 μL), reduced for 20 min at 60 °C with dithiothreitol (70 mM, 20 μL), alkylated for 30 min at room temperature in the dark with iodoacetamide (142 mM, 30 μL), and digested overnight at 37 °C (~16 h) with trypsin (7 mg/mL, 30 μL). Enzymatic digestion was stopped with 20% trifluoroacetic acid (TFA, 5 μL). After 15 min at 45 °C, the precipitate was removed by centrifugation (15 min, 10 °C, 10,000 $\times g$), and supernatants were cleaned on 30-mg Oasis HLB Cartridges (Waters), which were conditioned (100% methanol; 1 mL), equilibrated (100% water; 1 mL), loaded (sample; ~200 μL), washed (5% methanol; 1 mL), and eluted (80% methanol; 500 μL). The eluates

were dried under nitrogen (45 °C), reconstituted with 5% acetonitrile containing 0.1% FA (100 µL), and injected (10 µL) into the LC-MS/MS system. Analyses were performed on a Xevo[®] TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class[®] UPLC[™] device (Waters). The optimized LC-MS/MS and “Multiple Reaction Monitoring” parameters are detailed in Supplemental Tables S3 and S4.

Data management – Apolipoprotein concentrations were calculated using calibration curves plotted from standard solutions and expressed in µM, assuming that 1 mole of peptide was equivalent to 1 mole of protein. The concentrations were then converted to standard units (mg/dL) using the molecular weights (Table 1). Unlike the apoB and apoL1 isoforms (22, 23) (Fig. 1), the apoE phenotypes and isoform concentrations (E2/E3/E4) were determined from different peptide combinations (Supplemental Material) (12, 24). The mean size of apo(a) was also estimated by LC-MS/MS from two proteotypic peptides (Supplemental Material) (25).

Optimization of sample preparation – Solid-phase extraction (SPE) was optimized from QC samples treated as described above. The wash and elution conditions were optimized with increasing levels of methanol or acetonitrile in water, with or without additives (0.1% TFA or 0.5% NH₄OH), and were added directly after sample loading ($n = 8$ per condition). Several acetonitrile/water mixtures containing 0.1% FA were tested for sample reconstitution after drying ($n = 8$ per condition). Sample volumes, incubation times, and temperatures were optimized using a pooled human EDTA plasma sample to improve proteolysis ($n = 8$ per condition). Control samples were used to assess recoveries, matrix effects, and peptide stabilities throughout the experiments.

Method validation – The LC-MS/MS assay was validated *via* four independent experiments consisting in 2 calibration curves and 18 QCs (3 concentration levels, $n = 6$). The assay linearity was illustrated by R² coefficients calculated from calibration curves by linear regression analysis (1/x weighting, origin excluded). The intra-assay and inter-assay imprecisions were expressed by the coefficients of variation (CVs) obtained at each QC level. The accuracy was expressed by the mean bias between the theoretical

and measured concentrations at each QC level. Targeted lower LOQs were validated with signal-to-noise ratios greater than 10. Limits of acceptance were set at $\pm 15\%$ for accuracy and variability. To assess matrix effects and carry-over, the pooled human EDTA plasma was diluted in bovine EDTA plasma (1:0; 1:1; 1:3, and 1:7; v:v). Thirty replicates per dilution level were then trypsin digested, randomized, and injected into the LC-MS/MS system. Matrix effects were determined by comparing individual measurements in EDTA plasma versus those in serum, Li-heparin plasma, and citrate plasma.

Cross-validations – Individual EDTA plasma concentrations of apolipoproteins obtained by LC-MS/MS ($n = 160$) were compared with those obtained in a blinded fashion by standardized immuno-turbidimetry, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), LC-HRMS, and western blot (Supplemental Material). Three replicates of each QC sample and 6 replicates of the plasma pool were included to each LC-MS/MS experiment and randomly injected throughout the assay to ascertain the quality of our results as well as the proteolysis efficiency. Spearman correlations were calculated and Bland-Altman plots were generated to compare our LC-MS/MS approach with the other methods (26).

Statistical analyses – Graphics and analyses were achieved with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The D’Agostino-Pearson test was used to estimate data distribution and select the most appropriate statistical test for data comparisons (significance at $p < 0.05$). Network analysis based on Spearman correlation analysis was also performed. The Spearman’s rank correlation coefficient was computed (R software) and displayed using the “corrplot package.”

RESULTS

Selection of peptide markers – *In silico* investigations led to the identification of numerous peptide candidates per target apolipoprotein. The most specific and detectable peptides were selected to optimize the assay sensitivity and specificity by LC-HRMS experiments (not shown). Peptide candidates were primarily detected as doubly charged precursor ions, except for apoA-I (a triply charged ion). After MS/MS fragmentation, each precursor ion yielded several specific and singly charged “y” or “b” product

ions (except for apoA-I, doubly charged “y” ions), ascertaining thereby the peptide sequences (Supplemental Fig. S1). The most intense and specific peptides were selected and synthesized for the manual optimization of the “Multiple Reaction Monitoring” transitions used for LC-MS/MS analyses (Supplemental Tables S4–S6).

Optimization of sample preparation – Trypsin proteolysis optimization showed contrasting digestion profiles between apolipoproteins (Fig. 2A). Unlike the manufacturer’s recommendations (2 h, 45 °C), the optimal condition was reached with an overnight trypsin incubation at 37 °C (Fig. 2B). All other recommendations were confirmed by testing four incubation times on the pooled human EDTA plasma (not shown). SPE was also optimized on bovine EDTA plasma spiked with known amounts of synthetic peptides (QC). Methanol was slightly more efficient than acetonitrile for peptide recovery, while acidic (TFA) and basic (NH₄OH) additives did not improve extraction (Fig. 2C). The wash and elution solvents were 5% and 80% methanol, respectively. After drying, several mixtures were tested for sample reconstitution to obtain the optimal signal intensity (Supplemental Fig. S2). The most optimal mixture was 5% acetonitrile containing 0.1% FA. Higher concentrations of acetonitrile led to peak distortions for some polar peptides. Despite SPE, the plasma peptide detection was strongly reduced by 15–85%, compared with aqueous controls. These matrix effects were corrected after IS normalization and ranged from -9% to +12% (Supplemental Fig. S3). Different plasma volumes (10, 20, 30, 40, and 50 µL) were also assessed, and 40 µL was found to be more suitable for assay sensitivity and proteolysis efficiency (not shown).

Reliability of the assay – After calibration curve analysis ($n = 8$), the mean R^2 value ranged from 0.967 ± 0.012 to 0.998 ± 0.001 (linear regression, $1/x$ weighted, origin excluded), and the CVs never exceeded 14.5% over the concentration range tested (Fig. 3A, Supplemental Table S7). For the QCs, the mean absolute bias did not deviate by more than $\pm 14.8\%$, compared with the expected concentrations (Fig. 3B). Intra- and inter-assay CVs never exceeded 14.2% and 14.3%, respectively (Fig. 3C and 3D, Supplemental Table S8). Moreover, the signal-to-noise ratios measured at the lower LOQs were greater than 10 for all target peptides (Supplemental Fig. S4). The assay variability was determined by using several aliquots of

pooled human EDTA plasma diluted in bovine plasma at four dilution levels ($n = 30$ per dilution level). Samples were randomly injected into the LC-MS/MS to estimate the carry-over between injections (Fig. 3E). As expected, the concentrations of peptides generated by trypsin proteolysis were linearly decreased according to the dilutions (R^2 range: 0.889–1.000).

Comparison with other methods – The apolipoprotein concentrations measured by LC-MS/MS in individual EDTA plasma samples were similar to those obtained by immuno-turbidimetry, ELISA, and LC-HRMS (Fig. 4). The LC-MS/MS data were also strongly correlated with those obtained by the other techniques. The Bland-Altman plots highlighted non-negligible concentration differences between the analytical approaches, with deviations of up to 50%. The most marked differences in apolipoprotein concentrations were observed between LC-MS/MS and LC-HRMS measurements, suggesting that matrix effects strongly impacted the mass spectrometry measurements. LC-HRMS (Orbitrap®) experiments were also limited compared with those performed by LC-MS/MS (triple quadrupole) because of HRMS lower level of multiplexing ability related to its lower dynamic range. Only a few outliers were identified from the Bland-Altman plots ($< 5\%$), and most of them were related to the initial sample quality (i.e., hemolyzed or opalescent appearance, Fig. 4). This observation was not systematic, since 12 hemolyzed and 23 opalescent plasma samples were identified.

Apolipoprotein concentrations – The circulating apolipoprotein concentrations are provided in Table 2. Several plasma apolipoprotein concentrations were slightly but significantly different between males and females. To ensure assay repeatability, EDTA plasma measurements were repeated over five distinct experiments. The calculated CVs ranged from 1.8% to 13.7% and were within acceptable limits for mass spectrometry experiments. Of note, intra- and inter-assay CVs calculated from the QC samples and the plasma pool never exceeded 15%, validating the reproducibility of the measurements and the quality of the preparation and analytical runs. The apolipoprotein concentrations were significantly over- or underestimated in serum, Li-heparin, and citrate plasma, in comparison to EDTA plasma. The plasma apolipoprotein concentrations were also compared with other biochemical data (Supplemental Fig. S5). As

expected, strong and significant correlations were found between apolipoproteins and lipids, strengthening the reliability of LC-MS/MS for providing relevant measurements (e.g., apoA-I versus HDL-C, apoB100 versus LDL-C, etc.).

Apolipoprotein polymorphisms – An expected distribution of apoE phenotypes with a predominance of apoE3 carriers was observed (Fig. 5A). The total apoE plasma concentrations were significantly different between the apoE phenotypes, with apoE2 and apoE4 carriers exhibiting the highest and the lowest concentrations, respectively (Fig. 5B). We also confirmed that the apoE2 levels were higher than apoE3 levels in E2/E3 heterozygote carriers whereas apoE4 levels were lower than apoE3 levels in E2/E4 heterozygote carriers (Fig. 5C). The apoL1 phenotypes were also determined and showed a sharp predominance of the most common non-risk G0/G0 phenotype (Fig. 5D). We did not find any significant difference in the total apoL1 concentrations according to the phenotype (Fig. 5E). However, the apoL1 isoforms were differently expressed in heterozygotes ($G0 < G1 < G2$) (Fig. 5F). In addition, the apo(a) polymorphic sizes were estimated by LC-MS/MS. Western blot experiments revealed that 65% of patients displayed two detectable apo(a) isoforms and showed that the smallest isoform was usually the most abundant (Fig. 5G). Unlike western blot, LC-MS/MS was not able to discriminate both isoforms in heterozygotes. However, the Bland-Altman plot showed that LC-MS/MS can reliably estimate the average size of apo(a) (Fig. 5H). LC-MS/MS analysis also confirmed the slight but significant negative correlation between the apo(a) plasma concentration and the average of apo(a) polymorphic size (Fig. 5I). Finally, LC-MS/MS was able to clearly discriminate intestinal apoB48 from hepatic apoB100, despite strong sequence homologies (Table 2).

Peptide and sample stabilities – Since some peptides could be not highly stable during storage, we assessed the stability of stock solutions by using new freshly synthesized peptides. Stock solutions of labeled and unlabeled synthetic peptides were found stable for 18 months at -20 °C. The peptides were also stable in bovine plasma throughout sample preparation processes. Digested samples were stable for 5 days under refrigeration (10 °C) and 18 months at -20 °C (not shown). Furthermore, the stability of the

biological samples was assessed on pooled plasma/serum samples (Supplemental Table S9). Unlike serum, Li-heparin, and citrate plasma, the apolipoproteins were stable for 12 months at -80 °C and after five freeze/thaw cycles (-80 °C). They were also stable for 24 h at room temperature, 1 week at 4 °C, and 3 months at -20 °C. Of note, oxidized forms of peptides carrying a methionine residue (+16 and/or +32 mass unit shift) were systematically detected after long-term storage or after repeated freeze/thaw cycles (> 3). This suggested that the use of oxidized synthetic peptides is warranted for evaluating and quantifying the possible degradation of samples during storage.

DISCUSSION

LC-MS/MS enables measurements of multiple apolipoproteins in a single run, but requires specific sample manipulations prior to analysis. Hence, the development of harmonized protocols is required to minimize between-lab variability and standardize such assays. Herein, we developed a high-throughput mass spectrometry-based protocol for large-scale profiling of human circulating apolipoproteins. All steps of sample preparation were optimized from a commercially available kit before being validated according to standard guidelines. The method was then compared to other techniques and was shown to be reliable for apolipoprotein quantification and major SNP determination at very competitive costs, compared to traditional assays.

Lipoprotein metabolism abnormalities are important in metabolic diseases leading to CVD (1, 3, 4). Since apolipoproteins direct lipoprotein metabolism, their measurements can be used to improve CVD risk prediction primarily based on traditional plasma lipid testing (3). Beyond apoA-I and apoB (1, 16, 27), strong associations have been reported between CVD risk and apoC-II, apoC-III, and apoE plasma levels (7, 10, 28). The risk of developing cardiovascular or metabolic diseases also has been associated with other apolipoproteins (2, 5, 28–30), whose functions are less understood and deserve further investigations (3, 31, 32). Moreover, the detection of disease-specific polymorphisms could increase the specificity of CVD risk assessment as some isoforms display altered functionalities (12, 16, 24, 33, 34).

Whereas current immunoassays are unavailable for some apolipoproteins and lack the capacity for multiplexing, mass spectrometry enables the analysis of multiple molecules from a single sample preparation (3). Mass spectrometry can also detect and quantify apolipoprotein variants resulting from a single amino acid mutation (22, 24). Hence, mass spectrometry constitutes a powerful tool for the large-scale profiling of apolipoproteins (14–16, 35, 36). However, mass spectrometry protocols involve multiple steps: enzymatic digestion of complex samples to transform proteins into peptides (13); SPE to reduce sample complexity; and LC-MS/MS to separate and detect signature peptides. Thus, mass spectrometry-based assays suffer from great heterogeneity stemming from the lack of harmonized protocols including the applied sampling material, proteolysis conditions, cleaning methods, and proteolytic peptides (3).

The selection of peptide markers is critical to accurately quantify proteins by LC-MS/MS. They must be stable, sensitive, efficiently released from proteolysis and not interfere with nontargeted proteins. Our peptide candidates satisfy these criteria, and most of them have already been validated (12, 14–16, 22, 23, 36, 37). Nevertheless, despite careful method validations, the differences noticed in peptide selection could contribute in some extent to between-lab variability. Our set of peptide markers was successfully validated in terms of linearity, specificity, low LOQ, precision, accuracy, and short- and long-term stabilities (18, 19). However, due to the high specificity, a single subtle modification of a peptide sequence such as a single amino acid substitution or the oxidation of a methionine residue will substantially alter the mass of the wild-type or native peptide and as a result preclude proper detection by mass spectrometry. Here, we selected one peptide per target apolipoprotein to screen a large set of species, but the selection of 2–3 peptide markers per apolipoprotein (when possible) should be warranted for improving between-lab reproducibility and detecting any deviating responses (3).

Another source of variability is the proteolysis yield, which leads to an optimal release of peptide markers and is related to the selected material, reagents, experimental conditions, and choice of signature peptides (14–16). To maximize the between-lab reproducibility, we used a commercial kit specifically dedicated for proteomics. All manufacturers' instructions were validated and/or optimized to improve assay

efficiency on our set of peptides and we used internal controls (QCs and plasma pools) for validating each analytical batch. However, the use of certified reference standards is required for clinical implementation of apolipoprotein measurements and for ascertaining proteolysis efficiency.

Despite using SPE, the peptide markers were strongly impacted by matrix effects, causing sharp and variable signal reductions. This was corrected by using dedicated ISs enriched with stable isotopes. Our investigations confirmed that the applied sampling material and anticoagulant significantly influenced the results (15), possibly due to matrix effects, different proteolysis yields, or sample stability. EDTA plasma was selected as the reference material, but further studies are needed prior to the implementation of standardized protocols. Importantly, the measurement of plasma apolipoproteins may be clinically less relevant than lipoprotein subclass specific analysis (3). Matrix effects were strongly reduced in lipoprotein subclasses isolated by ultracentrifugation, gel filtration, or phosphotungstic acid precipitation of apoB-containing particles (not shown). While ultracentrifugation or gel filtration processes would complicate protocol harmonization, precipitation could be easily standardized even if analyses are limited to apoA-I-containing (HDL) or apoB-containing (non-HDL) particles.

Of note, mass spectrometry requires an initial expensive investment in both apparatus acquisition and maintenance (especially high-resolution systems). However, its high ability for multiplexing (especially triple quadrupole systems) allows for the reduction of sample volumes (<50 μ L vs. several aliquots of up to 1 mL), experimental times (~400 samples $\times$ 18 markers can be performed/week/instrument), and costs (by at least 10-fold), compared to traditional immunoassays. Therefore, LC-MS/MS enables large-scale profiling of plasma apolipoproteins in large cohorts, which is essential for improving the sensitivity of studies regarding the determination of novel CVD risk markers (1). Another advantage of LC-MS/MS for apolipoprotein metabolism studies is its ability to conduct metabolic flux analyses with stable isotope-labeled tracers. The labeled tracer (e.g., $^2\text{H}_3$ -leucine) is perfused or injected into patients, and blood samples are collected. Its incorporation within apolipoproteins is then measured over time by LC-MS/MS, and the production and catabolic rates are deduced from kinetic curves (9, 21, 24, 25). All peptide markers

selected here carry at least one leucine residue (except apoH), which makes it possible to conduct such studies. Besides, apolipoproteins also exhibit proteoforms arising from post-translational modifications that could dramatically affect their functionalities (17). Some studies have unraveled the presence and alteration of such modifications for apolipoproteins in diabetes and CVD (38–40). However, such proteoforms are numerous and present at low stoichiometric levels. Therefore, their study often requires specific enrichment methods prior to LC-MS/MS analyses (41) and remains a huge challenge.

In conclusion, mass spectrometry allows the large-scale profiling of circulating apolipoproteins in human cohorts but also enables further research investigations that traditional immunoassays cannot achieve. The attractive costs and the reduced experimental times associated with multiplexed LC-MS/MS assays make this technique of interest for clinical diagnostics. Nevertheless, LC-MS/MS in clinical laboratories still requires a high level of standardization, including 1) automated sample preparation, 2) the selection of appropriate sampling materials (e.g., EDTA plasma), 3) the harmonized selection of peptide markers, and 4) the use of certified reference standards.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data are contained within the manuscript or in the supplemental material section. All chromatograms used for quantification are available in the supplemental material.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from La Fondation de France and by the French national CHOLEsterol Personalized Innovation (CHOPIN) project, funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-RHUS-0007) and coordinated by the Centre Hospitalo-Universitaire of Nantes. Valentin Blanchard received scholarships from La Région Réunion and the European Union (European Regional Development Fund INTERREG V). We are also grateful to the Biogenouest Corsaire core facility for financial support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

REFERENCES

1. Dominiczak, M. H., and M. J. Caslake. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* **48**: 498–515.
2. Perdomo, G., and H. Henry Dong. 2009. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging.* **1**: 17–27.
3. van den Broek, I., K. Sobhani, and J. E. Van Eyk. 2017. Advances in quantifying apolipoproteins using LC-MS/MS technology: implications for the clinic. *Expert Rev. Proteomics.* **14**: 869–880.
4. Renee Ruhaak, L., A. van der Laarse, and C. M. Cobbaert. 2019. Apolipoprotein profiling as a personalized approach to the diagnosis and treatment of dyslipidaemia. *Ann. Clin. Biochem.* **56**: 338–356.
5. Brahimaj, A., S. Ligthart, M. A. Ikram, A. Hofman, O. H. Franco, E. J. G. Sijbrands, M. Kavousi, and A. Dehghan. 2017. Serum Levels of Apolipoproteins and Incident Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Diabetes Care.* **40**: 346–351.
6. Tsimikas, S. 2017. A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**: 692–711.
7. Chan, D. C., M. M. Chen, E. M. M. Ooi, and G. F. Watts. 2008. An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor? *Int. J. Clin. Pract.* **62**: 799–809.
8. Smith, D., G. F. Watts, C. Dane-Stewart, and J. C. Mamo. 1999. Post-prandial chylomicron response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**: 204–209.
9. Croyal, M., S. Billon-Crossouard, S. Goulitquer, A. Aguesse, L. León, F. Fall, M. Chétiveaux, T. Moyon, V. Blanchard, K. Ouguerram, G. Lambert, E. Nobécourt, and M. Krempf. 2018. Stable Isotope Kinetic Study of ApoM (Apolipoprotein M). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**: 255–261.

10. Huang, Y. 2010. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**: 337–345.
11. Blanchard, V., M. Croyal, I. Khantaline, S. Ramin-Mangata, K. Chemello, B. Nativel, D. J. Blom, A. D. Marais, and G. Lambert. 2019. Reduced Lipoprotein(a) Associated With the Apolipoprotein E2 Genotype Confers Cardiovascular Protection in Familial Hypercholesterolemia. *JACC Basic Transl. Sci.* **4**: 425–427.
12. Martínez-Morillo, E., H. M. Nielsen, I. Batruch, A. P. Drabovich, I. Begcevic, M. F. Lopez, L. Minthon, G. Bu, N. Mattsson, E. Portelius, O. Hansson, and E. P. Diamandis. 2014. Assessment of peptide chemical modifications on the development of an accurate and precise multiplex selected reaction monitoring assay for apolipoprotein e isoforms. *J. Proteome Res.* **13**: 1077–1087.
13. Giansanti, P., L. Tsiatsiani, T. Y. Low, and A. J. R. Heck. 2016. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat. Protoc.* **11**: 993–1006.
14. Ceglarek, U., J. Dittrich, S. Becker, F. Baumann, L. Kortz, and J. Thiery. 2013. Quantification of seven apolipoproteins in human plasma by proteotypic peptides using fast LC-MS/MS. *Proteomics Clin. Appl.* **7**: 794–801.
15. Dittrich, J., M. Adam, H. Maas, M. Hecht, M. Reinicke, L. R. Ruhaak, C. Cobbaert, C. Engel, K. Wirkner, M. Löffler, J. Thiery, and U. Ceglarek. 2018. Targeted On-line SPE-LC-MS/MS Assay for the Quantitation of 12 Apolipoproteins from Human Blood. *Proteomics*. **18**.
16. van den Broek, I., F. P. H. T. M. Romijn, J. Nouta, A. van der Laarse, J. W. Drijfhout, N. P. M. Smit, Y. E. M. van der Burgt, and C. M. Cobbaert. 2016. Automated Multiplex LC-MS/MS Assay for Quantifying Serum Apolipoproteins A-I, B, C-I, C-II, C-III, and E with Qualitative Apolipoprotein E Phenotyping. *Clin. Chem.* **62**: 188–197.
17. Nedelkov, D. 2017. Mass Spectrometric Studies of Apolipoprotein Proteoforms and Their Role in Lipid Metabolism and Type 2 Diabetes. *Proteomes*. **5**.

18. Pum, J. 2019. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv. Clin. Chem.* **90**: 215–281.
19. Allinson, J. L. 2018. Clinical biomarker validation. *Bioanalysis*. **10**: 957–968.
20. Carr, S. A., S. E. Abbatiello, B. L. Ackermann, C. Borchers, B. Domon, E. W. Deutsch, R. P. Grant, A. N. Hoofnagle, R. Hüttenhain, J. M. Koomen, D. C. Liebler, T. Liu, B. MacLean, D. R. Mani, E. Mansfield, H. Neubert, A. G. Paulovich, L. Reiter, O. Vitek, R. Aebersold, L. Anderson, R. Bethem, J. Blonder, E. Boja, J. Botelho, M. Boyne, R. A. Bradshaw, A. L. Burlingame, D. Chan, H. Keshishian, E. Kuhn, C. Kinsinger, J. S. H. Lee, S.-W. Lee, R. Moritz, J. Oses-Prieto, N. Rifai, J. Ritchie, H. Rodriguez, P. R. Srinivas, R. R. Townsend, J. V. Eyk, G. Whiteley, A. Wiita, and S. Weintraub. 2014. Targeted Peptide Measurements in Biology and Medicine: Best Practices for Mass Spectrometry-based Assay Development Using a Fit-for-Purpose Approach. *Mol. Cell. Proteomics*. **13**: 907–917.
21. Croyal, M., F. Fall, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, Y. Zaïr, K. Ouguerram, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2016. Multiplexed peptide analysis for kinetic measurements of major human apolipoproteins by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **57**: 509–515.
22. Zhou, H., M. Hoek, P. Yi, R. J. Rohm, A. Mahsut, P. Brown, J. Saunders, R. A. Chmielowski, N. Ren, D. Shuster, K. Southwick, G. Ayanoglu, D. Gorman, D. Laface, S. Santino, J. Conway, Z. Liu, D. Cully, M. Cleary, T. P. Roddy, and D. Blom. 2013. Rapid detection and quantification of apolipoprotein L1 genetic variants and total levels in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*. **27**: 2639–2647.
23. Pan, Y., H. Zhou, A. Mahsut, R. J. Rohm, O. Berejnaia, O. Price, Y. Chen, J. Castro-Perez, M. E. Lassman, D. McLaren, J. Conway, K. K. Jensen, T. Thomas, G. Reyes-Soffer, H. N. Ginsberg, D. E. Gutstein, M. Cleary, S. F. Previs, and T. P. Roddy. 2014. Static and turnover kinetic measurement of protein biomarkers involved in triglyceride metabolism including apoB48 and apoA5 by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **55**: 1179–1187.

24. Blanchard, V., S. Ramin-Mangata, S. Billon-Crossouard, A. Aguesse, M. Durand, K. Chemello, B. Nativel, L. Flet, M. Chétiveaux, D. Jacobi, J.-M. Bard, K. Ouguerram, G. Lambert, M. Krempf, and M. Croyal. 2018. Kinetics of plasma apolipoprotein E isoforms by LC-MS/MS: a pilot study. *J. Lipid Res.* **59**: 892–900.
25. Croyal, M., K. Ouguerram, M. Passard, V. Ferchaud-Roucher, M. Chétiveaux, S. Billon-Crossouard, A.-C. de Gouville, G. Lambert, M. Krempf, and E. Nobécourt. 2015. Effects of Extended-Release Nicotinic Acid on Apolipoprotein (a) Kinetics in Hypertriglyceridemic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**: 2042–2047.
26. Bland, J. M., and D. G. Altman. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet Lond. Engl.* **1**: 307–310.
27. Marcovina, S., and C. J. Packard. 2006. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *J. Intern. Med.* **259**: 437–446.
28. Pechlaner, R., S. Tsimikas, X. Yin, P. Willeit, F. Baig, P. Santer, F. Oberhollenzer, G. Egger, J. L. Witztum, V. J. Alexander, J. Willeit, S. Kiechl, and M. Mayr. 2017. Very-Low-Density Lipoprotein-Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and Are Lowered by Inhibition of APOC-III. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**: 789–800.
29. Tavernier, G., S. Caspar-Bauguil, and N. Viguerie. 2020. Apolipoprotein M: new connections with diet, adipose tissue and metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* **31**: 8–14.
30. Bick, A. G., E. Akwo, C. Robinson-Cohen, K. Lee, J. Lynch, T. L. Assimes, S. DuVall, T. Edwards, H. Fang, S. M. Freiberg, A. Giri, J. E. Huffman, J. Huang, L. Hull, R. L. Kember, D. Klarin, J. S. Lee, M. Levin, D. R. Miller, P. Natarajan, D. Saleheen, Q. Shao, Y. V. Sun, H. Tang, O. Wilson, K.-M. Chang, K. Cho, J. Concato, J. M. Gaziano, S. Kathiresan, C. J. O'Donnell, D. J. Rader, P. S. Tsao, P. W. Wilson, A. M. Hung, S. M. Damrauer, and VA Million Veteran Program. 2019. Association of APOL1 Risk Alleles With Cardiovascular Disease in Blacks in the Million Veteran Program. *Circulation.* **140**: 1031–1040.

31. Tailleux, A., P. Duriez, J.-C. Fruchart, and V. Clavey. 2002. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **164**: 1–13.
32. Wang, F., A. B. Kohan, C.-M. Lo, M. Liu, P. Howles, and P. Tso. 2015. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *J. Lipid Res.* **56**: 1403–1418.
33. Genovese, G., D. J. Friedman, M. D. Ross, L. Lecordier, P. Uzureau, B. I. Freedman, D. W. Bowden, C. D. Langefeld, T. K. Oleksyk, A. L. Uscinski Knob, A. J. Bernhardt, P. J. Hicks, G. W. Nelson, B. Vanhollenbeke, C. A. Winkler, J. B. Kopp, E. Pays, and M. R. Pollak. 2010. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science*. **329**: 841–845.
34. Erqou, S., A. Thompson, E. Di Angelantonio, D. Saleheen, S. Kaptoge, S. Marcovina, and J. Danesh. 2010. Apolipoprotein(a) Isoforms and the Risk of Vascular Disease: Systematic Review of 40 Studies Involving 58,000 Participants. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**: 2160–2167.
35. Agger, S. A., L. C. Marney, and A. N. Hoofnagle. 2010. Simultaneous quantification of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B by liquid-chromatography-multiple- reaction-monitoring mass spectrometry. *Clin. Chem.* **56**: 1804–1813.
36. von Zychlinski, A., M. Williams, S. McCormick, and T. Kleffmann. 2014. Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *J. Proteomics*. **106**: 181–190.
37. Lassman, M. E., T. M. McLaughlin, H. Zhou, Y. Pan, S. M. Marcovina, O. Laterza, and T. P. Roddy. 2014. Simultaneous quantitation and size characterization of apolipoprotein(a) by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*. **28**: 1101–1106.
38. Koska, J., H. Yassine, O. Trencheska, S. Sinari, D. C. Schwenke, F. T. Yen, D. Billheimer, R. W. Nelson, D. Nedelkov, and P. D. Reaven. 2016. Disialylated apolipoprotein C-III proteoform is associated with improved lipids in prediabetes and type 2 diabetes. *J. Lipid Res.* **57**: 894–905.

39. Azizkhanian, I., O. Trencheska, Y. Bashawri, J. Hu, J. Koska, P. D. Reaven, R. W. Nelson, D. Nedelkov, and H. N. Yassine. 2016. Posttranslational modifications of apolipoprotein A-II proteoforms in type 2 diabetes. *J. Clin. Lipidol.* **10**: 808–815.
40. Yassine, H. N., A. M. Jackson, P. D. Reaven, D. Nedelkov, R. W. Nelson, S. S. Lau, and C. H. Borchers. 2014. The Application of Multiple Reaction Monitoring to Assess Apo A-I Methionine Oxidations in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Transl. Proteomics.* **4–5**: 18–24.
41. Chatterjee, B., and S. S. Thakur. 2018. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin. Proteomics.* **15**: 32.

Table 1. Proteotypic peptides used for apolipoprotein quantification. Molecular weights (MW) were adopted from *uniprot.org* (signal peptides excluded from the calculation).

Protein	MW (kDa)	Proteotypic peptide	Concentration Range (μM)	LQC (μM)	MQC (μM)	HQC (μM)
ApoA-I	28.1	ATEHLSTLSEK	1–100	1	25	100
ApoA-II	9.3	SPELQAEAK	0.5–50	0.5	10	50
ApoA-IV	43.4	SELTQQLNALFQDK	0.5–50	0.5	10	50
ApoA-V	38.9	VQELQEQLR	0.01–1	0.01	0.25	1
ApoB48	240.8	LSQLQTYMI	0.01–1	0.01	0.25	1
ApoB100	512.9	ATGVLYDYVNK	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoC-I	6.6	TPDVSSALDK	0.05–5	0.05	1	5
ApoC-II	8.2	TAAQNLYEK	0.25–25	0.25	5	25
ApoC-III	8.8	GWVTDGFSSLK	0.25–25	0.25	5	25
ApoC-IV	11.5	ELLETVVNR	0.05–5	0.05	1	5
ApoD	19.3	VLNQELR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE	34.2	LGPLVEQGR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE2	34.2	CLAVYQAGAR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE4	34.2	LGADMEDVR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE2/E3	34.2	LGADMEDVCGR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoE3/E4	34.2	LAVYQAGAR	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoF	17.4	SGVQQLIQYYQDQK	0.05–5	0.05	1	5
ApoH	36.3	ATVVYQGER	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoJ	50.1	ELDESLQVAER	0.1–10	0.1	2.5	10
ApoL1	41.1	VAQELEEK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G0)	41.1	LNILNNNYK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G1)	41.1	LNMLNNNYK	0.05–5	0.05	1	5
ApoL1 (G2)	41.1	LNILNNK	0.05–5	0.05	1	5

ApoM	21.3	AFLLTTPR	0.1–10	0.1	2.5	10
Apo(a)	240–800	LFLEPTQADIALLK	0.005–0.5	0.005	0.1	0.5
Apo(a) Kr-IV ₂	12.5	GTYSTTVTGR	0.25–25	0.25	5	25

Kr-IV₂, apo(a) kringle IV₂; LQC, low-concentration quality control; MQC, middle-concentration quality control; HQC, high-concentration quality control.

Table 2. Apolipoprotein concentrations in nonfasted individuals and matrix effect assessment. Values are medians [25th–75th percentiles]. Apolipoprotein concentrations are in mg/dL, unless otherwise specified. EDTA plasma samples were assayed five times.

Apolipoprotein	EDTA Plasma (<i>n</i> = 160)				Serum (<i>n</i> = 160)	Li-Heparin Plasma (<i>n</i> = 72)	Citrate Plasma (<i>n</i> = 54)
	Male (<i>n</i> = 80)	Female (<i>n</i> = 80)	<i>p</i> -value ¹	CV (%)	Mean Bias (%) ²	Mean Bias (%) ²	Mean Bias (%) ²
ApoA-I	145 [126–160]	154 [133–178]	0.0016	5.6	+5.4	+1.2	-2.3
ApoA-II	33 [26–39]	34 [28–39]	0.5868	8.1	+37.2***	+29.4***	+17.3**
ApoA-IV	9 [8–11]	9 [11–13]	0.0002	10.1	-8.8***	-16.3***	-18.4***
ApoA-V	0.02 [0.01–0.06]	0.02 [0.01–0.04]	0.0452	11.3	+34.2***	+30.1***	+16.9***
ApoB48	1.4 [1.3–1.6]	1.7 [1.5–1.9]	0.0001	9.8	+12.1*	+9.5*	+11.5**
ApoB100	86 [68–100]	74 [55–96]	0.1059	4.8	+18.3***	+14.6***	+9.4**
ApoC-I	3.9 [3.1–4.9]	3.4 [2.6–4.0]	0.0024	2.4	+16.2***	+7.6*	+2.1
ApoC-II	5.5 [4.1–6.9]	4.4 [3.4–5.9]	0.0009	4.2	+8.3***	-5.6**	-16.4***
ApoC-III	8.0 [6.6–10.2]	7.5 [6.4–8.9]	0.0045	5.2	+7.9	+2.1	-3.2
ApoC-IV	0.09 [0.07–0.17]	0.04 [0.03–0.12]	0.0001	12.5	-14.5***	-21.3***	-18.9***
ApoD	3.8 [3.2–4.3]	3.1 [2.5–3.5]	0.0001	2.7	+8.8***	+2.1	-1.4
ApoE	6.4 [5.1–7.8]	6.3 [5.1–7.8]	0.4685	7.3	+58.7***	+47.3***	+43.2***

ApoF	0.38 [0.16–0.67]	0.44 [0.24–0.73]	0.1284	13.7	+5.4	+7.1	+3.5
ApoH	5.5 [4.7–6.3]	5.2 [4.6–5.9]	0.3832	4.8	+62.4***	+59.3***	+44.7***
ApoJ	11 [9–14]	11 [10–13]	0.4713	9.4	-4.3***	+2.1	-6.1***
ApoL1	1.0 [0.9–1.2]	1.3 [1.1–1.8]	0.0001	11.8	-6.3**	+1.2	+4.2
ApoM	2.5 [2.1–2.9]	2.4 [2.0–2.7]	0.1566	1.8	-5.4***	-2.3*	-1.8
Apo(a) [nM]	22 [12–63]	39 [16–77]	0.1085	3.8	+34.2***	+21.4***	+15.3***

CV, coefficient of variation (calculated over five experiments). ¹Mann-Whitney test or unpaired t-test. ²Wilcoxon matched-pairs signed rank test or paired t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Fig. 1. Selection of proteotypic peptides for apolipoprotein polymorphisms. (A) Proteotypic peptides used to distinguish apoB48 and apoB100. (B) Proteotypic peptides used to assess the mean polymorphic size of apo(a) (i.e., Kringle IV repeats [Kr-IV]). (C) Identification of apoE phenotypes by selective combinations of apoE proteotypic peptides. (D) Identification of apoL1 isoforms by specific proteotypic peptides.

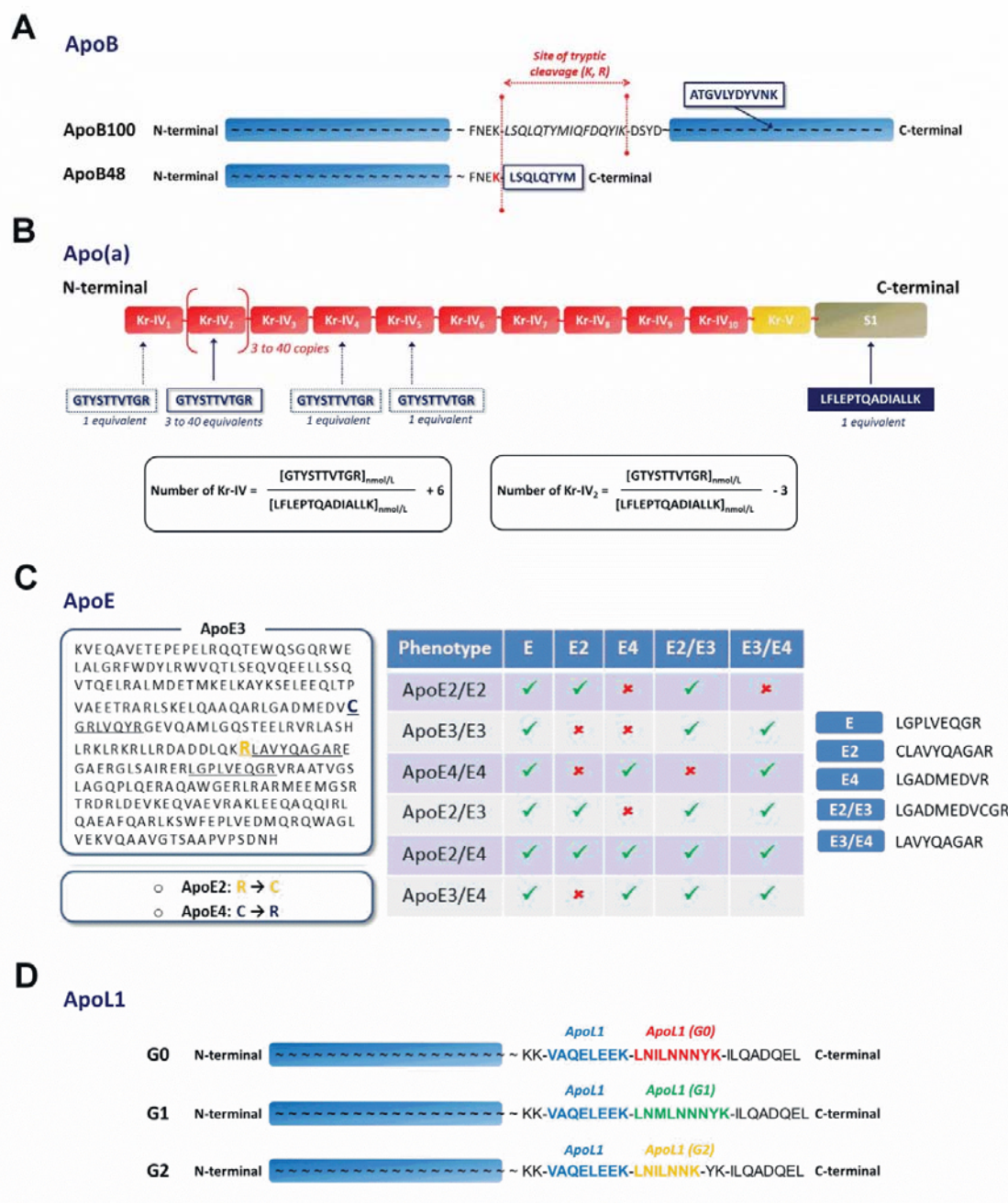


Fig. 2. Optimization of sample preparation for apolipoprotein quantification. Trypsin incubation times were optimized using a mixture of human EDTA plasma samples. Solid-phase extraction protocols were optimized using bovine plasma samples spiked with a solution of synthetic peptides (MQC). (A) Representative examples of peptides generated from trypsin digestion that require slow and fast proteolysis times. (B) Summary of optimal incubation times for all proteotypic peptides of apolipoproteins in human plasma. The optimal digestion time is indicated by the black box. (C) Representative examples of proteotypic peptides that were weakly or strongly retained in the cartridges (C_{18} , reversed-phase) during solid-phase extraction. Values are presented as the mean $\pm$ standard deviation ($n = 8$).

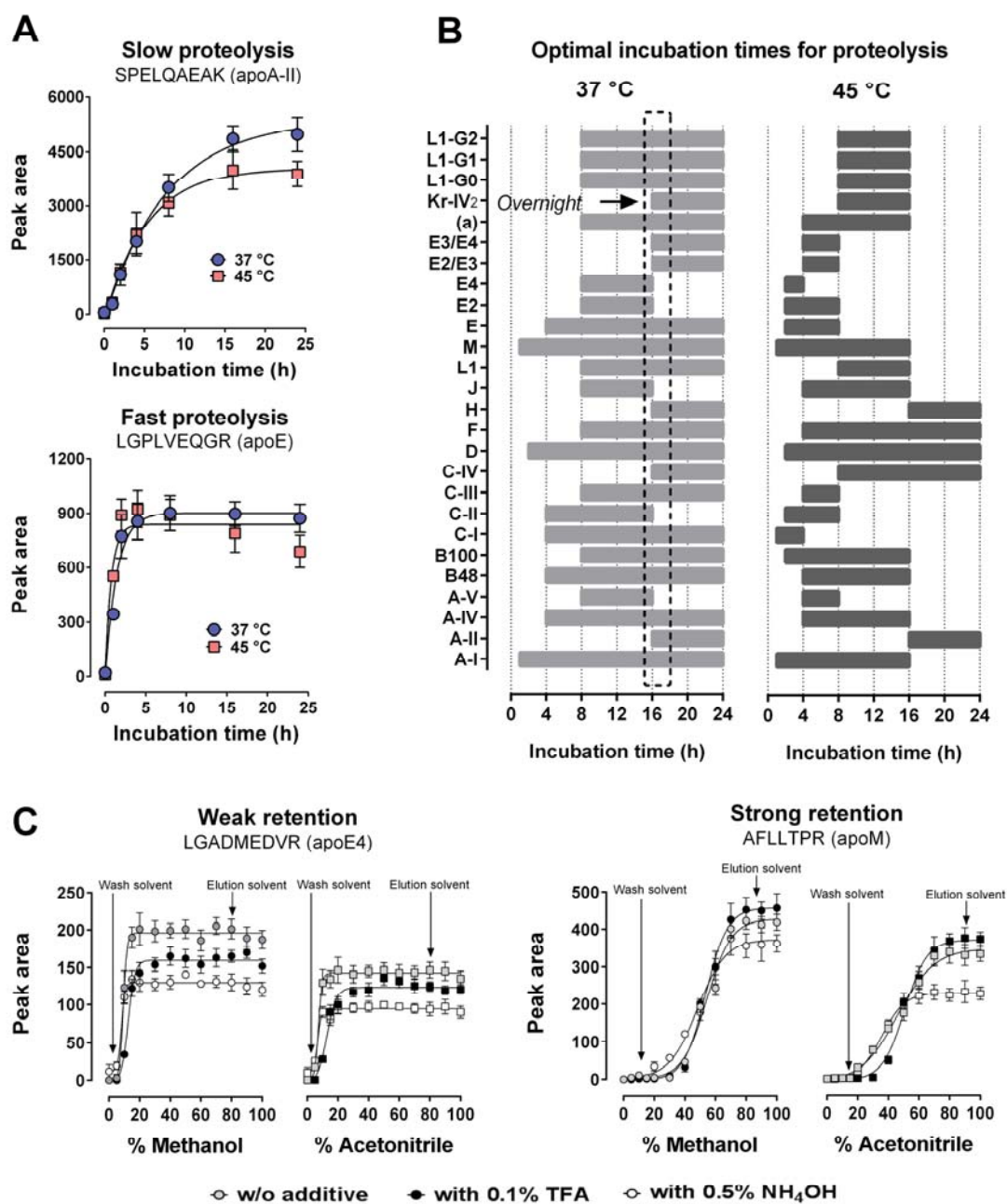


Fig. 3. LC-MS/MS validation, repeatability, and effect of matrix dilution. The analytical validation was performed over four distinct experiments. Synthetic peptides were spiked into EDTA bovine plasma and then submitted to the entire experimental process. Repeatability was evaluated using pooled human EDTA plasma serially diluted in bovine EDTA plasma. (A) Assay linearity was illustrated by the R^2 coefficient (mean $\pm$ standard deviation, $n = 8$) calculated from calibration curves by linear regression analysis (origin excluded, $1/x$ weighting). (B) Assay accuracy was expressed by the mean bias between the theoretical and the measured concentration ($n = 6 \times 4$ per level). (C) and (D) Intra-assay and inter-assay imprecisions were expressed by the coefficients of variation (CVs) obtained at each QC level ($n = 6 \times 4$ per level). (E) Repeatability of the assay and matrix effects (mean $\pm$ standard deviation, $n = 30$ per dilution level, randomly injected). Dotted lines indicate our limits of acceptance ($\pm 15\%$) in panels B, C, and D. LQC, low-concentration quality control; MQC, middle-concentration quality control; HQC, high-concentration quality control.

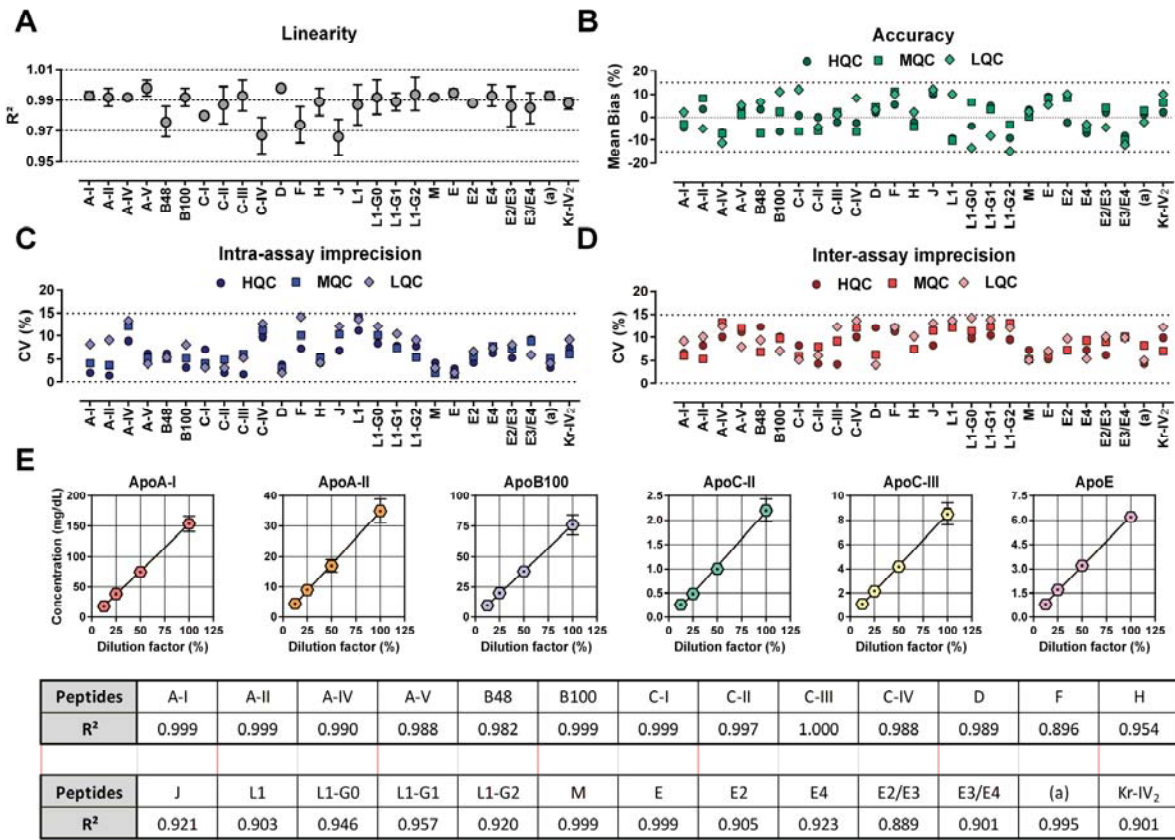
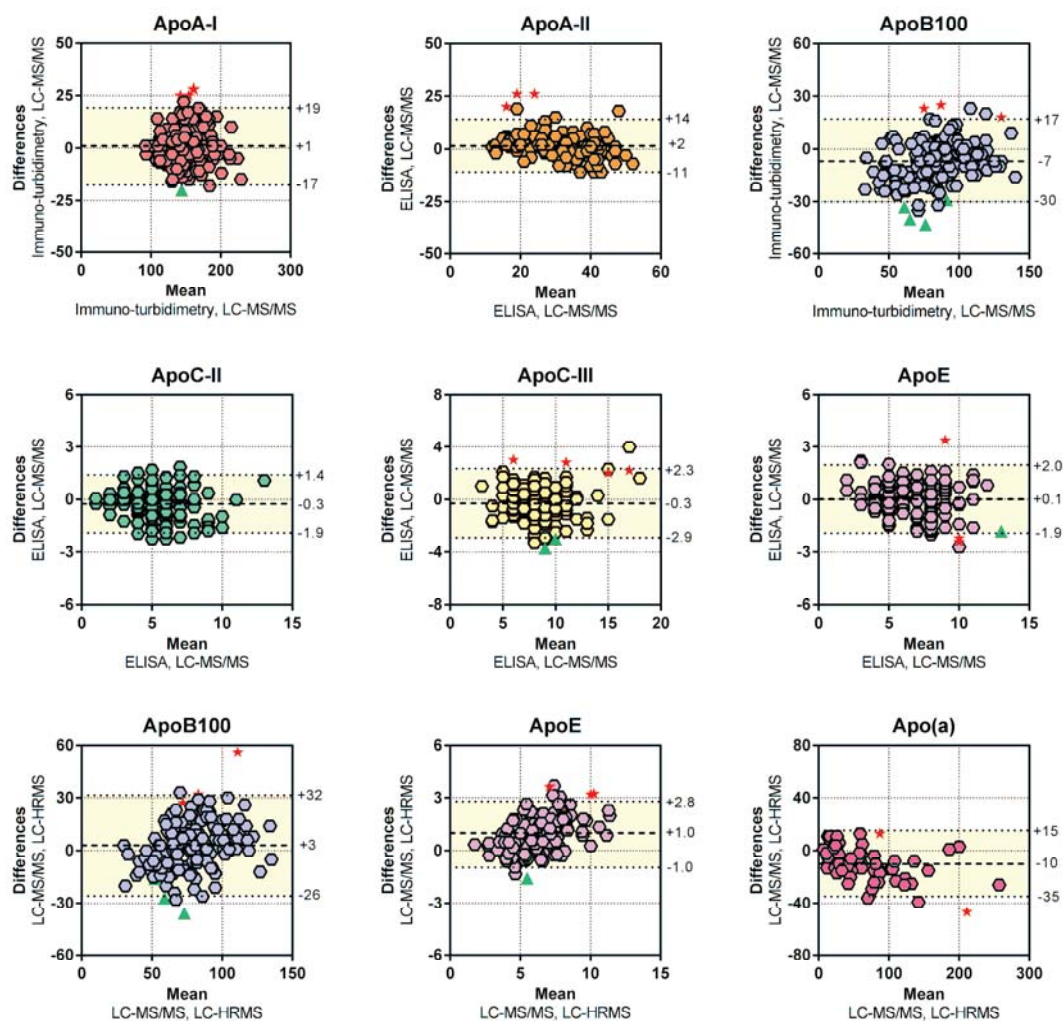
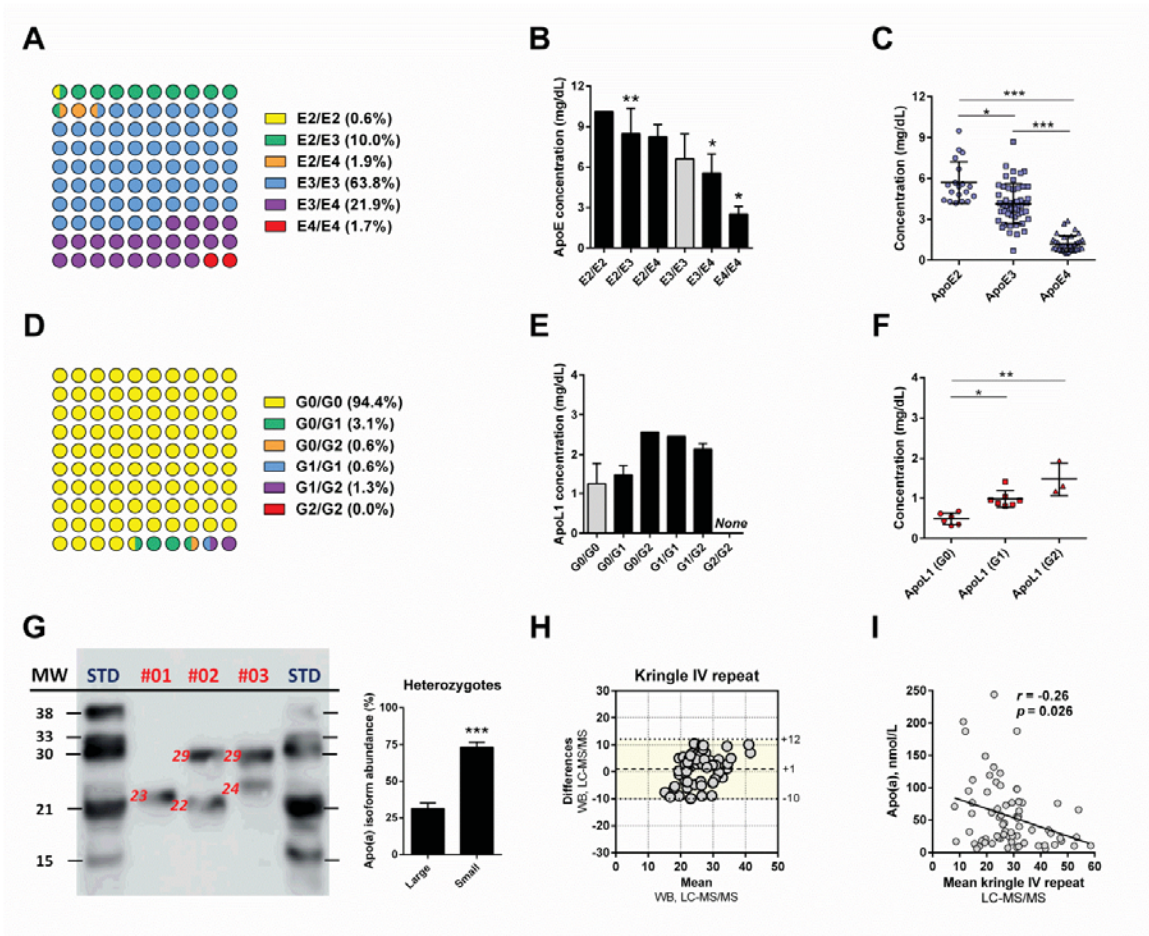


Fig. 4. Cross-validation of the LC-MS/MS assay with other techniques. Bland-Altman plots and Spearman correlations were generated to test the similarity of various methods ($n = 160$). For the Bland-Altman plots, the difference of values (y-axis) obtained from two methods was plotted according to the average value obtained by two methods. The mean difference and the limits of agreement (colored area), corresponding to the 95% confidence level (i.e., $\text{mean} \pm 1.96 \times \text{standard deviation}$), are represented. Red stars indicate hemolyzed plasma samples. Green triangles indicate opalescent plasma samples. Spearman correlations between LC-MS/MS and other methods are indicated.



Spearman <i>r</i> coefficient (<i>p</i> -value)	LC-MS/MS						
	ApoA-I	ApoA-II	ApoB100	ApoC-II	ApoC-III	ApoE	Apo(a)
Immuno-turbidimetry	0.92 (<0.0001)		0.85 (<0.0001)				
ELISA		0.86 (<0.0001)		0.91 (<0.0001)	0.82 (<0.0001)	0.91 (<0.0001)	
LC-HRMS			0.79 (<0.0001)			0.87 (<0.0001)	0.96 (<0.0001)

Fig. 5. LC-MS/MS analysis of apoE, apoL1, and apo(a) polymorphisms. (A) Distribution of the apoE phenotype was determined by LC-MS/MS and LC-HRMS (100% agreement). (B), (C) Influence of the apoE phenotype on the total apoE plasma concentration and the plasma concentrations of the apoE isoforms in heterozygous patients (E2/E3, E2/E4, and E3/E4). (D) Distribution of the apoL1 phenotype as determined by LC-MS/MS. (E), (F) Influence of the apoL1 phenotype on the total apoL1 plasma concentration and the plasma concentrations of the apoL1 isoforms in heterozygous patients (G0/G1, G0/G2, and G1/G2). (G) Determination of apo(a) polymorphic sizes (kringle IV [KrIV] repeats) by western blot. (H) Bland-Altman plots were generated to test the similarity of LC-MS/MS and western blot for the determination of the apo(a) polymorphic size ($n = 71$, LC-MS/MS detectable values). The mean difference and the limits of agreement (colored area), corresponding to the 95% confidence level (i.e., mean $\pm 1.96 \times$ standard deviation), are represented. (I) Influence of the apo(a) polymorphic size on the apo(a) plasma concentration (Spearman's test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test). For (B) and (E), the plasma concentrations were compared to the healthy phenotypes (i.e., E3/E3 or G0/G0).



Titre : Rôle intestinal et au-delà du métabolisme du cholestérol de PCSK9

Mots clés : PCSK9, intestin, lipémie postprandiale, allergie alimentaire

Résumé : PCSK9 (ProProtein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) est le 3^e gène responsable de l'hypercholestérolémie familiale. En effet, PCSK9 est un inhibiteur naturel du récepteur au LDL. Les patients présentant des mutations gain de fonction pour PCSK9 sont à très haut risque concernant les maladies cardiovasculaires. En plus de son impact sur le métabolisme du cholestérol, PCSK9 joue un rôle dans un autre facteur de risque cardiovasculaire : la lipémie postprandiale. Ce phénomène caractérisé par une élévation des triglycérides plasmatiques après un repas est facteur de risque des maladies cardiovasculaires dans certaines pathologies notamment chez les patients diabétiques de type 2. Il a été montré que les modèles murins déficients pour PCSK9 ont une réduction de leur lipémie postprandiale.

Lors de ma thèse, nous avons montré par l'utilisation de modèle de souris déficiente, l'inhibition de PCSK9 par anticorps anti-PCSK9 et le développement d'un modèle original de déficience intestinale de PCSK9 que la forme circulante de PCSK9 est cruciale dans le phénomène de lipémie postprandiale.

Au delà du métabolisme des lipides, il a été montré que PCSK9 joue un rôle dans les réponses inflammatoires, notamment au cours d'un choc septique. Lors de ma thèse, nous avons observé l'impact de la déficience et de l'inhibition de PCSK9 sur le développement de l'allergie alimentaire. Nous avons mis en évidence que l'absence de PCSK9 protège de l'apparition des symptômes de l'allergie.

Ma thèse a donc permis de mettre en lumière un rôle de PCSK9 au delà du métabolisme du cholestérol et au niveau intestinal.

Title : Intestinal role and beyond cholesterol metabolism of PCSK9

Keywords : PCSK9, intestine, postprandial lipemia, food allergy

Abstract : PCSK9 (ProProtein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) is the 3rd gene responsible for familial hypercholesterolemia. Indeed, PCSK9 is a natural inhibitor of the LDL receptor. Patients with PCSK9 gain function mutations are at very high risk for cardiovascular disease. In addition to its impact on cholesterol metabolism, PCSK9 plays a role in another cardiovascular risk factor: postprandial lipemia. This phenomenon, characterized by a rise in plasma triglycerides after a meal, is a risk factor for cardiovascular disease in certain pathologies, particularly in patients with type 2 diabetes. It has been shown that mouse models deficient in PCSK9 have a reduction in their postprandial lipemia. During my thesis, we showed by using deficient mouse

models, inhibition of PCSK9 by anti-PCSK9 antibodies and the development of an original model of intestinal PCSK9 deficiency that the circulating form of PCSK9 is crucial in the phenomenon of postprandial lipemia.

Beyond lipid metabolism, PCSK9 has been shown to play a role in inflammatory responses, particularly during septic shock. In my thesis, we observed the impact of PCSK9 deficiency and inhibition on the food allergy development. We showed that the absence of PCSK9 protects against the onset of allergy symptoms.

My thesis has therefore highlighted the role of PCSK9 beyond cholesterol metabolism and at the intestinal level.