

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ LAVAL  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN MÉDECINE EXPÉRIMENTALE  
OFFERTE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
EN VERTU D'UN PROTOCOLE D'ENTENTE  
AVEC L'UNIVERSITÉ LAVAL

PAR  
NICOLE ROBITAILLE

POLYMORPHISME DE L'APOLIPOPROTÉINE E  
AU SEIN DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU

AVRIL 1994

Droits réservés



### **Mise en garde/Advice**

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

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

Ce mémoire a été réalisé à l'Université du Québec à Chicoutimi dans le cadre de programme de maîtrise en médecine expérimentale de l'Université Laval extensionné à l'Université du Québec à Chicoutimi.

## RÉSUMÉ

LE POLYMORPHISME DE L'APO E AU SEIN  
DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU.

Le gène de l'apolipoprotéine E qui est polymorphique, est directement impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides. La fréquence de ses trois allèles a été mesurée dans plusieurs populations et différentes études ont montré que le polymorphisme de l'apo E exerçait une influence sur les concentrations de lipides, de lipoprotéines et d'apolipoprotéines dans les populations, l'allèle  $\epsilon 2$  ayant pour effet d'abaisser les niveaux de cholestérol total (Chol) et de cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL-C), tandis que l'allèle  $\epsilon 4$  exerce un effet contraire. Vue l'importance de cet effet sur les niveaux lipidiques, l'hypothèse a été émise que la variation génétique au sein des apolipoprotéines pouvait être un déterminant majeur du risque de MCV.

Dans le but de déterminer les effets du polymorphisme de l'apolipoprotéine E (apo E) sur le profil lipidique de la population du Lac St-Jean-Chibougamau, les phénotypes de l'apo E ainsi que les concentrations plasmatiques de cholestérol total (Chol), de cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL-C) et de haute densité (HDL-C) et de triglycérides (TG) ont été déterminés chez 435 personnes âgées de 18 à 74 ans. Les fréquences des allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  dans cette population, ont été estimées à 0.137, 0.749 et 0.114, respectivement. Pour les fins de l'analyse, l'échantillon a été subdivisé en trois sous-groupes: les hommes, les femmes préménopausées et les femmes ménopausées. Après ajustement des données pour

les effets de l'âge, du poids, de la taille, du ratio taille/hanche (WHR) et de l'indice de masse corporelle (BMI) dans chacun des sous-groupes, l'ANOVA a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes phénotypiques Apo E2 (E2/E2 et E3/E2), Apo E3 (E3/E3) et Apo E4 (E4/E3 et E4/E4) pour toutes les variables lipidiques chez les hommes et pour le CHOL et le LDL-C chez les femmes. À la fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 2$  était également associée des concentrations plus élevées de TG chez les hommes et les femmes ménopausées.

La subdivision de l'échantillon en 4 districts (Alma, Dolbeau, Roberval et Chibougamau) a révélé des différences dans les fréquences de l'apo E entre les districts, particulièrement au niveau de la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$ . Dans le district de Chibougamau, celle-ci était significativement plus élevée que celle des trois autres districts réunis (Alma, Dolbeau, Roberval). Malgré des différences importantes dans les fréquences des allèles de l'apo E entre les districts, l'analyse de la variance à deux facteurs (Apo E et districts) n'a pas permis de révéler de différence significative dans les concentrations des variables lipidiques entre les districts concernés. À l'exception d'une fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 2$  associée à une augmentation des niveaux de triglycérides, ces résultats sont similaires à ceux observés dans d'autres populations caasiennes.

  
Nicole Robitaille

Louis Pérusse

## AVANT-PROPOS

Ce projet de recherche a été rendu possible grâce à la collaboration du Département de Santé Communautaire de Roberval, du Groupe de Recherches sur l'Athérosclérose et les Hyperlipidémies de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal et grâce aussi au Laboratoire de Recherches sur les lipides de l'hôpital St-Michaels de Toronto.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le Dr Louis Pérusse pour avoir dirigé mes travaux de maîtrise et m'avoir guidée tout au long de cette recherche. Je le remercie aussi pour le souci qu'il a eu, en sa qualité de professeur, de nous donner la meilleure formation possible dans les domaines de la génétique et de l'épidémiologie.

J'adresse aussi des remerciements particuliers à mon conjoint, Louis Giguère pour son aide soutenu, son support, ses encouragements. Sans son aide précieuse à la maison, avec les enfants, et grâce aussi à son expérience de recherche, je n'aurais sans doute pu réaliser mes objectifs.

Je voudrais également remercier toute l'équipe du Centre interuniversitaire de recherches sur les populations (SOREP) et son directeur, M. Gérard Bouchard, pour m'avoir fourni les ressources humaines et techniques nécessaires à la réalisation de ce projet. Finalement, je désire remercier, Régis Couture, Camille Simard, Robin Simard et Najet Ben Yaissef pour leur aide technique lors de la création du fichier de travail nécessaire aux analyses statistiques. A toute ces personnes, merci.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ . . . . .	iii
AVANT-PROPOS . . . . .	v
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	vi
LISTE DES FIGURES . . . . .	viii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS . . . . .	ix
 CHAPITRE I: INTRODUCTION . . . . .	 1
 CHAPITRE II: PROBLÉMATIQUE DE LA MCV. . . . .	 5
2.1. MORTALITÉ PAR MCV. . . . .	6
2.2. LES FACTEURS DE RISQUE DE LA MALADIE CORONARIENNE . . . . .	9
2.2.1. Le cholestérol . . . . .	10
2.2.2. Les triglycérides . . . . .	14
2.2.3. Le cholestérol et la variation interindividuelle: influence de l'hérédité et de l'environnement . . . . .	22
2.3. L'APOLIPOPROTÉINE E. . . . .	24
2.3.1. Caractéristiques: . . . . .	24
2.3.2. Fréquences des allèles de l'apo E dans les populations. . . . .	30
2.3.3. Impact du polymorphisme de l'apolipoprotéine E sur les lipides, les lipoprotéines et les apolipoprotéines. . . . .	34

2.3.4. Polymorphisme de l'apo E et hyperlipidémies. . . . .	42
2.3.5. Apolipoprotéine E et maladies coronariennes. . . . .	45
2.3.6. Le gène de l'apo E et les interactions avec d'autres gènes, ainsi qu'avec l'environnement. . . . .	53
CHAPITRE III: POLYMORPHISME DE L'APOLIPOPROTÉINE E AU SEIN DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU: I. FRÉQUENCES DES ALLELES ET EFFETS SUR LES CONCENTRATIONS DE LIPIDES ET DE LIPOPROTÉINES. . . . .	59
CHAPITRE VI: POLYMORPHISME DE L'APOLIPOPROTÉINE E AU SEIN DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU: COMPARAISON DES FRÉQUENCES ALLÉLIQUES ENTRE LES SOUS-RÉGIONS. . . . .	87
LES CONCLUSIONS . . . . .	117
RÉFÉRENCES . . . . .	121



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Fréquence des allèles de l'apolipoprotéine E dans 46 populations.....	33
--	----

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaisons des fréquences relatives des allèles de l'apolipoprotéine E dans les différentes popula- tions regroupées selon la race.....	31
--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Apo:	apolipoprotéine
BMI:	indice de masse corporelle
βVLDLs:	lipoprotéines beta de très faible densité
CAD:	Maladie coronarienne
Chol:	Cholestérol
DSC:	Département de Santé Communautaire
FCHL:	Hyperlipidémie familiale combinée
FH:	Hypercholestérolémie familiale
FHTG:	Hypertriglycéridémie familiale
HDLs:	Lipoprotéines de haute densité
HDL-C:	Cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité
HTG:	Hypertriglycéridémiques
IEF:	Électrophorèse selon le gradient de pH sur gel de polyacrylamide
LDLR:	Récepteur des lipoprotéines de faible densité
LDLs:	Lipoprotéines de faible densité
LDL-C:	Cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité
Lp(a):	Lipoprotéine (a)
MCV:	Maladies cardio-vasculaires
mmol/l:	Millimoles/litre
RFLPs:	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction
TG:	Triglycérides
VLDLs:	Lipoprotéines de très basse densité
VLDL-TG:	Triglycérides associés aux lipoprotéines de très basse densité

## CHAPITRE I.

### INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont, avec le cancer, les maladies qui frappent le plus les populations des pays industrialisés. Elles sont la cause principale des décès et des incapacités. Grâce à la publicité et à la mise sur pied de programmes de prévention chez les personnes à risque ces dix dernières années, la mortalité par MCV a toutefois considérablement chuté. Malgré cela, elle demeure encore la principale cause des décès prématurés au Québec et en Amérique du Nord.

Plusieurs études épidémiologiques ont permis d'identifier certains facteurs de risques de MCV; l'hypercholestérolémie, l'usage du tabac, l'hypertension, l'obésité, l'inactivité physique et l'hérédité sont parmi les plus importants. L'hérédité y joue un grand rôle car des études ont permis de démontrer que les risques de développer une MCV étaient de 2.5 à 7 fois plus élevés chez des personnes dont l'histoire familiale est positive pour cette maladie. (Jorde et al. 1988). Afin de mieux comprendre le rôle de l'hérédité dans l'étiologie des MCV, les chercheurs ont tenté de quantifier la contribution de l'hérédité au sein des principaux facteurs de risque de MCV.

Le cholestérol sanguin étant un important prédicteur de MCV, plusieurs équipes de recherche ont essayé par différentes approches de déterminer la part de l'hérédité et de l'environnement dans la variation interindividuelle des lipides et des lipoprotéines plasmatiques. Ces recherches ont permis d'établir qu'environ 50% de la variation interindividuelle au niveau du cholestérol est associée à des facteurs génétiques. De plus, pour mieux comprendre les causes des MCV, plusieurs laboratoires aux U.S.A et en Europe ont concentré

leurs études sur la compréhension du métabolisme des lipides. Grâce aux progrès de la technologie et de la biologie moléculaire, on a pu identifier des gènes responsables de la régulation des lipides sanguins. Ainsi on a découvert que le gène codant pour l'apolipoprotéine E (Apo E) présentait du polymorphisme. Comme ce gène est directement impliqué dans la régulation des lipides en permettant la liaison des lipoprotéines à des récepteurs spécifiques, il devenait très intéressant de l'utiliser comme marqueur génétique dans la population. Les études subséquentes ont montré que le polymorphisme de l'Apo E se traduisait par des différences dans le métabolisme des lipides et qu'il pouvait ainsi influencer le risque de MCV.

Deux études portant sur les causes de mortalité au Lac St-Jean-Chibougamau pour la période de 1979-83 et 1984-88 ont établi que les MCV étaient responsables d'une grande part des décès survenus pendant ces périodes. Bien qu'au cours de ces périodes, les décès par MCV aient diminué considérablement par rapport aux périodes précédentes et ce dans tout le Québec, dans la région du Lac St-Jean-Chibougamau on a noté une surmortalité par infarctus du myocarde chez les hommes et une surmortalité par maladies cérébro-vasculaires chez les femmes (Lapierre 1990).

Considérant le rôle du polymorphisme de l'apo E dans le risque de MCV et la surmortalité par MCV observée dans la région du Lac St-Jean Chibougamau, on a émis l'hypothèse que les fréquences alléliques de l'apo E au sein de cette dernière pouvaient être différentes de celles observées ailleurs dans d'autres populations et déterminer ainsi un profil lipidique rendant cette population plus à risque de

développer une MCV. Ce présent projet de recherche a donc pour but de vérifier cette hypothèse sur un échantillon de 435 hommes et femmes ayant participé à l'enquête québécoise sur la Santé Cardio-vasculaire tenue en 1990.

## CHAPITRE II.

### PROBLÉMATIQUE DE LA MCV.

## 2.1. MORTALITÉ PAR MCV.

La maladie cardio-vasculaire (MCV) est une des maladies les plus mortelles. Aux U.S.A. en 1982, 30% des décès étaient attribuables aux MCV (NIH, 1983). Au Canada, pendant la même période, les MCV étaient responsables de 43% de tous les décès. Au Québec, la situation n'est pas vraiment différente. Une étude portant sur l'année 1986 a montré que 40% des hommes et 44% des femmes étaient décédés de maladies cardio-vasculaires (Nicholls et al. 1988). Bien que depuis 1960 il y ait eu une diminution considérable du taux de mortalité par MCV partout au Canada, c'est le Québec qui affiche la diminution la moins importante.

Les MCV regroupent plusieurs types de maladies reliées au coeur: on retrouve les maladies ischémiques du coeur, dont l'infarctus du myocarde est la principale manifestation, les maladies cérébro-vasculaires, les autres maladies des artères, les maladies hypertensives, et autres maladies moins fréquentes. Les études sur les principales causes de mortalité au Québec sont généralement conduites par les départements de Santé Communautaire (DSC) des régions. Au Saguenay, pour la période 1979-83, il a été démontré que 40.4% des hommes et 45.9% des femmes étaient décédés de maladies cardio-vasculaires, principalement de maladies ischémiques du coeur (52%) et de maladies cérébro-vasculaires (23%). Toutefois la structure de la mortalité au Saguenay n'a pas montré de différence par rapport à celle de l'ensemble du Québec, mais les risques relatifs de décès par MCV ont révélé qu'il y avait une surmortalité par MCV de 11% chez les hommes et 19% chez les femmes (Bouchard et al. 1989).



Le DSC de Roberval a aussi rendu public les résultats de son travail sur le profil de la mortalité de cette région comprenant 4 districts socio-sanitaires: Chibougamau, Roberval, Dolbeau, Alma (Lapierre. 1990). L'étude qui a porté sur la période 1979-83 révèle que les MCV sont responsables de 41.2% des décès survenus dans la population du Lac St-Jean-Chibougamau, les maladies ischémiques du coeur (50.7%) et les maladies cérébro-vasculaires (23.6%) étant responsables de la majeure partie de ces décès.

Bien que la mortalité par MCV ait considérablement diminué au cours de la période 1979-83 dans la région du Lac St-Jean-Chibougamau, comme ailleurs au Québec, des écarts importants persistent entre le territoire du DSC de Roberval et l'ensemble du Québec. La mortalité féminine par MCV présente un excédent de l'ordre de 17% par rapport à l'ensemble du Québec. Cette surmortalité est attribuable aux maladies cérébro-vasculaires (50% de plus) chez les femmes et touche surtout les femmes âgées de 45 ans et plus. La mortalité masculine par MCV dans la région se compare à celle du Québec. Toutefois en regardant les causes spécifiques, on dénote une surmortalité par infarctus du myocarde chez les hommes de 25-44 ans (+61%) et chez les hommes de 45 à 64 ans (+19%), ce qui correspond à un excédent total de 7 décès par an. Il y a aussi surmortalité par maladies cérébro-vasculaires (+38%) surtout chez les hommes de 25-44 ans et ceux de 45-64 ans. Autre fait à noter, la surmortalité se concentre surtout dans deux districts socio-sanitaires: Alma et Roberval. Dans le district d'Alma, les maladies cérébro-vasculaires font le plus de victimes chez les femmes de 65 ans et plus (+91%) et chez les hommes (+55%), tandis que l'infarctus du myocarde est responsable d'une

surmortalité de 52% chez les hommes. Pour le district de Roberval, la situation est à peu près la même, les MCV faisant plus de victimes chez les femmes (+32%), les maladies cérébro-vasculaires étant en partie responsables de ces excédents.

Un rapport publié en mai 1992 (Lapierre. 1992) fait état d'une nette amélioration de la situation de la santé cardio-vasculaire dans la région du Lac St-Jean-Chibougamau pour la période 1984-89 par rapport à la période antérieure. On assiste à une réduction importante de la mortalité à la fois pour l'ensemble des MCV et pour chaque maladie spécifique considérée séparément. Il y a baisse de mortalité pour les maladies cérébro-vasculaires chez les hommes et chez les femmes (-37% et -18% respectivement) ainsi qu'une baisse importante de mortalité par maladies ischémiques du coeur chez les hommes (-14%) et chez les femmes (-12%). Toutefois si on compare avec le Québec, il existe encore des écarts entre le territoire du DSC de Roberval et l'ensemble du Québec pour ce qui est de la mortalité par MCV (+4%), avec un excédent assez marqué pour les maladies cérébro-vasculaires (+32%). La population féminine se caractérise par une surmortalité pour l'ensemble des MCV (+14%), toujours due aux maladies cérébro-vasculaires (+48%). Chez les hommes, la situation s'est nettement améliorée. La mortalité pour l'ensemble des MCV est équivalente à celle du Québec et l'on note même une sous-mortalité par maladies ischémiques du coeur (-14%). Tout comme pour la période 1979-83, la surmortalité par maladies cardio-vasculaires est surtout marquée dans les districts d'Alma et de Roberval.

Malgré la réduction importante de la mortalité par MCV au cours des vingt dernières années au Lac St-Jean-Chibougamau, les MCV sont encore un problème de santé majeur et demeurent la première cause de mortalité dans cette population. La situation au Lac St-Jean-Chibougamau apparaît pire que dans le reste du Québec à cause d'une surmortalité par infarctus du myocarde chez les hommes et d'une surmortalité par maladies cérébro-vasculaires chez les femmes.

Bien qu'il y ait eu une diminution de la mortalité par MCV dans la région, cela n'implique pas nécessairement une diminution de l'incidence de la maladie dans cette population. La réduction de mortalité observée pourrait être attribuable à un traitement plus adéquat de la maladie par les services de santé. Une meilleure connaissance des facteurs de risque ainsi que l'adoption de meilleures habitudes de vie devraient avoir comme effet de diminuer les taux d'incidence de MCV dans la population. Malheureusement, aucune mesure d'incidence n'est disponible dans la région du Lac St-Jean-Chibougamau pour les périodes 1979-1988. Bien qu'il y ait eu une diminution importante de la mortalité par MCV dans la région on ne peut pas l'associer à une réduction correspondante du nombre de nouveaux cas enregistrés durant cette période.

## **2.2. LES FACTEURS DE RISQUE DE LA MALADIE CORONARIENNE**

Il existe plusieurs facteurs de risque associés aux maladies coronariennes. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont permis de d'identifier l'âge, le sexe masculin (Gotto et al. 1990), une histoire familiale positive (Jorde et Williams 1988), un niveau éle-

vé de cholestérol (Castelli et al. 1983), un bas taux de cholestérol de haute densité (HDL-C) (Castelli et al. 1983), le diabète (Kannel 1987), l'hypertension (Kannel 1987), l'obésité et la distribution de la graisse corporelle (Larsson 1991), le tabagisme (Kannel 1981), une alimentation riche en lipides (Gotto et al. 1990) ainsi que l'inactivité physique (Sopko et al. 1992) comme étant les principaux. La combinaison de deux ou plusieurs facteurs de risque chez un individu rend celui-ci plus susceptible de développer la maladie.

### **2.2.1. Le cholestérol**

Plusieurs études épidémiologiques ont permis d'établir qu'un niveau élevé de cholestérol était l'un des facteurs de risque les plus importants de la maladie coronarienne. Par ailleurs, les études cliniques ont démontré que le cholestérol est l'un des premiers constituants impliqués dans le processus de formation de l'athérosclérose, première cause de maladie coronarienne. L'athérosclérose est une maladie progressive caractérisée par l'accumulation de lipides au niveau d'un bris de la paroi endothéliale (intima) de la lumière de l'artère. Les lésions peuvent commencer dans l'enfance par l'altération ou la desquamation de la paroi endothéliale suivi du développement de stries lipidiques qui progressent par la suite en plaques fibreuses devenant apparentes à l'âge adulte. Plusieurs facteurs seraient responsables de cette altération et certains endothéliums seraient plus susceptibles de se briser sous l'effet combiné de tous ces facteurs (Fuster et al. 1992).

L'hypothèse la plus généralement acceptée pour expliquer la pathogénèse de l'athérosclérose a été amenée par Ross (Ross 1986) Elle intègre l'hypothèse lipidique formulée par Virchow en 1856 en une hypothèse plus complexe: l'athérosclérose se développerait en réaction au bris de la paroi endothéliale. Plusieurs facteurs impliqués dans les mécanismes de réparation interviendraient pour réparer ces bris (Ross 1986) Cela conduirait à la formation de plusieurs plaques d'athérome qui évolueraient vers la formation de plaques plus complexes pouvant provoquer l'obstruction des artères et conduire à des complications cardiaques telles que l'angine et l'infarctus du myocarde. Plusieurs études ont permis de montrer que les lipides enfermés dans les plaques étaient des esters de cholestérol provenant des lipoprotéines circulantes, c'est-à-dire des LDLs modifiés et des BVLDLs (Brown and Goldstein 1983).

Les premières études épidémiologiques faites sur des hommes ont montré une nette association entre les niveaux de cholestérol et le développement de la maladie coronarienne. Le niveau de cholestérol augmente normalement avec l'âge, mais un niveau élevé de cholestérol total (CHOL) et de LDL-cholestérol (LDL-C) chez des personnes d'âge moyen augmente leur risque de développer la maladie (Castelli et al. 1983). Une relation inverse a également été rapportée entre les niveaux de HDL-cholestérol (HDL-C) et le risque de maladie coronarienne. Les individus présentant un taux de HDL-C en dessous de 0.9 mmol/L sont 8 fois plus à risque de développer une maladie coronarienne que les individus présentant un niveau de HDL-C égal ou plus grand que 1.7 mmol/L. Il a été établi que le ratio de CHOL/HDL-C pouvait être utilisé pour prédire un éventuel développement de la

maladie coronarienne. Celle-ci commence à être observée plus fréquemment chez des individus présentant un ratio CHOL/HDL-C plus élevé que 4.5.

Dans une vaste étude faite sur un groupe d'hommes âgés entre 35 et 57 ans, (Multiple Risk Factor Intervention Trial or MRFIT) suivi pendant 6 ans, on a comparé les cas de mortalité par maladie coronarienne en regroupant les personnes selon l'âge (Kannel et al. 1986). Cette étude a révélé que la relation entre les niveaux de CHOL moyen par groupe d'âge et la mortalité par maladie coronarienne était continue et graduelle. Plus le niveau moyen de cholestérol augmente plus le risque de mourir d'une maladie coronarienne augmente. Les hommes des groupes d'âge jeune (35-39 ans) ayant un niveau de cholestérol  $\geq 6.34$  mmol/l. sont beaucoup plus à risque de mourir de la maladie (8 fois) que les hommes des groupes plus âgés (55-57 ans) qui ont le même niveau de cholestérol (2.4 fois).

D'autres études ont aussi montré qu'il pouvait exister une relation entre la diète, les niveaux moyens de cholestérol et le risque de décéder d'une maladie coronarienne. Par exemple, les résultats d'une étude faite dans 7 pays différents ont révélé que dans les régions où les niveaux moyens de cholestérol étaient bas (Japon et Yougoslavie) il y avait beaucoup moins de mortalité par maladies coronariennes que dans les pays où les niveaux moyens de cholestérol étaient plus élevés et où la diète était plus riche en gras (Keys et al. 1986). Par exemple en Finlande de l'Est, le niveau moyen de cholestérol est de 6.89 mmol/l. et le risque d'avoir un infarctus du myocarde dans cette région est 14 fois plus élevé qu'au Japon où le

niveau moyen de cholestérol est de seulement 4.16 mmol/l. Une autre étude (Ni Hon San) faites sur trois populations de Japonais vivant dans trois endroits différents, a montré qu'un changement de diète et d'habitudes de vie chez les Japonais vivant à Hawaï ou en Californie est associé à une augmentation du niveau moyen de cholestérol et à une élévation de la mortalité par maladies coronariennes (Robertson et al. 1977). Les Japonais d'Hawaï et de Californie consomment environ 12% plus de gras saturés que leurs homologues du Japon et leur taux de mortalité par maladies coronariennes est environ 2 fois plus élevé que celui des Japonais vivant dans leur pays natal.

Plusieurs études cliniques ont montré qu'en abaissant le niveau de cholestérol chez des personnes souffrant d'hypercholestérolémie on réduisait aussi le risque de décéder de la maladie coronarienne. Un traitement à la cholestyramine chez des patients présentant une hypercholestérolémie a amené, par rapport à un groupe contrôle, une réduction de cholestérol de 8 à 13% et réduit ainsi le risque de mortalité par MCV de 19% (LRCP 1984). Une réduction de 1% du niveau de cholestérol s'accompagne d'une réduction d'environ 2% dans le risque. Dans une autre étude faite en Finlande, des chercheurs ont mesuré, sur une période de 5 ans, les effets du gemfibrozil sur le profil lipidique et le risque de développer une maladie coronarienne chez des patients présentant une hypercholestérolémie de type II et IV. Les résultats du traitement ont montré une réduction de 9% du LDL-C et une augmentation de 10% du HDL-C; chaque augmentation de 1% du niveau de HDL-C réduisant de 3.4% le risque de maladies coronariennes (Manninen 1983).

Une réduction des niveaux de cholestérol s'accompagne aussi d'une régression de l'athérosclérose (Blakenhorn et al. 1987). Chez des personnes ayant déjà subi une chirurgie cardiovasculaire, un traitement combiné de colestipol hydrochloride et de niacine amena une réduction de 43% du LDL-C et une augmentation de 37% du HDL-C. Par la suite une angiographie coronarienne faite sur les patients traités montra une réduction significative des lésions athérosclérotiques chez 16.2% des patients traités comparé à seulement 2.4% chez les patients du groupe contrôle.

Toutes ces études tendent à démontrer qu'un niveau élevé de cholestérol peut être un facteur de risque important dans la maladie coronarienne et qu'une intervention au niveau du cholestérol est une bonne stratégie pour diminuer ce risque. Non seulement une intervention au niveau du cholestérol a pour effet de diminuer la progression de l'athérosclérose chez les personnes d'âge moyen ayant un niveau élevé de cholestérol, mais elle a aussi pour effet de réduire l'incidence des maladies coronariennes chez les personnes ayant un niveau modéré de cholestérol.

### **2.2.2. Les triglycérides**

Les niveaux moyens de triglycérides augmentent avec l'âge chez l'homme et chez la femme, et cette augmentation est probablement associée à une tendance à l'augmentation de poids avec l'âge. Plusieurs études épidémiologiques ont tenté de voir si il y avait une association entre l'augmentation des triglycérides et les maladies cardiovasculaires (MCV). Les premières études de cas-témoins réali-



sées à ce sujet ont démontré qu'il existait une association entre des triglycérides élevés et la maladie coronarienne dans les cas d'analyse univariée (Austin 1991). Dans 6 de ces études, l'association entre TG et MCV persistait même après avoir contrôlé pour les effets du cholestérol et des LDL-C. Cependant, ces études de cas-témoins comportaient certaines réserves car elles ne pouvaient déterminer si l'augmentation des TG précédait l'infarctus ou si c'était plutôt la conséquence de celui-ci.

Contrairement aux études de cas-témoins, la relation entre les TG et la maladie coronarienne est apparue moins évidente dans le cas des études prospectives. D'ailleurs, il existe toujours une controverse autour de la signification de cette association. Sur 18 études faites sur des sujets masculins d'âge moyen, 10 d'entre elles montraient une relation entre les TG et la maladie coronarienne. Cependant lorsqu'on utilisait l'analyse multivariée, le pouvoir des triglycérides de discriminer la maladie coronarienne diminuait considérablement lorsqu'on ajustait pour le cholestérol et il disparaissait complètement lorsqu'on ajoutait les HDLs dans l'analyse (Austin 1991; Castelli 1992).

Les études faites sur des groupes de femmes ont donné à peu près les mêmes résultats. Dans un certain nombre d'études, l'analyse univariée a montré une association entre un niveau de TG élevé et la maladie coronarienne. Dans les analyses multivariées, cette relation demeurait significative même lorsqu'on ajustait pour le cholestérol, mais elle n'était plus significative après ajustement pour les effets des HDLs. Des études subséquentes impliquant aussi des sujets

présentant un niveau de cholestérol normal ou des sujets diabétiques, ont aussi montré qu'il existait une relation entre les TG et la maladie coronarienne lorsqu'on utilisait l'analyse univariée, mais si on procédait à une analyse multivariée impliquant d'autres variables lipidiques, l'association devenait le plus souvent non-significative (Austin 1991).

Cependant, l'analyse statistique multivariée ne tient pas compte de deux aspects importants reliés aux triglycérides: 1°) la très grande variabilité, autant intraindividuelle qu'interindividuelle, reliée aux mesures des triglycérides et 2°) la corrélation inverse existant entre les triglycérides et les HDLs. On observe pour le cas des mesures intra et interindividuelles de triglycérides un écart-type beaucoup plus grand que celui observé pour les mesures intra et interindividuelles de cholestérol. Cette variation se reflète aussi dans la distribution asymétrique des triglycérides qu'on doit le plus souvent transformer en mesures logarithmiques. Il existe aussi du point de vue statistique une corrélation négative entre les TG et les HDLs ( $-0.2$  à  $-0.7$ ) (Austin 1991). Cette corrélation est en fait le reflet d'une interaction métabolique entre les VLDLs et les HDLs. Cette relation inverse existant entre les HDLs et les TG additionnée d'une grande variabilité dans la détermination des niveaux de triglycérides pourraient expliquer pourquoi les TG n'apparaissent pas comme un facteur de risque indépendant de la maladie coronarienne quand les HDLs sont inclus dans le modèle statistique. Pour contourner ce problème Abott et al. (1984) ont intégré dans leur modèle une équation résultant de la relation linéaire inverse entre les TG et les HDLs, et les résultats de leur analyse ont montré que les TG

jouaient un rôle indépendant dans le risque de maladie coronarienne chez les hommes au dessus de 50 ans, et que ce rôle avait été masqué par l'association des TG avec d'autres facteurs de risque tels que les HDLs qui sont eux-mêmes reliés aux maladies coronariennes. En fait, il a été démontré que lorsque deux facteurs de risque sont fortement corrélés statistiquement et métaboliquement, le coefficient de régression logistique d'un des facteurs peut être considérablement sous-estimé (Abbott et al. 1984).

Une autre façon de contourner ce problème a été de regrouper les mesures des TG en stratifiant les niveaux moyens de HDLs. Dans cette optique, de nouvelles analyses à partir de l'étude de Framingham ont été reprises. Elles ont montré que les triglycérides avaient peu d'impact sur le risque de maladie coronarienne dans les cas où les sujets avaient un niveau élevé de HDLs ( $HDL > 1.27\text{mmol/l}$ ). Le risque de maladie coronarienne commençait à augmenter lorsque les sujets ayant des TG élevés ( $TG > 1.57\text{mmol/l}$ ) avaient aussi un niveau de HDL bas ( $< 1.03\text{ mmol/l}$ ). Alors se développait un nouveau syndrome caractérisé par des TG élevés, un cholestérol normal et un HDL bas. Associées à ces caractéristiques, on retrouvait aussi de l'obésité, du diabète, un niveau d'acide urique élevé et de l'hypertension (Castelli 1992). Dans la population, on retrouve beaucoup de personnes présentant ces caractéristiques; ces personnes devraient être identifiées comme un groupe à haut risque car ce groupe produit deux fois plus de cas de maladies coronariennes que ceux ayant, par exemple, l'hypercholestérolémie familiale. Mais comme ces personnes ont souvent un cholestérol normal, elles sont souvent exclues des pro-

grammes de prévention à moins de présenter déjà des signes sévères de maladie coronarienne.

De plus, une certaine susceptibilité génétique pourrait rendre des individus plus à risque de présenter des niveaux de triglycérides élevés et plus à risque également de développer une maladie coronarienne. Ce serait le cas pour les proches parents de personnes faisant de l'hypertriglycéridémie familiale. En effet, on a observé des niveaux plus élevés de triglycérides chez les proches parents d'individus ayant l'hypertriglycéridémie familiale (FHTG) (Type IV) et des niveaux élevés de TG et/ou de cholestérol ainsi qu'une concentration plus grande d'apolipoprotéine B chez les membres de la famille d'individus ayant l'hyperlipidémie familiale combinée (FCHL) (Type IIb). Une étude conduite par Brunzell et al. (1976) a de plus démontré que chez 24 familles présentant la forme FCHL il y avait une augmentation significative du risque de faire un infarctus du myocarde (MI) tandis que dans 19 familles présentant plutôt la forme FHTG ce risque n'était pas différent de celui des contrôles. En effet, 10% des proches parents d'un individu ayant la forme (FCHL) avait eu un infarctus du myocarde contre 4% chez ceux dont le proche parent avait le type IV (FHTG). Dans le cas de l'hyperlipidémie de Type III, caractérisée par une extrême élévation des triglycérides (BVLDSs) et du cholestérol, les personnes atteintes développent une athérosclérose prématurée. Dans ce cas, l'augmentation des niveaux lipidiques est causée par une accumulation des résidus de chylomicrons et de VLDLs reliée à une anomalie dans l'isoforme de l'apolipoprotéine E, un composant majeur de ces lipoprotéines. En effet, 90% de ces individus possèdent le phénotype E2/E2 et des études ont

montré que cet isoforme est défectueux au niveau de sa capacité à se lier aux différents récepteurs (Gregg et al. 1984). Par contre, la maladie ne se développe qu'en présence d'un deuxième facteur, soit génétique ou un facteur provenant de l'environnement.

Les triglycérides se trouvant principalement véhiculés par les VLDLs, toute augmentation des triglycérides est le reflet d'une augmentation de la concentration de VLDLs et des résidus de VLDLs dans le sang. La corrélation négative existant entre les TG et les HDLs ( $-0.2$  à  $-0.7$ ) s'explique par une interaction métabolique entre les particules de HDLs et de VLDLs. En effet, des études ont montré qu'il y avait un transfert de molécules d'esters de cholestérol entre les HDLs et les VLDLs en échange de triglycérides. Mais dans le cas des hypertriglycéridémiques (HTG), les VLDLs contiendraient une plus grande proportion de cholestérol que les VLDLs des sujets normaux, et ceci serait la conséquence directe, dans leurs cas, des bas niveaux de HDLs (Eisenberg 1987).

Du point de vue moléculaire, la densité des VLDLs revêt aussi une certaine importance. Chez des individus présentant certaines formes d'hypertriglycémie (HTG), des études ont montré que plus les niveaux de TG augmentaient, plus on retrouvait des VLDLs de densité SF 12-60, soit la densité des  $\beta$ VLDLs, lesquels sont très athérogéniques. De plus, dans la forme FCHL, les particules de VLDLs plus denses étaient souvent associées à des LDLs également plus denses. En effet, des études récentes (Austin 1991) ont identifié deux sous-classes de LDLs: les LDLs de patron A et des LDLs de patron B plus denses. Ces études ont montré que la présence de LDL de patron B est la

conséquence de l'expression d'un gène s'exprimant de façon dominante avec plus ou moins de pénétrance. Il est apparu que les LDLs de patron B étaient significativement associées à la maladie coronarienne. En effet, 50% des cas d'infarctus du myocarde avaient des LDLs de patron B contre 26% chez les contrôles. Dans ces cas, les LDLs de patron B étaient aussi associées à une augmentation significative des triglycérides et à une diminution des HDLs (Austin 1991). Dans une population normale, Castelli (1992) affirme que lorsque les niveaux de TG augmentent à 1.13 mmol/l, les LDLs denses commencent à apparaître dans le plasma et la concentration des autres LDLs de patron A diminuent. Quand la concentration des TG atteint 1.7 mmol/l, on ne retrouve que des LDLs plus denses de patron B dans le plasma. De plus, dans le cas où les niveaux de HDLs sont plus bas que 1.03 mmol/l, les LDLs plus denses apparaissent et les LDLs normales disparaissent complètement (Castelli 1992).

Du point de vue cellulaire, les particules de  $\beta$ VLDLs sont ingérées plus facilement et plus rapidement par les macrophages que les nouvelles LDLs pour former des cellules spumeuses gorgées d'esters de cholestérol. Il a été proposé que ces particules de  $\beta$ VLDLs peuvent apparaître dans le plasma après un riche repas et être facilement capturées par les macrophages. Castelli mentionne cependant que seulement deux types de lipoprotéines riches en triglycérides peuvent être athérogéniques. Il exclut les VLDLs de densité Sf 100-400 et les chylomicrons. Chez les végétariens, lesquels ne développent pas d'athérosclérose, on ne retrouve que ce type de grosses VLDLs. Les particules athérogéniques seraient plutôt les VLDLs de densité Sf 12-60 et possiblement les LDLs plus denses. Les personnes possédant

ces deux types de particules seraient alors plus à risque de développer une maladie coronarienne.

D'autres études ont montré que les VLDLs peuvent être fractionnées en trois sous-populations de particules selon leurs densités et leurs grosseurs: VLDL-I, VLDL-II et VLDL-III (Eisenberg 1987). Les VLDL-I des hypertriglycéridémiques ont un ratio esters de cholestérol/protéines de 2 à 3 fois plus élevé que celui des VLDL-I de sujets normaux. Le processus pouvant expliquer ce fait n'est pas connu, mais des expériences récentes ont montré que les VLDL-I étaient d'excellents accepteurs de cholestérol en échange de triglycérides. De plus, l'examen de la teneur en apoprotéines des HTG-VLDLs a montré que ceux-ci avaient de 5 à 6 fois plus d'apolipoprotéine E que les VLDLs normales (Eisenberg 1987). Parce que ces grosses VLDLs contiennent plus de cholestérol que les VLDLs normales, on a suggéré que cette ingestion anormale de cholestérol chez les grosses VLDLs pourrait être impliquée dans le développement de l'athérosclérose in vivo. En effet, des expériences in vitro ont montré que les fibroblastes et les macrophages ingéraient des particules de VLDLs (VLDL-I et VLDL-II) isolées de sujets hypertriglycéridémiques mais ne capturaient pas celles isolées de sujets normaux.

La relation existant entre maladie coronarienne et triglycérides commence à s'éclaircir. Il se pourrait que les individus présentant des triglycérides élevés ( $TG > 2.3 \text{ mmol/l}$ ) soient plus à risque face à la maladie coronarienne car dans certains cas, leurs VLDLs présenteraient des anomalies les rendant plus susceptibles d'être ingérées par les cellules macrophages. Ainsi, tout comme les LDLs modifiées,

les esters de cholestérol des VLDLs anormales seraient aussi impliquées dans la formation des plaques d'athérome au niveau des artères.

### **2.2.3. Le cholestérol et la variation interindividuelle: influence de l'hérédité et de l'environnement.**

Les concentrations de lipides dans le sang et dans les cellules sont contrôlées par des mécanismes homéostatiques impliquant la régulation de la synthèse et du catabolisme des lipoprotéines (Mahley et al. 1983). Ces mécanismes sont soumis à l'influence des facteurs génétiques et environnementaux tels que la diète, l'exercice, le stress et la consommation d'alcool. Parmi les facteurs environnementaux, la diète apparaît comme l'un des plus importants. En effet, des études ont montré qu'une diète riche en cholestérol et en gras saturés peut affecter considérablement les concentrations de lipides sanguins (Connor et al. 1986).

Les facteurs génétiques jouent également un rôle important dans la variabilité interindividuelle des concentrations de cholestérol. En effet, les résultats de plusieurs études recensées par Sing et al. (1988) révèlent qu'environ 50% à 60% des différences interindividuelles de cholestérol sanguin seraient attribuables à l'hérédité. Plusieurs gènes, incluant des gènes codant pour les apolipoprotéines, pour les récepteurs des lipoprotéines, pour les protéines de transfert, pour les enzymes impliqués dans la synthèse des lipoprotéines sont sans doute responsables de cet effet génétique. Parmi



ces gènes candidats ceux codant pour les apolipoprotéines ont été les plus étudiés.

Il existe différentes classes d'apolipoprotéines, les mieux connues sont les apos A (A-I, A-II, A-IV), les apos C (C-II, C-III), les apos B (B-48 et B-100) et l'Apo E. Leurs structures et leurs rôles dans le métabolisme des lipides ont fait l'objet de plusieurs études (Mahley et al. 1984). Les gènes des apos A-I, C-II, A-IV forment un groupe relié (cluster), localisé sur le chromosome 11. Les gènes des apos E, C-I et C-II sont situés sur le chromosome 19 et forment aussi un cluster. On retrouve le gène de l'apo B sur le chromosome 2 et celui de l'apo A-II sur le chromosome 1 (Fisher et al. 1989).

Grâce au développement de méthodes plus raffinées pour mesurer les variations dans les apolipoprotéines, on a constaté que les variations observées dans les concentrations de cholestérol sanguin étaient directement reliées aux lipoprotéines qui le transportent et surtout à la variation dans leur composition en apolipoprotéines. En utilisant la technique de focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide, Utermann fut le premier à constater qu'il y avait une variation phénotypique au niveau de l'apolipoprotéine E. Il montra qu'un phénotype particulier (E2/E2) était toujours associé à la dysbêtalipoprotéïnémie de Type III (Utermann 1977). Des études subséquentes montrèrent que cette expression phénotypique était le résultat d'un polymorphisme génétique sous le contrôle de 3 allèles situés à un même locus (Zannis et al. 1981; Utermann et al. 1982). En retrouvant différentes expressions phénotypiques du gène de l'Apo E dans la population, il devenait facile de l'utiliser comme mar-

queur génétique. Des études plus approfondies réalisées au sein de plusieurs populations ont montré que ce polymorphisme exerce une influence sur les concentrations de cholestérol et sur les concentrations des lipoprotéines (Davignon et al. 1988). Comme l'apolipoprotéine E joue un rôle primordial dans le métabolisme des lipides et que la variation génétique au sein de l'apo E influence les concentrations de cholestérol sanguin, cette variation génétique pourrait aussi être un facteur déterminant dans le risque de développer une MCV. (Davignon et al. 1988).

### **2.3. L'APOLIPOPROTÉINE E.**

#### **2.3.1. Caractéristiques:**

L'apolipoprotéine E est une glycoprotéine constituée de 299 acides aminés, enrichis en arginine et de poids moléculaire de 34,000 daltons. Elle a été identifiée pour la première fois en 1973 par Shore et al. (1973) comme un constituant des VLDLs (lipoprotéines de très basses densités). On la retrouve aussi sur les résidus de chylomicrons et de VLDLs appelés parfois  $\beta$ VLDLs ainsi que sur une sous-classe des HDLs (lipoprotéines de hautes densités) ( $HDL_c$ ). La concentration normale d'apo E dans le plasma est de 5 mg/dl ou de 0.13 mmol/l. (Mahley 1988). L'apolipoprotéine E joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. Elle assure la liaison des lipoprotéines qui la contiennent aux récepteurs de haute-affinité (récepteurs de l'Apo B/E) situés à la surface des cellules du foie et des autres tissus; elle permet ainsi l'internalisation de ces lipoprotéines et la libération de leur contenu en cholestérol à

l'intérieur de la cellule. Elle permet aussi la liaison des résidus de chylomicrons et de VLDL à des récepteurs plus spécifiques (récepteurs de l'Apo E) situés à la surface des cellules hépatiques afin d'éliminer ces résidus de la circulation plasmatique et les dégrader.

L'apolipoprotéine E présente du polymorphisme. Utermann et ses collègues furent les premiers à le démontrer. A l'IEF (électrophorèse selon un gradient de pH sur gel de polyacrylamide) l'apo E se présente sous 3 isoformes majeures et 3 isoformes mineures. Des études subséquentes ont montré que les formes mineures étaient en fait le résultat de la glycolysation des formes majeures (Zannis et al. 1981). A l'IEF, les 3 isoformes migrent sur le gel selon leur charge respective: l'apo E4 est la plus basique (+2), l'apo E3 a une charge intermédiaire (+1) et l'apo E2 est neutre. Ces 3 isoformes sont en fait l'expression d'un seul gène possédant trois allèles différents situés à un même locus qu'on a identifié comme étant les allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ . Les allèles de l'apo E se transmettent de façon codominante. Chaque individu possède 2 allèles de l'Apo E et les combinaisons possibles de ces allèles dans la population donnent 6 phénotypes différents; 3 homozygotes (E2/E2, E3/E3, E4/E4) et 3 hétérozygotes (E4/E2, E3/E2, E4/E3).

Le séquençage direct de l'apolipoprotéine E par Rall et al. (1982) a permis de découvrir les différences existant entre les 3 isoformes. La plus commune des 3 isoformes est l'apo E3. Elle possède au site 112, une cystéine et au site 158, une arginine. L'apo E4 diffère de l'apo E3 par la substitution au site 112 d'une cystéine par

une arginine (Cys<sub>117</sub>→Arg), ce qui lui confère une charge positive de plus que l'apo E3. L'apo E2 est différente de l'apo E3 en ce qu'elle possède au site 158 une cystéine au lieu d'une arginine (Arg<sub>158</sub>→Cys), ce qui lui enlève une charge positive. L'apo E3 et l'apo E2 ont aussi des groupes sulfhydryl libres (à cause de leurs cystéines) qui leur permettent de former des ponts disulfides avec d'autres groupes sulfhydryl appartenant à d'autres protéines; ceci peut altérer ou modifier leur fonction (Davignon et al. 1988). En plus de l'apo E2 et de l'apo E4, il existe aussi d'autres variants de l'apo E. Toutes les mutations de ces variants se situent dans la région des sites 140 à 160 de la molécule et dans tous les cas, des acides aminés basiques tels que l'arginine (Arg) et la lysine (Lys) sont remplacés par des acides aminés neutres (Mahley 1988). Les études sur la structure de l'apolipoprotéine E ont permis de déterminer que la molécule avait une région spécifique se liant à la surface de la lipoprotéine qui la transporte (région située entre les sites 225 à 299), et une autre région importante comprise entre les sites 140 et 160 qui permet la liaison de l'apo E aux récepteurs. La conformation moléculaire de cette région de la molécule est importante pour la liaison normale de la protéine aux récepteurs.

Le gène de l'apolipoprotéine E a été identifié. Il est situé sur le chromosome 19 et est en liaison étroite avec le gène d'une autre apolipoprotéine, l'apo C-I et le pseudogène de l'apo C-I. Le gène de l'apo E contient 3.7 kilobases. Il comprend 4 exons et 3 introns. Les séquences similaires d'exons et d'introns entre les différents gènes d'apolipoprotéines ainsi que les éléments répétitifs de séquence similaire laissent croire à une origine commune des diverses

apolipoprotéines. L'apolipoprotéine E est synthétisée dans la plupart des organes. D'importantes quantités d'ARN messager de l'apo E ont été détectés dans le foie, le cerveau, la rate, les poumons, les glandes surrénales, les ovaires, les reins et les muscles de plusieurs espèces animales. Le foie demeure toutefois l'organe le plus important dans la production d'apo E. Il synthétise les 3/4 de l'apo E circulant dans le plasma. Le rôle joué par l'apo E dans les différents autres organes n'est pas encore bien compris et différents laboratoires tentent de l'élucider.

Aux différences structurelles des 3 isoformes de l'apo E correspond aussi des différences fonctionnelles. Des études de liaison d'un complexe apo E/phospholipides à des récepteurs de LDL de cellules fibroblastiques et autres types de cellules ont montré que la capacité de l'apo E2 à se lier aux récepteurs des LDLs (B/E récepteurs) était grandement réduite comparé à celle de l'apo E3 (< 2% de celle de l'apo E3). L'apo E2 est associée à la dysbétalipémie de Type III. Chez les individus homozygotes pour l'apo E2 (E2/E2), le fait de posséder l'apo E2 au lieu de l'apo E3 pourrait avoir comme conséquence de réduire considérablement le catabolisme de certaines lipoprotéines et d'amener l'accumulation de celles-ci dans le plasma. Les résidus de chylomicrons et de VLDLs ainsi que les HDLs sont celles qui dépendent justement de l'apo E pour être reconnues par les récepteurs spécifiques des cellules hépatiques. En ce qui regarde l'apo E4, des études de liaison in vivo, avec marqueurs radio-actifs, ont montré que l'apo E4 avait une plus grande affinité pour les récepteurs de LDL (B/E récepteurs) que l'apo E3. Toutefois

des études correspondantes faites in vitro avec l'apo E4 et l'apo E3 n'ont pas révélé de différence de liaison entre les 2 isoformes.

On a observé des différences entre les apos E3 et E4 surtout au niveau de leur distribution sur les différentes lipoprotéines. En effet, Gregg et al. (1986) ont été les premiers à démontré qu'il y avait une différence marquée dans la redistribution des apos E3 et E4 au niveau des lipoprotéines. Les apos E4 se réassociaient davantage avec les VLDLs et beaucoup moins avec les HDLs que les apos E3. Par ailleurs, des études subséquentes ont montré que les apolipoprotéines se liaient aux lipoprotéines sous deux formes: soit sous forme libre ou sous forme d'un complexe E-AII (Steinmetz et al. 1989; Borghini et al. 1991). Chez les porteurs de l'apo E3, ces apolipoprotéines se retrouvent principalement liées aux VLDLs sous forme libre tandis que chez les HDLs, elles se retrouvent liées aux apos AII sous forme d'un complexe. Le fait de posséder une cystéine au site 112 favorise la formation de ces complexes E-AII, mais cela a pour effet aussi de diminuer considérablement l'habilité de ces apolipoprotéines à se lier aux récepteurs des LDLs. Au contraire de l'apo E3, l'apo E4 ne possédant pas de cystéine au site 112, il ne peut former de complexe E-AII. Les études de distribution des apos E4 ont montré que les VLDLs et les LDLs étaient riches en apo E4 de forme libre, et que les HDLs s'en trouvaient appauvris (Steinmetz et al. 1989). De plus chez ces HDLs, 58.7% des apos E4 étaient libres contrairement à 19% seulement dans le cas des apos E3 (Borghini et al. 1991). Ces résultats révèlent donc que les isoformes de l'apo E se distribuent différemment entre les lipoprotéines. La formation de complexes E-AII dans le cas des apos E3 et E2 contribue à la sta2

bilité des HDLs chez les porteurs de ces allèles. Dans le cas des porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$ , les HDLs possèdent à leur surface des apolipoprotéines E4 ne pouvant former de complexe E-AII; ces apolipoprotéines se retrouvent donc plus souvent sous forme libre, elles sont moins stables et en quantité moindre. Cela peut avoir comme conséquence un fonctionnement anormal de cet isoforme au niveau du métabolisme des lipides.

En plus des différences observées au niveau de la liaison et de la redistribution des apolipoprotéines, on a aussi remarqué des différences entre les isoformes au niveau de l'absorption du cholestérol de source exogène. Les recherches de Weintraub et al. (1987) sur les effets de l'apo E sur l'élimination des graisses provenant de source exogène ont montré que les porteurs des phénotypes E3/E2 avaient une quantité significativement plus grande de résidus de chylomicrons dans le plasma, indiquant par le fait une plus lente élimination de ces résidus. Au contraire, chez ceux possédant les phénotypes E4/E3 et E4/E4, l'élimination des résidus de chylomicrons étaient 2 fois plus rapide que chez les sujets E3/E2. Une autre étude faite sur l'absorption du cholestérol de source exogène en relation avec l'apo E vient aussi appuyer ces résultats. En effet, il a été démontré que chez des sujets hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle  $\epsilon 2$ , il y avait une moins grande absorption de cholestérol de source exogène et une plus grande synthèse de cholestérol au niveau du foie que chez ceux ayant les phénotypes E4/E3 et E4/E4 (Kesäniemi et al. 1987).

### 2.3.2. Fréquences des allèles de l'apo E dans les populations.

Plusieurs laboratoires de différents pays ont déterminé les fréquences des allèles de l'apo E dans leurs populations respectives et celles de d'autres populations présentant un certain intérêt. Parmi toutes ces études, Gerdes et al. (1992) en a répertorié 46, dont le nombre d'individus à l'étude dépassait 100, représentant différents groupes ethniques situés dans différentes régions géographiques du monde (Gerdes et al. 1992). Même si toutes ces études présentaient des différences quant au choix de l'échantillon, de la méthode d'échantillonnage et du nombre d'individus par échantillon, on peut faire à partir de ces études un certain nombre de généralisations.

Dans toutes les populations étudiées, les 3 allèles de l'apo E sont présentes, exception faite d'une population d'Amériindiens du Yucatan au Mexique où l'allèle  $\epsilon 2$  est absente (Gerdes et al. 1992). Dans toutes les populations étudiées, l'allèle  $\epsilon 3$  est la plus commune suivie de l'allèle  $\epsilon 4$ . Toutefois dans les populations d'origine chinoise la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  est plus élevée que celle de l'allèle  $\epsilon 4$  (Gerdes et al. 1992). Les différentes populations présentent beaucoup d'hétérogénéité entre elles quant à la fréquence relative des allèles de l'apo E. Il existe des différences statistiquement significatives entre les populations caucasiennes et asiatiques. En général, les fréquences relatives de l'allèle  $\epsilon 3$  dans les 11 populations asiatiques étudiées sont plus élevées que celles des populations caucasiennes (27 populations étudiées), tandis que les deux autres allèles ont des fréquences relatives plus basses (voir Tableau I).



**TABLEAU I:**

Comparaisons des fréquences relatives des allèles de l'apolipoprotéine E dans les différentes populations regroupées selon la race.

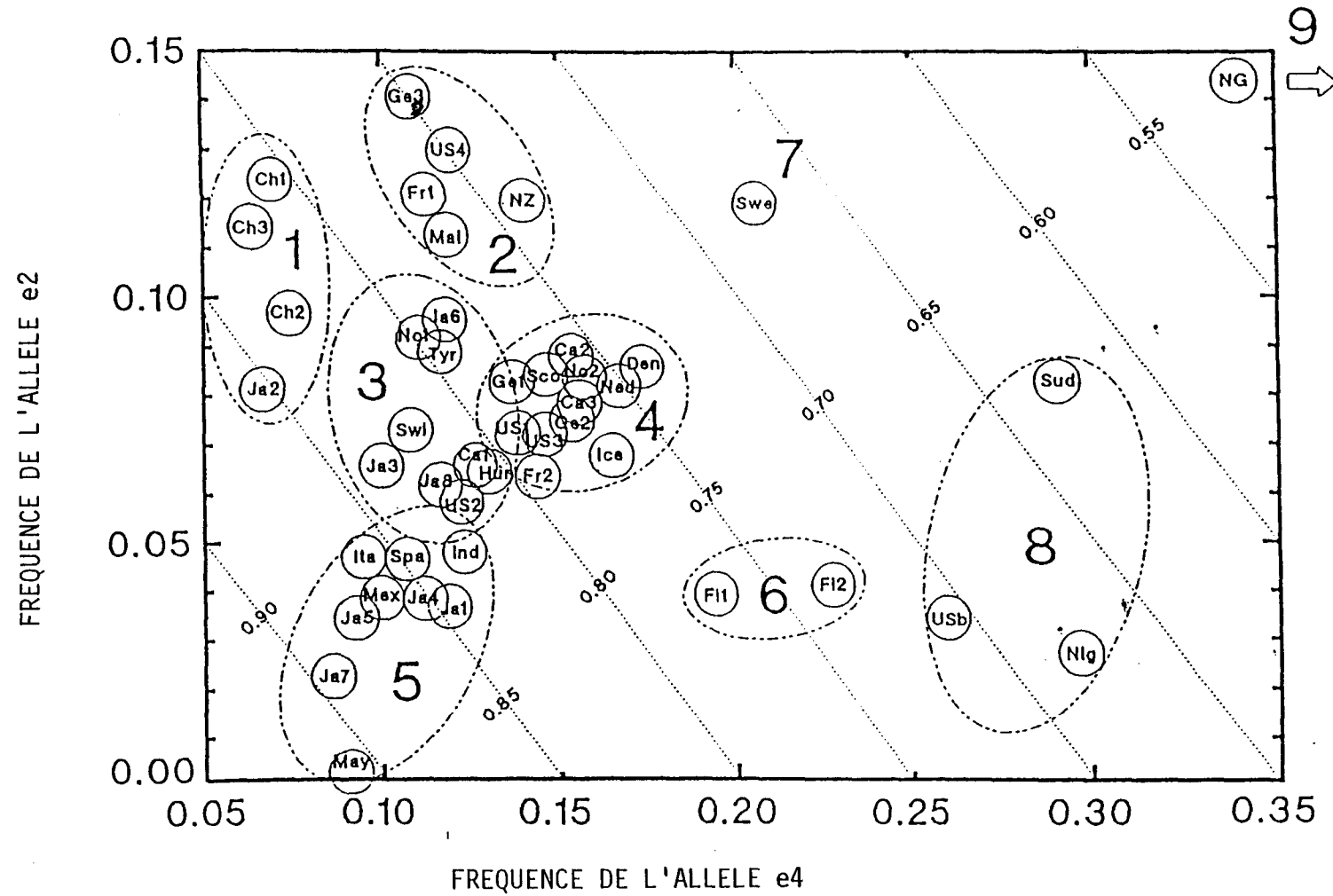
Groupes	Fréquences relatives des allèles de l'apo E		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Caucasiens	0.039 à 0.141	0.675 à 0.857	0.098 à 0.227
Asiatiques	0.037 à 0.124	0.822 à 0.872	0.067 à 0.124
Chinois	0.097 à 0.124	0.806 à 0.822	0.064 à 0.070
Japonais	0.037 à 0.124	0.787 à 0.891	0.067 à 0.120
Caucasiens du Sud	0.043 à 0.120	0.792 à 0.857	0.098 à 0.137
Autres Caucasiens	0.059 à 0.141	0.675 à 0.819	0.109 à 0.227

Parmi les populations asiatiques, les Chinois et les Japonais présentent aussi des différences entre eux. Les Chinois ont généralement une fréquence relative de l'allèle  $\epsilon 2$  (3 populations étudiées) plus élevée que celle des Japonais (8 populations étudiées), tandis que les fréquences relatives de l'allèle  $\epsilon 4$  sont généralement plus basses chez les Chinois comparés aux Japonais (voir Tableau I). Il existe aussi des dissimilitudes dans les fréquences relatives des allèles de l'apo E parmi les populations caucasiennes. Sur sept populations caucasiennes étudiées, Davignon et al. (1988) avaient déjà noté que les Finlandais présentaient des fréquences alléliques significativement différentes des autres Caucasiens. Depuis, plusieurs autres études faites sur diverses populations caucasiennes, et répertoriées par Gerdes et al. (1992), ont montré que les Caucasiens du Sud de l'Europe (7 populations) avaient des fréquences alléliques de l'apo E différentes de celles des Caucasiens du Nord de l'Europe, d'Amérique du Nord et de Nouvelle Zélande (20 populations) (voir Tableau I). En fait, les Caucasiens du Sud de l'Europe présentent des fréquences de l'allèle  $\epsilon 3$  plus élevées que les autres Caucasiens, ressemblant davantage à celles des populations japonaises, tandis que les autres Caucasiens ont des fréquences relatives de l'allèle  $\epsilon 3$  plus basses et des fréquences relatives de l'allèle  $\epsilon 4$  de 1.5 à 2 fois plus élevées que celles des Caucasiens du sud de l'Europe.

Gerdes et al. (1992) ont aussi ajouté dans leur tableau des études faites sur les Noirs, les Mexicains, les Indiens, les Malaysians, les habitants de Nouvelle-Guinée et les Amérindiens du Yucatan. Les Noirs, les Amérindiens et les habitants de la Nouvelle-Guinée présentent des fréquences alléliques de l'apo E très particulières et

FIGURE 1:

FREQUENCES DES ALLELES DE L'APOLIPOPROTEINE E DANS 46 POPULATIONS.



significativement différentes des autres populations. Un graphique ayant pour échelle les fréquences de l'allèle  $\epsilon 4$  à l'abscisse et les fréquences de l'allèle  $\epsilon 2$  à l'ordonnée, représente la position de chaque population selon sa fréquence allélique respective. Les populations ayant des fréquences alléliques comparables ont été regroupées en 9 groupes de populations (clusters) ayant entre eux une distance euclidienne d'environ 0.030 comme limite. Le Canada se retrouve avec les populations de Norvège, de Hollande, d'Islande, d'Ecosse, d'Allemagne (Nord de l'Europe) de la France et des Etats-Unis. (voir Figure 1)

La plupart des études sur les fréquences relatives des allèles de l'apo E ont été faites sans considérer le genre de l'individu. Toutefois quelques études ont calculé les fréquences alléliques de l'apo E en séparant les hommes et les femmes. Dans ces cas, les fréquences alléliques chez les femmes n'étaient pas significativement différentes de celles des hommes (Davignon et al. 1988; Xhignesse et al. 1991; Xu et al. 1991).

### **2.3.3. Impact du polymorphisme de l'apolipoprotéine E sur les lipides, les lipoprotéines et les apolipoprotéines.**

Utermann fut le premier à observer une association entre le phénotype de l'apo E et les concentrations moyennes de lipides et de lipoprotéines dans la population. Il remarqua que les individus portant l'allèle  $\epsilon 2$  avaient un niveau moyen de cholestérol total et de LDL-C plus bas que ceux étant homozygotes pour l'allèle  $\epsilon 3$  (Utermann et al. 1979). Des études subséquentes faites par Bouthillier et al.

(1983) montrèrent que les individus normolipidémiques présentant l'allèle  $\epsilon 4$  avaient une concentration moyenne de cholestérol et de LDL-C plus élevée que ceux ayant le phénotype E3/E3. Plusieurs autres études faites dans différents pays permirent de confirmer et d'étendre ces observations à plusieurs autres populations (Davignon et al. 1988 pour une revue; Sepehrnia et al. 1989; Eichner et al. 1990; Hallmann et al. 1991; Kaprio et al. 1991; Hanis et al. 1991; Xu et al. 1991; Xhignesse et al. 1991; Dallongeville et al. 1992).

Généralement, les individus présentant le génotype  $\epsilon 2/\epsilon 2$  ont des niveaux moyens de cholestérol total et de LDL-C plus bas que tous les autres génotypes, et ceux présentant le génotype  $\epsilon 4/\epsilon 4$  ont les plus élevés. Sans égard à la moyenne générale de l'échantillon, les moyennes des génotypes se classent dans le sens suivant:  $\epsilon 2/\epsilon 2 < \epsilon 3/\epsilon 2 < \epsilon 3/\epsilon 3 < \epsilon 4/\epsilon 2 < \epsilon 4/\epsilon 3 < \epsilon 4/\epsilon 4$  et ce, dans toutes les populations. De plus, elles sont significativement différentes entre elles. Cela signifie que l'impact exercé par le génotype de l'apo E sur le niveau de cholestérol d'un individu est indépendant de la moyenne générale de la population. Cela suggère aussi que les différences ethniques ou écologiques entre les populations ont peu d'influence sur le rôle joué par l'apo E dans la détermination du cholestérol sanguin chez un individu (Hallman et al. 1991).

Le polymorphisme de l'apo E exerce aussi un effet sur les concentrations d'apolipoprotéines, surtout sur les concentrations d'apo E et d'apo B (Boerwinkle et Utermann 1988; Kaprio et al. 1991; Eichner et al. 1990; Hanis et al. 1991; Xhignesse et al. 1991; Xu et al. 1991). Les porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  ont des concentrations moyennes

d'apo E plus élevées que ceux portant l'allèle  $\epsilon 4$  tandis que dans le cas de l'apo B, l'influence de l'apo E a un effet contraire, mais moins prononcé. Cet effet s'exerce simultanément sur les concentrations d'apo E, d'apo B et de cholestérol. Dans une étude, on a également observé un effet significatif de l'apo E sur les concentrations d'apo CII, d'apo AI et AII (Kaprio et al. 1991). Par contre cette étude est contredite par deux autres études dans lesquelles on observe aucun effet significatif de l'apo E sur ces apolipoprotéines (Hanis et al. 1991; Eichner et al. 1990).

Les effets du polymorphisme de l'apo E sur les concentrations des lipides, des lipoprotéines et des apolipoprotéines ont également été mesurés séparément chez les hommes et chez les femmes (Xhignesse et al. 1991; Hanis et al. 1991). Dans une étude portant sur un échantillon de personnes en bonne santé, Xhignesse et al. (1991) ont montré que l'allèle  $\epsilon 2$  exerçait une plus grande influence sur les concentrations de lipides et de lipoprotéines chez les femmes que chez les hommes, tandis que l'allèle  $\epsilon 4$  était associé à des concentrations significativement plus élevées de cholestérol, d'apo B, de LDL-C et de LDL apo B seulement chez les femmes. Ces différences entre les hommes et les femmes étaient en partie attribuable à l'utilisation de contraceptifs oraux ou à l'usage d'une thérapie hormonale de remplacement chez les femmes.

L'influence du polymorphisme de l'apo E a également été comparé entre des hommes, des femmes préménopausées et des femmes ménopausées (Eichner et al. 1990; Hanis et al. 1991). Hanis et al. (1991) ont observé que l'effet de l'apo E sur les variables lipidiques était

plus modéré chez les femmes que chez les hommes, sauf dans le cas des concentrations plasmatiques d'apo E. Les concentrations plasmatiques d'apo E chez les femmes préménopausées portant l'allèle  $\epsilon 2$  étaient beaucoup plus élevées que la moyenne du groupe tandis que les concentrations d'apo E chez les femmes préménopausées portant l'allèle  $\epsilon 4$  étaient plus basses. Le fait que l'allèle  $\epsilon 2$  affecte les concentrations plasmatiques d'apo E est probablement due à la capacité moindre de l'apo E2 d'effectuer la liaison aux récepteurs, ce qui amène par le fait même une accumulation des lipoprotéines qui les contiennent et une augmentation des concentrations d'apo E. Mais pourquoi ces différences seraient plus accentuées chez les femmes préménopausées alors qu'elles le sont moins chez les femmes ménopausées et chez les hommes? Hanis et al. (1991) suggère comme hypothèse qu'il peut y avoir une interaction entre le gène de l'apo E et ceux amenant un état physiologique différent chez la femme préménopausée, principalement due à la sécrétion d'hormones. En effet, le changement observé dans les concentrations plasmatiques des lipoprotéines au cours de l'adolescence serait relié à la production d'hormones sexuelles (Srivinasan et al. 1985). En effet, il apparaît de plus en plus évident que les hormones sont impliquées dans la régulation de la production des apolipoprotéines et dans la régulation des récepteurs. De plus, il a été observé que l'administration d'estrogènes a pour effet d'augmenter les concentrations de différentes lipoprotéines chez les femmes préménopausées (Schaefer et al. 1983).

Toutefois, Eichner et al. (1990) ont rapporté que l'influence de l'apo E sur les concentrations de lipides et de lipoprotéines n'était pas modifié par la survenue de la ménopause, quoique durant ce

processus on observait une élévation des concentrations moyennes de lipides et de lipoprotéines. Ils attribuaient ce changement simplement à l'effet de l'âge. Dans leur cas, ces résultats suggéreraient une absence d'interaction entre le gène de l'apo E et le statut hormonal chez les femmes.

L'influence du polymorphisme de l'apo E a aussi été étudié chez des jeunes âgés de 3 à 18 ans par Lehtimäki et al. (1990) et chez des jeunes de 8 à 11 ans par Xu et al. (1991). Tout comme chez les adultes, l'influence du polymorphisme de l'apo E s'est avérée différente entre les garçons et les filles. En effet, on observait un effet de l'apo E chez les jeunes similaire à celui observé chez les adultes, mais cet effet apparaissait plus clairement chez les garçons. Xu et al. (1991) expliquait ces différences par à une interaction entre la variation génétique et certains facteurs environnementaux dans la régulation du métabolisme des lipides.

En dépit de l'influence du polymorphisme de l'apo E sur les niveaux moyens de cholestérol et de LDL-C, la plupart des études, n'ont pas observé d'associations entre les phénotypes de l'apo E et les niveaux moyens de HDL-C et de triglycérides (Davignon et al. 1988; Eichner et al. 1990; Xhignesse et al. 1991; Hanis et al. 1991) à l'exception d'une étude où les concentrations moyennes de triglycérides chez les femmes présentaient des différences significatives entre les phénotypes de l'apo E (Kaprio et al. 1991). Toutefois, dans une méta-analyse des résultats de plusieurs études sur des populations provenant de 17 pays différents, Dallongeville et al. (1992) ont montré que les concentrations de HDL-C étaient signifi-



tivement plus basses chez les individus présentant le phénotype E4/E3 que chez ceux ayant le phénotype E3/E3, et ce, dans 17 des 28 études retenues. De plus, dans cette même analyse, les auteurs ont observé une association entre le polymorphisme de l'apo E et les niveaux moyens de triglycérides. En effet, les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  et ceux ayant le phénotype E4/E3 avaient des concentrations moyennes de triglycérides significativement plus élevées que les sujets portant le phénotype E3/E3. Une mauvaise élimination des résidus de chylomicrons et de VLDLs chez les individus porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  ainsi qu'une altération du processus de lipolyse des VLDLs (Ehnholm et al. 1984; Gregg et al. 1986) chez les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  pourrait expliquer cette augmentation des triglycérides dans le plasma.

L'impact exercé par l'apo E sur les lipides et les lipoprotéines peut être mesuré en calculant l'effet moyen des allèles. L'effet moyen d'un allèle pour un trait donné se définit comme étant l'écart observé entre la moyenne du groupe porteur de cet allèle et la moyenne de la population (Templeton et al. 1987). Le calcul de l'effet moyen permet de déterminer si un allèle a pour effet de diminuer ou d'augmenter les concentrations du trait étudié. L'effet moyen des allèles de l'apo E sur les lipides et les lipoprotéines a été mesuré dans diverses populations. Dans chaque population étudiée, l'allèle  $\epsilon 2$  avait pour effet d'abaisser les moyennes de cholestérol et de LDL-C, tandis que l'allèle  $\epsilon 4$  avait pour effet de les augmenter. On a remarqué aussi que l'effet de l'allèle  $\epsilon 2$  était de 2 à 3 fois plus grand que celui de l'allèle  $\epsilon 4$ . Par contre, dans la plupart des études, aucun effet significatif des allèles  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$  n'a été obser-

vé sur les niveaux des HDL-C et des triglycérides, sauf dans l'étude de Kaprio et al. (1991) qui mentionne que les allèles  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$  ont pour effet d'augmenter les triglycérides et d'abaisser les concentrations des HDLs.

On peut aussi mesurer l'effet des allèles de l'apo E en faisant le calcul de l'excès moyen. L'excès moyen est une variante du calcul de l'effet moyen qui ne tient pas compte de la fréquence des allèles. On l'utilise lorsque les génotypes ne sont pas tous représentés (Templeton et al. 1987). Deux études ont utilisé le calcul de l'excès moyen au lieu de l'effet moyen pour mesurer les effets de l'apo E. (Xhignesse et al. 1991; Xu et al. 1991). Tout comme dans le calcul de l'effet moyen, le calcul de l'excès moyen montra que l'allèle  $\epsilon 2$  avait pour effet de diminuer les concentrations moyennes de cholestérol total et de LDL-C chez les deux sexes mais que son effet était plus prononcé chez les femmes (Xhignesse et al. 1991). Quant à l'allèle  $\epsilon 4$ , il avait pour effet d'augmenter les niveaux moyens de cholestérol et de LDL-C mais cet effet n'était significatif que chez les femmes, suggérant ainsi que l'impact du gène de l'apo E sur les lipides pouvait être influencé par des facteurs qui demeurent pour l'instant indéterminés (Xhignesse et al. 1991). Dans l'étude de Xu et al. (1991) faite sur un groupe de garçons et de filles âgés de 8 à 11 ans, les effets de l'apo E sur le cholestérol, les LDL-C, et l'apo B étaient significatifs chez les garçons, mais pas chez les filles. Par contre, dans le cas des concentrations d'apo E chez les HDLs, l'effet exercé par le polymorphisme de l'apo E était significatif autant chez les filles que chez les garçons.

Il a été estimé que le polymorphisme de l'apo E était responsable d'environ 20%, 12% et 4% de la variation interindividuelle observée dans les concentrations plasmatiques d'apo E, d'apo B et de cholestérol, respectivement (Boerwinkle et Utermann 1988). L'effet plus grand exercé par les allèles de l'apo E sur les concentrations d'apo E et l'effet inverse et moindre exercé sur les concentrations d'apo B et de cholestérol, renforcent l'hypothèse que le gène de l'apo E influence les concentrations des lipoprotéines ayant à leurs surfaces des apos E, lesquelles influencent de façon contraire les concentrations d'apo B et de cholestérol (Boerwinkle et Utermann 1988). Connaissant le rôle de l'apo E dans le métabolisme des lipides ainsi que l'effet exercé par les différents allèles de l'apo E sur les concentrations des lipides, des lipoprotéines et des apolipoprotéines, Boerwinkle et Utermann (1988) ont proposé un modèle qui explique comment le polymorphisme de l'apo E affecte les concentrations plasmatiques de LDL ainsi que les concentrations de cholestérol et d'apo E chez les individus porteur des allèles  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$ .

La contribution du gène de l'Apo E dans la variation interindividuelle de cholestérol sanguin et de LDL-C a déjà été estimée (Sing et Davignon 1985) Elle est d'environ 7% pour le cholestérol et de 8.3% pour les LDL-C; par contre cette contribution n'est que de 1% dans le cas des triglycérides. Sachant que 50% de la variation interindividuelle dans le cholestérol est attribuable à des facteurs génétiques, l'Apo E serait donc responsable d'environ 14% de la variance polygénique du cholestérol sanguin. La variation génétique observée au niveau d'un seul gène, l'apo E, apporterait donc une contribution importante dans la détermination des différences individuelles au

niveau de cholestérol sanguin dans une population normale. Même si les effets de ses allèles sont modérés, en raison de leurs fréquences relativement élevées dans la population, elles contribuent largement à la variation interindividuelle dans les concentrations de lipides et de lipoprotéines. L'impact relatif d'un allèle sur la concentration d'une variable est le produit de l'effet moyen par la fréquence de cet allèle. Dans le cas de l'apo E, l'effet de l'allèle  $\epsilon 2$  sur la concentration du cholestérol est 2 fois plus grand que celui exercé par l'allèle  $\epsilon 4$ , mais comme la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  dans la population est environ la moitié moindre que celle de l'allèle  $\epsilon 4$ , l'impact exercé par les 2 allèles sur la variabilité du cholestérol dans la population est donc comparable.

#### **2.3.4. Polymorphisme de l'apo E et hyperlipidémies.**

Les effets du polymorphisme de l'apo E sur les concentrations des lipides et des lipoprotéines dans les populations normolipidémiques ont été décrits à la section précédente. Cette nouvelle section examine maintenant l'impact exercé par le polymorphisme de l'apo E chez les groupes hyperlipidémiques. Utermann fut le premier à constater qu'un phénotype particulier de l'apo E ( $E2/E2$ ) était toujours associé à la dysbétalipoprotéïnémie de type III (Utermann et al. 1977). Il existe 6 types d'hyperlipidémies cliniquement différentes et classées selon le type de lipoprotéine en excès dans le plasma (Stein 1987). Elles comprennent les types I, IIa, IIb, III, IV et V. La détermination des fréquences des allèles de l'apo E chez 5 groupes de personnes ayant des hyperlipidémies différentes ont révélé que dans les cas d'hyperlipidémies de type IIb, de type III,

de type IV et de type V, les fréquences des allèles de l'apo E étaient significativement différentes de celles des contrôles normolipidémiques (Sing et Davignon 1983; Utermann et al. 1984). On a remarqué un enrichissement de la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  dans les cas d'hypertriglycéridémie et une fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 4$  dans les cas d'hypercholestérolémie. L'hyperlipoprotéïnémie de type III était la plus exceptionnelle, avec des fréquences relatives des allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  de 0.875, 0.125 et .000 respectivement.

L'hyperlipoprotéïnémie de type III est caractérisée par une accumulation des résidus de chylomicrons et de VLDL dans le plasma ( $\beta$ VLDL). Le plus souvent, l'hyperlipidémie de type III est associée au phénotype E2/E2, mais seulement 5% des personnes ayant le phénotype E2/E2 développent l'hyperlipoprotéïnémie de type III. Les autres personnes ont également une accumulation des résidus de chylomicrons et de VLDLs ainsi qu'une diminution de la concentration des LDLs dans leur plasma, mais la maladie se manifeste cliniquement seulement si elle est associée à un autre désordre métabolique. Toutefois les porteurs des phénotypes E2/E2 ou E3/E2 sont plus susceptibles de développer la maladie que ceux ayant les autres phénotypes (Davignon et al. 1988).

Dans l'hypertriglycéridémie de type IV, la fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 2$  est attribuable à une prévalence plus grande des types E2/E2, E3/E2 et E4/E2. Dans l'hyperlipidémie mixte (Type IIb) où il y a à la fois élévation du cholestérol et de triglycérides, les phénotypes considérés comme rares dans la population i.e., E4/E4, E4/E2, E2/E2 ainsi que le phénotype E3/E2 sont surreprésentés au

détriment du phénotype E3/E3. En effet, 18.5% des patients ont un des phénotypes rares contre seulement 5.3% chez les normolipidémiques (Utermann et al. 1984). L'hypercholestérolémie pour sa part est associée à une fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 4$  (Utermann et al. 1984; Yagani et al. 1990) tandis que l'hyperlipidémie de type V (élévation des VLDLs) est associée à une prévalence plus grande (33.3%) du phénotype E4/E4 (Ghiselli et al. 1982; Davignon et al. 1988). Il apparaît donc que les allèles  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$  du gène de l'apo E sont étroitement liés à l'expression de diverses formes d'hyperlipidémies. Dans les cas d'hypertriglycéridémies et d'hyperlipidémies mixtes il y aurait une plus grande prévalence de l'allèle  $\epsilon 2$ , tandis que dans les cas d'hypercholestérolémie et d'hyperlipidémie de type V, il y aurait une plus grande prévalence de l'allèle  $\epsilon 4$ .

Les effets des phénotypes de l'apo E sur les concentrations des lipides et des lipoprotéines sont les mêmes chez les hyperlipidémiques que chez les normolipémiques: l'allèle  $\epsilon 2$  a pour effet d'abaisser les concentrations de LDL-C chez les hyperlipidémiques et cet effet est indépendant des récepteurs des LDLs ainsi que du type d'hyperlipidémie. De plus, les concentrations des VLDLs sont influencées par le phénotype de l'apo E seulement chez les hypertriglycéridémiques, l'apo E2 étant clairement associé à des concentrations de triglycérides et de VLDL-C plus élevées (Dallongeville et al. 1991). Cela suggère que l'apo E2 peut altérer le métabolisme des VLDLs seulement en présence d'une surproduction de VLDLs ou quand leur catabolisme est défectueux. La mauvaise liaison de l'apo E2 aux récepteurs B/E des cellules hépatiques a pour effet de modifier les concentrations de chylomicrons, de VLDLs et autres lipoprotéines dans le plasma,

ce qui peut expliquer l'influence de l'apo E2 dans le cas des hyperlipidémies; cependant puisqu'il n'y a pas de différence dans la liaison des apos E3 et des apos E4 aux B/E récepteurs, l'association de l'allèle  $\epsilon 4$  avec l'hypercholestérolémie est plus difficile à expliquer. Quelques hypothèses ont été proposées, mais le mécanisme d'action n'est pas encore bien élucidé. (Utermann et al. 1984).

### **2.3.5. Apolipoprotéine E et maladies coronariennes.**

En raison de son influence dans la variation interindividuelle observée au sein des lipides et des lipoprotéines ainsi que dans l'expression de diverses formes d'hyperlipidémies, le gène de l'apo E est considéré comme un gène candidat important dans le risque de développement de l'athérosclérose et des maladies coronariennes. Puisque l'allèle  $\epsilon 4$  est associé à une élévation des niveaux moyens de LDL-C et que l'allèle  $\epsilon 2$  est plutôt associé à une baisse des niveaux du LDL-C, l'hypothèse proposée est que l'allèle  $\epsilon 2$  devrait offrir une protection accrue contre le développement de l'athérosclérose, tandis que l'allèle  $\epsilon 4$  devrait plutôt favoriser son développement; selon cette hypothèse on devrait donc s'attendre à retrouver une fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 4$  chez les patients atteints de maladies coronariennes que chez des sujets contrôles. Cependant, les premières études d'association entre les phénotypes de l'apo E et les maladies coronariennes n'ont pas montré de relation directe entre le gène de l'apo E, les concentrations de lipides et le risque de maladies coronariennes. En effet, les premières études ayant comparé les fréquences des allèles de l'apo E chez des survivants d'in-

farctus du myocarde et chez des contrôles n'ont pas donné les résultats attendus.

Dans une première étude, la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  s'est révélée être plus basse que celle des contrôles respectifs (0.121 vs 0.150) (Utermann et al. 1984). Dans une autre étude, on a constaté que le phénotype E4/E3 était plus souvent présent parmi les survivants d'infarctus du myocarde, alors que le phénotype E3/E2 l'était moins (Cumming et Robertson 1984). Lenzen et al. (1986) ont aussi mesuré les fréquences des phénotypes de l'apo E sur des patients qui avaient survécu à un infarctus du myocarde mais dont la maladie du coeur avait été confirmée par angiographie. Ils n'ont pas trouvé de différences significatives dans les fréquences des différents phénotypes de l'apo E entre les patients et les contrôles, mais ils ont noté une plus grande prévalence de certains isoformes de l'apo E en fonction de l'âge: 60% des personnes ayant le phénotype E4/E3 avaient expérimenté un infarctus du myocarde avant l'âge de 50 ans contre 23.7% chez le groupe E3/E2 (Lenzen et al. 1986). Cela suggérerait que les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  pourraient être plus à risque d'avoir un accident coronarien et ce, à un plus jeune âge.

Pour ce qui est de la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  ou de la prévalence des phénotypes E2/E2 et E3/E2, dans la plupart des études on n'a pas trouvé de différence significative entre les patients et les contrôles (Menzel et al. 1983; Utermann et al. 1984; Lenzen et al. 1986) sauf dans l'étude de Cumming et Robertson. Toutefois, dans l'étude d'Utermann et al. (1984) les patients présentant le phénotype E2/E2 souffraient tous d'hyperlipidémie de type III (5/5) mais aucun des



21 contrôles ayant le phénotype E2/E2 ne présentait de signes d'hyperlipidémies (Utermann et al. 1984). On pourrait croire dans ce cas que l'allèle  $\epsilon_2$ , en absence d'hyperlipidémie, exercerait un effet protecteur.

Une autre série d'études, faite sur des patients n'ayant pas subi d'infarctus du myocarde mais dont la maladie du coeur avait été confirmée par angiographie (CAD+), n'ont également pas permis de mettre en évidence une relation directe entre les fréquences de l'apo E et la maladie coronarienne. Dans ces études, il y avait 3 groupes: un groupe comprenant les patients (CAD+) déterminés par angiographie, un groupe de sujets contrôles issus de la population en général et un troisième groupe contrôle dont les sujets présentaient un examen angiographique négatif (CAD-). En général, les fréquences alléliques de l'apo E n'étaient pas significativement différentes entre les patients et les contrôles (Menzel et al. 1983; Brennikmeijer et al. 1984; Stuyt et al. 1991). Cependant, dans l'étude de Menzel et al. (1983) le groupe CAD- confirmé par angiographie présentait une fréquence plus élevée du phénotype E3/E2 (15.7%) par rapport au groupe contrôle issu de la population en général (11%) et au groupe CAD+ (11.5%). Dans l'étude de Brennikmeijer et al. (1984), 60% des patients faisaient de l'hyperlipidémie contre 30% seulement chez les contrôles.

Deux études récentes faites en Finlande ont cependant donné des résultats très différents. Elles ont confirmé l'hypothèse préalablement énoncée par les finlandais à savoir qu'il existe une relation entre la fréquence de l'allèle  $\epsilon_4$  dans la population et une plus

grande susceptibilité à développer la maladie coronarienne, du moins dans cette population (Lehtimäki et al. 1990). La population finlandaise se démarque des autres populations en ayant la plus grande incidence d'infarctus du myocarde dans le monde. Elle se classe également parmi les populations ayant les concentrations les plus élevées de cholestérol sanguin. Les fréquences relatives des allèles  $\epsilon 2$  et  $\epsilon 4$  sont très différentes des autres caucasiens, elles ont été estimées à 0.041 et 0.227 respectivement (Ehnholm et al. 1986). La première étude révèle donc que la fréquence relative de l'allèle  $\epsilon 4$  (0.394) chez un groupe de patients (91) est 1.4 fois plus élevée que celle de la population normale (Kuusi et al. 1989) et deux fois plus élevée que celle des autres caucasiens. Par contre, la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  est basse chez les patients et ne diffère pas de celle de la population en général. La seconde étude montre que la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  chez le groupe CAD+ (145) est de 0.293 tandis que celle du groupe CAD- n'est que de 0.174 (Nieminen et al. 1992). La fréquence élevée de l'allèle  $\epsilon 4$  dans cette population pourrait donc être un des facteurs contribuant à augmenter la susceptibilité à développer la maladie coronarienne.

Une étude semblable faite récemment chez les australiens vient aussi confirmer ces résultats. Le calcul des fréquences des différents allèles de l'apo E chez les patients CAD+ âgés de 40 à 50 ans a révélé que la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  était plus élevée chez les patients que chez les contrôles (0.258 vs 0.128). Par conséquent, les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  seraient plus à risque de développer une maladie coronarienne, spécialement les homozygotes pour cet allèle (Van Bockxmeer et Mamotte 1992)

Dans presque toutes les études pré-citées, on a aussi mesuré les concentrations moyennes de lipides, de lipoprotéines et d'apolipoprotéines chez les CAD+, les contrôles et quelquefois les CAD-. Les niveaux moyens de cholestérol, de triglycérides et de LDL-C étaient plus élevés chez le groupe CAD+ que chez les deux autres groupes (Menzel et al. 1983; Lenzen et al. 1986; Stuyt et al. 1991; Nieminen et al. 1992). Toutefois dans l'étude de Nieminen et al. (1992) les niveaux moyens de cholestérol, de LDL-C et de triglycérides étaient similaires entre les CAD+ et les CAD-, mais ils étaient significativement plus élevés que ceux des contrôles. Quant à la concentration moyenne de HDL-C, elle était significativement plus basse chez les CAD+ que chez les CAD- (Stuyt et al. 1991; Nieminen et al. 1992). Dans certaines de ces études, on aussi mesuré les concentrations de VLDL-C, de VLDL-TG, d'apo B, d'apo A et de Lp(a). Les valeurs moyennes de VLDL-C, VLDL-TG et d'apo B étaient plus élevées chez le groupe CAD+, tandis que les concentrations d'apo A-I et d'apo A-II étaient plus basses (Stuyt et al. 1991; Nieminen et al. 1992). Toutefois, les concentrations de Lp(a) étaient similaires entre les trois groupes (Nieminen et al. 1992). Une seule étude présentait les concentrations moyennes d'apo E (Stuyt et al. 1991); elles étaient significativement plus élevées chez les CAD+ en comparaison des contrôles.

Dans la plupart de ces études, l'effet exercé par l'apo E sur les lipides, les lipoprotéines et les apolipoprotéines a été examiné entre les différents phénotypes aussi bien chez les CAD+ que chez les contrôles. Même si les groupes CAD+ ont des valeurs moyennes de lipides beaucoup plus élevées que celles des contrôles, l'analyse

de la variance a montré que l'effet exercé par l'apo E sur les lipides chez les CAD+ est semblable à celui exercé dans la population normale. Il est apparent surtout sur les niveaux moyens de cholestérol et de LDL-C. En effet, la plupart des études ont rapporté que les porteurs des phénotypes E3/E2 avaient des niveaux moyens de cholestérol et de LDL-C significativement plus bas que les autres phénotypes tandis que les niveaux moyens de cholestérol et de LDL-C étaient plus élevés chez les porteurs des phénotypes E4/E3 et E4/E4 (Menzel et al. 1983; Lenzen et al. 1986; Nieminen et al. 1992). Toutefois, dans une étude faite par Kuusi et al. (1989) le polymorphisme de l'apo E n'exerçait aucun effet sur le cholestérol et les LDL-C chez les CAD+. Les auteurs ont seulement remarqué une certaine variation dans la concentration moyenne de l'apo B entre les phénotypes, mais cette variation n'atteignait pas le seuil de signification. Pour ce qui est des triglycérides, Menzel et al. (1983) ont observé que les patients (CAD+) ayant l'allèle  $\epsilon 2$  présentaient des concentrations moyennes de triglycérides significativement plus élevées que ceux ne possédant pas cet allèle, tandis que dans d'autres études les différences dans les concentrations moyennes de triglycérides entre les phénotypes de l'apo E n'étaient pas significatives autant chez les CAD+ que chez les contrôles (Lenzen et al. 1986; Kuusi et al. 1989). Quant aux HDLs, dans les études où celles-ci ont été mesurées, il n'y avait pas de différence significative entre les différents phénotypes de l'apo E (Menzel et al. 1983; Lenzen et al. 1986; Kuusi et al. 1989). Fait à noter, dans toutes les études précitées, aucune n'avait fait d'ajustement pour des variables concomitantes.

L'effet de l'apo E a aussi été mesuré dans l'étude de Stuyt et al. (1991) par l'analyse de covariance entre le statut cardiovasculaire et les phénotypes de l'apo E, l'âge, le sexe, les habitudes de fumer, le BMI comme covariables. Leur analyse a montré qu'il n'y avait pas d'interaction entre le statut cardio-vasculaire et les phénotypes de l'apo E, ce qui signifie que les différences dans les concentrations de lipides, de lipoprotéines et d'apolipoprotéines entre les phénotypes de l'apo E n'étaient pas significatives aussi bien chez les contrôles que chez les patients (CAD+). En tenant compte de certains facteurs de risque connus ainsi que des différents phénotypes de l'apo E, la combinaison des valeurs de LDL-C, d'apo A-I et de VLDL-C se révélait être le meilleur modèle pour prédire le développement de la maladie coronarienne. Suite à ces résultats, les auteurs ont conclu que le phénotype de l'apo E n'était pas un facteur indépendant de la maladie coronarienne, mais que l'influence du polymorphisme de l'apo E sur le risque de maladie coronarienne se faisait indirectement via son effet sur les lipides et les lipoprotéines.

Cependant, une autre étude de Nieminen et al. (1992), a donné des résultats tout à fait à l'opposé de ceux obtenus par Stuyt et al. En utilisant l'analyse discriminante comme outil statistique, les auteurs ont évalué indépendamment chacun des facteurs de risque quant à son pouvoir de discriminer entre la maladie coronarienne (CAD+) et l'absence de maladie (CAD-). Ils ont ainsi démontré que chez les hommes, les concentrations de HDL, d'apo B et les phénotypes de l'apo E demeuraient indépendamment et significativement associés à la maladie coronarienne. Ils ont conclu que la variation

allélique du gène de l'apo E contribuait à augmenter le risque de CAD, indépendamment de son effet sur les concentrations d'apo B et de LDL-C. Chez les femmes par contre, seulement les triglycérides étaient associés significativement à la maladie coronarienne; cela avait été aussi remarqué par Reardon et al. (1985).

Ces résultats ont été confirmés par une étude récente qui montre que le polymorphisme de l'apo E peut affecter aussi le développement et la progression de l'athérosclérose même chez les jeunes de 15 à 34 ans (Hixson et al. 1992). Dans cette étude, on a évalué le pourcentage de surface endothéliale présentant des lésions athérosclérotiques dans les artères thoraciques et abdominales. Les sujets à l'étude étaient des hommes âgés de 15 à 34 ans de race blanche ou noire, morts de causes accidentelles. Cette étude a démontré que les porteurs des phénotypes E3/E2 avaient des niveaux moyens de cholestérol et de VLDL + LDL plus bas que les porteurs du phénotype E3/E3 et qu'ils avaient également, en moyenne, une plus petite surface endothéliale impliquée dans des lésions athérosclérotiques. Les porteurs des phénotypes E4/E3 au contraire, avaient des niveaux moyens de cholestérol et de VLDL + LDL plus élevés que les autres phénotypes et une plus grande surface présentant des lésions athérosclérotiques. Le génotype de l'apo E expliquait environ de 3 à 11% de la variance dans les lésions des artères thoraciques et abdominales et ce pourcentage ne variait pas même lorsqu'on ajustait pour les effets de l'âge, de la cigarette et du cholestérol (Hixson et al. 1992).

Toutes ces études tendent à démontrer que le polymorphisme de l'apo E exerce une influence sur le développement de la maladie coronari-

enne et que son influence s'exerce sur le développement de l'athérosclérose avant même l'apparition de signes de maladie coronarienne. Certaines études l'associent directement aux CAD, indépendamment des niveaux de lipides et de lipoprotéines, tandis que d'autres affirment que son effet s'exerce seulement par l'intermédiaire de l'effet exercé sur les niveaux de lipides et de lipoprotéines.

#### **2.3.6. Le gène de l'apo E et les interactions avec d'autres gènes, ainsi qu'avec l'environnement.**

On a vu que le polymorphisme de l'apo E influençait de façon similaire les concentrations de lipides, de lipoprotéines et d'apolipoprotéines aussi bien chez les hyperlipidémiques et les CAD+ que chez les normolipémiques. Par ailleurs, on a aussi observé que le risque de développer une maladie coronarienne variait largement d'un individu à un autre et que ce risque pouvait être influencé par plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. Chaque gène impliqué dans le contrôle du métabolisme des lipides affecte de façon individuelle les concentrations des lipides et des lipoprotéines; de plus, il est possible que l'expression d'un gène puisse être affectée par l'interaction d'un ou plusieurs gènes. Cependant, il est également possible que le phénotype ultimement mesuré puisse être affecté par le polymorphisme observé au niveau d'un ou de plusieurs gènes. Par conséquent, différents gènes peuvent affecter le métabolisme des lipides de différentes façons et en différentes directions.

Quelques études ont abordé le problème de l'interaction entre le gène de l'apo E et d'autres gènes impliqués dans la régulation du mé-

tabolisme des lipides. Par exemple, Pedersen et Berg (1989) ont montré que l'association entre les isoformes de l'apo E et les niveaux des lipides dans la population en général était limitée aux personnes présentant un génotype particulier au niveau du récepteur des LDLs (LDLR). Avec l'utilisation des RFLPs, on a découvert que le gène du LDLR présentait du polymorphisme au niveau de la séquence d'ADN mais que ses deux variants étaient fonctionnels. Trois génotypes ont été identifiés: A2/A2 où il y a absence d'un site de restriction, A1/A1 où le site de restriction est présent et A2/A1 qui est la forme hétérozygote. On a ainsi observé que l'effet de l'apo E4 sur les niveaux de cholestérol semblait être présent seulement chez les personnes présentant le génotype A2A2 pour le récepteur des LDLs.

Dans une autre étude faite au sein d'une grande famille des Caraïbes, plusieurs individus présentaient les signes cliniques d'une complète absence d'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), due à une mutation au niveau de l'apolipoprotéine CII (CII-T). Chez les hétérozygotes pour cette mutation (CII/CII-T), la présence simultanée de l'allèle ε4 au niveau du gène de l'apo E et de la mutation au niveau de l'apo C-II avait pour effet d'augmenter considérablement les concentrations de cholestérol, de triglycérides, de VLDL, et de nonHDL-C comparée à ceux ne portant pas cette mutation au niveau de l'apo CII ou n'ayant qu'une seule des deux mutations (Hegele et al.1991). Cela suggère qu'une simple mutation récessive affectant le métabolisme des lipides peut avoir un tout autre effet quand elle est cotransmise avec une autre mutation sur un gène différent mais qui influence le même sentier métabolique.



L'influence du polymorphisme de l'apo E chez les femmes pourrait être aussi modulé par l'interaction de d'autres facteurs. En effet, certaines études ont montré que le polymorphisme de l'apo E avait un effet plus modéré sur les concentrations de lipides, de lipoprotéines et d'apolipoprotéines chez les femmes que chez les hommes, et plus particulièrement chez les femmes préménopausées (Hanis et al. 1991; Xhignesse et al. 1991). On attribuait ces différences à une possible interaction entre le gène de l'apo E et le statut hormonal (facteur génétique), ou à l'usage de contraceptifs oraux ou hormones de remplacement (facteur environnemental) (Xhignesse et al. 1991).

Ainsi, les facteurs environnementaux peuvent affecter le métabolisme des lipides. Parmi ces facteurs, la diète apparaît comme l'un des plus importants. En effet, une diète riche en cholestérol et en gras saturés peut affecter considérablement les concentrations de lipides sanguins (Connor et al. 1986), toutefois, tous les individus soumis à une diète pour abaisser leur cholestérol ne répondent pas également à ce changement (Katan et al. 1986). A la suite d'un modèle proposé par Boerwinkle et Utermann (1988) pour expliquer l'effet du polymorphisme de l'apo E, les auteurs avaient émis l'hypothèse que le polymorphisme de l'apo E ou de l'Apo B (polymorphisme détecté au niveau de l'ADN, RFLPs) pouvait influencer la réponse de l'organisme aux changements apportés dans la diète. Les études faites sur des individus soumis pendant quelques semaines à une diète faible en gras saturés et en cholestérol suivie d'une diète enrichie en gras et en cholestérol, ont donné jusqu'à présent des résultats controversés.

Certaines études portant seulement sur les effets de l'apo E ont montré que les individus portant l'allèle  $\epsilon 4$  répondaient davantage à un changement dans la diète comparé à ceux portant les autres phénotypes (Tikkanen et al. 1990; Miettinen T.A. 1991; Mantärri et al. 1991). Par contre, d'autres études ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les génotypes de l'apo E ou ceux de l'apo B dans la réponse aux changements apportés par la diète (riche en cholestérol) (Xu et al. 1990; Boerwinkle et al. 1991; Savolainen et al. 1991). Contrairement à ce qu'avait postulé Boerwinkle et Utermann, aucun polymorphisme n'exerçait d'effet majeur sur la réponse au changement. Il faut donc supposer que d'autres facteurs génétiques ou environnementaux pourraient être responsables des différences observées entre les individus.

L'influence du polymorphisme de l'apo E a aussi été examinée chez les hypercholestérolémiques soumis à un traitement afin de réduire leur niveau de cholestérol. Une première étude impliquait des patients (120) présentant la forme hétérozygote de l'hypercholestérolémie familiale (FH). Ils recevaient une dose de 40mg/jour de simvastatin (agent inhibiteur de la HMG-CoA réductase) durant 12 semaines. Le traitement avait un effet réducteur sur les niveaux de cholestérol (-33%) de LDL-C (-38%) et de triglycérides (-19%) mais la grande variabilité interindividuelle observée dans la réponse à la simvastatin n'était pas reliée au polymorphisme de l'apo E (De Knijff et al. 1990).

Deux autres études impliquant l'utilisation du probucol comme médicament ont donné des résultats opposés. Ces études ont été faites

sur des patients présentant la forme familiale de l'hypercholestérolémie (FH) dans un cas (46 patients) (Eto et al. 1990), et dans l'autre cas, deux sortes d'hypercholestérolémie étaient à l'étude, soit la forme familiale (FH) (50 patients) et la forme polygénique (non-FH) (39 patients) (Nestruck et al. 1987). Les résultats de ces études ont révélé qu'il y avait une différence significative dans la réduction des concentrations moyennes de cholestérol chez les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  comparée à ceux portant le phénotype E3/E3 (Nestruck et al. 1987) (Eto et al. 1990). Cependant, cette différence significative était présente seulement chez les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  ayant la forme familiale de la maladie (FH) et non chez les non-FH (Nestruck et al. 1987). Comme plusieurs gènes sont probablement impliqués dans la maladie non-FH, cela aurait pour effet de masquer l'effet de l'allèle  $\epsilon 4$  sur les niveaux de cholestérol, contrairement à la FH où une seule mutation est à l'origine de la maladie. La nature polygénique de la non-FH masquerait probablement l'influence qu'on avait observée dans le cas des patients FH.

Les résultats de ces recherches démontrent dans un premier temps, que les effets du polymorphisme de l'apo E peuvent être diminués ou amplifiés par l'interaction de d'autres gènes. Là où on ne voit pas d'effet de l'apo E, il se peut que l'effet soit masqué par l'expression d'un autre gène ou d'une mutation sur un autre gène affectant le même phénotype. De plus, comme on l'a vu dans les exemples présentés, l'expression du gène de l'apo E peut aussi être affecté par des facteurs provenant de l'environnement, comme un changement dans la diète, l'utilisation de médicaments ou par des changements dans les habitudes de vie.

Au Québec, très peu d'études ont été faites sur le polymorphisme de l'apo E. Une étude préliminaire faite au Saguenay sur un échantillon restreint avait permis de constater que les fréquences alléliques de l'apo E dans la région présentaient des différences significatives par rapport à celles observées ailleurs au Québec. Dans une première étude, comportant un échantillon beaucoup plus grand provenant de l'enquête québécoise faite par Santé-Québec en 1990, nous avons voulu déterminer les fréquences des allèles de l'apo E dans la région du Lac St-Jean Chibougamau et déterminer l'impact qu'exerçait le polymorphisme de l'apo E sur le profil lipidique de cette population. Dans un deuxième temps, comme la région concernée couvre un très large territoire dont le développement s'est effectué à des périodes différentes nous avons voulu examiner s'il y avait des différences dans les fréquences de l'apo E entre les 4 districts formant cette sous-région, et s'il y avait également des différences dans l'impact exercé par l'apo E sur le profil lipidique de la population entre ces mêmes sous-régions.

### CHAPITRE III

#### POLYMORPHISME DE L'APOLIPOPROTÉINE E AU SEIN DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU.

##### I. FRÉQUENCES DES ALLELES ET EFFETS SUR LES CONCENTRATIONS DES LIPIDES ET DES LIPOPROTÉINES.

APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM IN A FRENCH-CANADIAN  
POPULATION OF NORTH-EASTERN QUÉBEC.

I. ALLELE FREQUENCIES AND EFFECTS ON BLOOD LIPIDS AND LIPOPROTEINS.

N. Robitaille, B.Sc.

G. Cormier, B.Sc.

R. Couture, M.Sc.

J. Davignon, MD.

L. Pérusse, Ph.D.

Human Sciences Department  
Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)  
Chicoutimi P.Québec  
Canada

Physical Activity Sciences Laboratory  
Laval University  
Québec Canada

Address correspondance and request for reprints:

Louis Pérusse Ph.D.  
Physical Activity Sciences Laboratory  
PEPS  
Laval University  
Ste-Foy, Québec  
Canada G1K 7P4

Sources of support: Fonds pour la Formation de chercheurs et l'a-  
ide à la Recherche (FCAR)  
Fondation de l'université du Québec à Chicou-  
timi

## ABSTRACT

We determined the apo E phenotypes and plasma lipid and lipoprotein levels of 435 subjects (233 men and 202 women) living in the Lac St-Jean area of the province of Québec. The apo E allele frequencies in the population sample were  $\epsilon 2 = 0.137$ ,  $\epsilon 3 = 0.749$  and  $\epsilon 4 = 0.114$ . Women had a higher frequency of the  $\epsilon 2$  allele than men (0.158 vs 0.118). Our sample was subdivided in men, pre and postmenopausal women. Cholesterol (CHOL), low density lipoproteins (LDL-C), high density lipoproteins (HDL-C) and triglycerides (TG) were adjusted for age, height, weight, BMI and WHR in all subgroups and the subjects of each subgroup were assigned to three different apo E groups: apo E2, apo E3 and apo E4 groups. The apo E2 group had lower CHOL and LDL-C levels than apo E3, whereas the apoE4 group had the highest values, for all subgroups. The  $\epsilon 2$  allele was also associated with a significant increase in average triglycerides in men and postmenopausal women. The raising effect of the  $\epsilon 4$  allele on cholesterol and LDL-C levels was observed in all subgroups, although the effect was lower in premenopausal women than in the other subgroups, suggesting a possible interaction of the apo E gene with hormonal status. Men and postmenopausal women of the apo E4 group, in addition to higher plasma cholesterol and LDL-C concentrations, had higher triglycerides and lower HDL-C levels than subjects of the apo E3 group. Except for a higher frequency of the  $\epsilon 2$  allele associated to an increase in triglycerides, our results are similar to what has been observed in other Caucasian populations.

### INTRODUCTION:

Apo E is a glycoprotein of 299 amino acids synthesized primarily by the liver, but also synthesized by the spleen, kidney, adrenals, gonads, brain, macrophages and astrocytic glia. It is a structural component of chylomicrons and chylomicron remnants, very low density lipoprotein (VLDL) intermediate density lipoprotein (IDL), and high density lipoproteins (HDLs) particles. Apo E plays a central role in lipid metabolism because it serves as a high affinity ligand for the uptake of these several lipoproteins through the LDL (apoB/E) and the apo E receptors in order to ensure their catabolism (1). The human apo E gene mapped on chromosome 19 (2,3) is polymorphic. Three common alleles  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 and  $\epsilon$ 4, code for three isoforms designated E2, E3 and E4, respectively. The combination of these isoforms gives 6 phenotypes that are recognizable on isoelectric focusing gel of VLDL protein. Several population studies have examined the influence of apo E polymorphism on plasma lipid and lipoprotein levels (4,5) (for a review). In most populations studied, the  $\epsilon$ 2 allele was found to be associated with lower total cholesterol and LDL levels and the  $\epsilon$ 4 allele with higher levels of total cholesterol and LDL compared to the  $\epsilon$ 3 allele (4,5).

In this study, we report the effect of apo E polymorphism on lipids and lipoproteins in a large sample of French Canadians living in the Lac St-Jean area, a region known for its high prevalence of certain genetic diseases (6).



## **METHODS:**

### **Study sample**

This study was undertaken as a part of the Quebec Heart Health Survey (QHHS) conducted in 1990 by the Quebec department of Health. The QHHS was a part of a nationwide effort to gather data on cardiovascular disease risk factors in each province across Canada in order to develop strategies for cardiovascular disease prevention (Canadian Heart Health Surveys Research Group 1992). Therefore, all surveys were conducted under the same standardized protocol described in details by MacLean et al. (1992). When the QHHS was initiated in 1990, some community health departments across the province took advantage of the survey to gather information on cardiovascular health in their own territory. Thus, the Community Health Department of Roberval decided to conduct a survey in the Lac St-Jean and Chibougamau area, which is located in the northeastern region of the province of Québec.

A total of 800 individuals aged from 18 to 74 years were randomly sampled from the health insurance registry lists. Of those sampled, 94% (750) were either reached by telephone or letter or were contacted in person and 87% of them (n=656) agreed to participate in the study. However, because of failure to attend the clinic, or lack of compliance with fasting for blood sampling, or because of losses due to laboratory manipulations, apo E phenotyping was performed samples from 525 individuals. After exclusion of individuals who were not of French descent, of pregnant women, of individuals with diabetes

or thyroid dysfunction, of individuals on medication for thyroid problems and hyperlipidemia, a final sample of 435 unrelated individuals (233 men and 202 women) were included in the present study.

### Data collection

Subjects were first visited by the nurse for home interviews during which information on lifestyle, health status and attitudes and knowledge about risk factors was gathered. The participant was then scheduled (usually within 2 weeks of home visit) to attend a clinic for blood sampling and anthropometric measurements.

Anthropometric measures included height and weight measurements as well as the measure of waist and hip circumferences. From these measurements, the body mass index (weight in kg divided by height in squared meters) (BMI) and the waist to hip ratio (WHR) were calculated and used as indicators of obesity and fat distribution, respectively. Details on these anthropometric measurements are given elsewhere (7).

Blood samples were collected from participants after 12 hours of fasting and centrifuged within 3 hours of collection. Plasma was transferred to tubes and frozen at -40 C. At the end of the survey, all samples were sent to the Lipid Research Laboratory (LRC) of St-Michael's Hospital, University of Toronto, for determination of plasma lipids and lipoproteins. This laboratory is a LRC center certified by the NHLBI-Centers for Disease Control, Lipid Standardization Program. Levels of total plasma cholesterol, triglycerides

and high density lipoprotein (HDL) cholesterol were measured enzymatically using a Technicon Auto-analyser II (8). HDL-cholesterol was measured as the cholesterol in the supernatant after precipitation of non-HDL-cholesterol. LDL-cholesterol was calculated in mmol/L, using the Friedewald formula:  $\text{LDL-cholesterol} = \text{plasma cholesterol} - (\text{HDL-cholesterol} + \text{triglycerides} / 2.2)$  (9).

Apo E phenotypes were determined by the method of Mailly and al (10). This method requires only a small amount of total plasma (20  $\mu$ l) and is suitable for large scale phenotyping. Isoelectricfocusing (IEF) of delipidated plasma sample was performed in immobilized pH gradients (IPG) commercially prepared. After isoelectricfocusing, a passive transfer to nitrocellulose was made, followed by an immunoreaction with mouse anti-apoE monoclonal antibody. After several washing steps the membrane was incubated for 1 hour with a solution containing rabbit anti-mouse IgG conjugated with peroxidase. The samples were finally developed with a freshly prepared solution containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  until the bands were visible. The different apoE isoforms were then identified by two independent observers.

#### Statistical Methods.

Means and standard deviations for age, weight, height, waist to hip ratio (WHR), body mass index (BMI) and plasma lipids and lipoproteins were computed separately for men, women and subgroups of premenopausal and postmenopausal women (11). Except for age and BMI, all means were statistically different between men and women. We chose to analyse women in two separate groups because average lipid

and lipoprotein levels were statistically different between pre and postmenopausal women. Individuals whose values were at  $\pm 4$  SD from the mean of their respective group were excluded from the analyses. Based on that criterion, 2 women were excluded. All lipid and lipoprotein values were adjusted for linear and non-linear (when significant, i.e.  $p < .05$ ) effects of age, height, weight, BMI and WHR using separate regression equations for men, premenopausal and postmenopausal women. In each subgroup, these concomitants were all significantly correlated to lipid variables. The residuals from these regressions were used for further analyses.

The analysis of variance was used to compare lipid and lipoprotein levels among phenotypic classes. Allele frequencies were estimated using the gene counting method. The impact of apo E alleles on levels of blood lipids and lipoproteins was determined separately within each group using the average excess statistic. The average excess of a given allele is defined as the average phenotypic value of individuals carrying that allele minus the overall population mean (12). The average excess statistic was preferred to the average effect because all possible apo E phenotypes were not represented in our sample. Finally, the contribution of phenotypic variance ( $R^2$ ) attributable to the apo E polymorphism was estimated by the sum of squares attributable to a main effect of the apo E divided by total sum of squares  $\times 100$ .

## RESULTS

The relative frequencies of apo E alleles are presented in Table 1. In the pooled sample, the  $\epsilon 3$  allele was the most common allele (.749) followed by the  $\epsilon 2$  (.137) and the  $\epsilon 4$  (.114) alleles, respectively. (Table 1). We observed a difference in relative frequencies between men and women. Although not significant, women tended to have a higher relative frequency of  $\epsilon 2$  allele than men, but this difference was mainly balanced by a corresponding decrease in the  $\epsilon 3$  allele frequency in women. In women subgroups, the  $\epsilon 4$  allele frequency was lower than the  $\epsilon 2$  allele frequency. No difference in relative allele frequencies between pre and postmenopausal women was observed (Table 1).

Insert table 1 about here

Descriptive statistics of concomitants, lipid and lipoprotein variables are presented in Table 2. Except for age and BMI, all variables were found to be significantly different, between genders. Values of CHOL, LDL-C and TG were significantly higher in men than in women while women had higher HDL-C values. These results are in agreement with several other reports. Age, lipid and lipoprotein traits were statistically different between pre and postmenopausal women, the latter having higher values than the former. These results are also consistent with other studies of lipid metabolism between premenopausal and natural menopausal women (13).

Insert table 2 about here

The multiple linear regressions performed on CHOL, LDL, HDL, and triglycerides for several concomitant variables resulted in statistically significant reduction of variance in men, pre and postmenopausal women (data not shown). The percentage of variance of lipids and lipoproteins attributable to concomitant variables ( $R^2 \times 100$ ) ranged from 15% to 22% in men, 15% to 18% in premenopausal women and 25% to 35% in postmenopausal women.

Because of the rarity of some phenotypes, subjects were assigned to three different groups: the apo E2 group (E2/E2 and E3/E2 individuals), the apo E3 group: (E3/E3 individuals) and the apo E4 group: (E4/E3 and E4/E4 individuals). Three men with the E4/E2 phenotype were excluded from the analysis. Table 3 presents the results of the one-way analysis of variance. The average adjusted plasma lipid and lipoprotein levels for each apo E group in men, pre and postmenopausal women are presented. Mean levels of lipids and lipoproteins in men were statistically ( $p < .05$ ) different among the 3 Apo E groups. The average cholesterol and LDL-C levels in the total group of men were 5.22 mmol/L and 3.25 mmol/L, respectively. Compared to the apo E3 group, subjects of the apo E2 and apo E4 groups were found to have, respectively, lower and higher values of total cholesterol and LDL-C. The same effects of apo E polymorphism were observed in women although a significant difference among apo E groups was seen only for CHOL and LDL-C in premenopausal women and for LDL-C only in postmenopausal women.

Insert table 3 about here

Variation of the HDL-C levels among the 3 apo E groups is significant only in men, and the results are in the opposite direction to those observed for cholesterol and LDL-C. Levels of HDL-C are lower in apo E4 group compared to the apo E3 group and the difference among the three apo E groups reached significance (001). We observed also an effect of the apo E polymorphism on triglycerides. Compared to apo E3 group, triglycerides levels were higher in apo E2 and apo E4 groups. These effects were mainly seen in men and postmenopausal women, no apparent effect was seen in premenopausal women.

The average excesses of the 3 apo E alleles in men, premenopausal and postmenopausal women for each lipid and lipoprotein variable are presented in Table 4. The  $\epsilon 2$  allele is associated with lower cholesterol and LDL-C in the 3 subgroups while the  $\epsilon 4$  allele has the opposite effect. The effect of the  $\epsilon 3$  allele is near zero. In premenopausal women, the raising effect of the  $\epsilon 4$  allele on cholesterol and LDL-C is lower than the corresponding effect in men and postmenopausal women. This difference is not explained by any difference in the frequency of the  $\epsilon 4$  allele between men and premenopausal women. Compared to CHOL and LDL-C, no substantial effect of apo E allele is observed for HDL-C in any of the subgroups, although the  $\epsilon 4$  allele appears to be associated with lower HDL-C in men, in accordance with values on Table 3. Regarding the triglycerides, the  $\epsilon 2$  allele was associated with an increase in triglycerides in men and a more pronounced increase in postmenopausal women, whereas the  $\epsilon 4$  allele was associated with higher triglycerides levels in men only.

Insert table 4 about here

The percentages of variance ( $R^2 \times 100$ ) attributable to the apo E polymorphism for each lipid trait in men, pre and postmenopausal women are presented in Table 5. In men, the Apo E polymorphism accounted for approximately 5 to 7% of the total variance in lipid and lipoprotein traits. In pre (1) and postmenopausal (2) women, no significant effect of apo E polymorphism was observed for HDL-C and TG, while for CHOL and LDL-C, the apo E polymorphism was found to range from 5% to 14%.

Insert table 5 about here



## DISCUSSION

Relative allele frequencies of Apo E have been determined in 46 populations representing a broad range of ethnic, cultural and geographical differences. In all these studies a great heterogeneity was found among different populations. Indeed, the dissimilarities in apo E allele frequencies among Caucasian populations were comparable to those observed between some Caucasian and Asian populations. Furthermore, a recent study (5) which compiled all available data on relative Apo E allele frequencies in several populations revealed that Caucasians of Southern Europe have apo E allele frequencies similar to those of Japanese populations, whereas Caucasians of Northern Europe, Canada and USA present a lower frequency of the  $\epsilon 3$  allele and a 1.5 to 2 times higher frequency of the  $\epsilon 4$  allele than other Caucasians.

Only a few studies on apo E alleles frequencies have been conducted in population samples from Canada (see 5 for a review). Despite the fact that the populations studied come from different regions and were ascertained on a different basis, the results found in these populations were similar to those reported for most Caucasian populations, except for one population specifically selected for its good health (14). Our sample is a random sample of French Canadians issued from a region of the province of Québec (Lac St-Jean-Chibougamau) known for its high prevalence of some genetic diseases. The relative apo E allele frequencies reported here are somewhat different from those observed in other Caucasian populations. We found a higher frequency of the  $\epsilon 2$  allele in this sample (0.137) compared

to what has been reported in most populations. Indeed, based on the results of 46 populations around the world (5) and with the exception of two study populations of small sample size ( $n=110$ ), the frequency of the  $\epsilon 2$  allele estimated in the present study is, to our knowledge, the highest ever reported. This difference is difficult to explain and might be due to a difference in French Canadian's ethnic background and/or due to a regional difference caused by a geographical isolation. Results from two other studies performed in the province of Québec seem to suggest higher frequencies of the  $\epsilon 2$  allele in Québec compared to other populations. In one study in which apo E phenotypes were available on 173 blood donors from the region of Chicoutimi, the frequency of the  $\epsilon 2$  allele were found to reach 0.191 (15). In another study, apo E phenotypes were determined in 63 premenopausal women living around Québec city and a frequency of 0.20 was observed for the  $\epsilon 2$  allele (16). However, we cannot conclude that French-Canadians are different from other Caucasian populations on the basis of these few studies, and other studies on French Canadian samples in different regions of the province of Québec will be needed to see if there are regional differences.

Most studies on the impact of apo E polymorphism on blood lipids and lipoproteins have made no distinction between genders. Some studies examined the relative frequencies of apo E allele separately in men and women (14, 17) and no difference were found between genders. In our sample, men and women presented some differences. Women had a higher  $\epsilon 2$  allele frequency than men and this was mostly balanced by a lowering of the  $\epsilon 3$  allele frequency. This trend was also observed when pre and postmenopausal women were considered separately.

Several population studies have examined the influence of the common apo E polymorphism on lipids and lipoprotein traits. Despite significant differences in the apo E allele frequencies and significant differences in mean cholesterol levels among populations, all studies have demonstrated an association between the apo E phenotype and CHOL and LDL-C levels (18, 4, 19). As observed in most populations, individuals carrying the  $\epsilon 2$  allele had lower levels of plasma cholesterol and LDL than individuals carrying the  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotype, whereas individuals with the  $\epsilon 4$  allele showed an elevation of their plasma cholesterol and LDL levels.

As observed in previous studies, our results for men and premenopausal women showed significant differences among the apo E groups for CHOL and LDL levels. Subjects of the apo E2 and apo E4 groups have, respectively, lower and higher levels of plasma cholesterol and LDL-C than individuals of apo E3 group. The same trend was observed in postmenopausal women, but the difference among apo E groups reached significance only for LDL-C. Usually, natural menopause leads to a rise in cholesterol, LDL-C and triglycerides and a decline in HDL-C. These effects result from changes in lipid metabolism after estrogen deprivation (13). A few studies examined lipid and lipoprotein levels for each apo E type separately in pre and postmenopausal women (20, 21) and found no significant effect of apo E polymorphism on total cholesterol in postmenopausal women. The lack of significant effect in postmenopausal women could probably be explained by the decline of estrogen output in those women.

Results of the ANOVA showed a significant ( $p < .001$ ) difference in HDL-C levels among apo E groups in men. Based on the multiple comparison tests, this difference is attributable to a lower level of HDL-C in apo E4 men compared to men of apo E2 and apo E3 groups. No significant association between apo E polymorphism and HDL-C has been reported so far. However, a meta-analysis of a large number of studies showed that HDL-C levels were significantly lower in apo E4/E3 subjects than their respective apo E3/E3 controls (19). These results support our own observation that apo E polymorphism might be associated with a significant difference in HDL-C in men. However, we did not find any significant association between apo E polymorphism and HDL-C in pre and postmenopausal women, which is in agreement with other studies (20, 21).

In contrast to what has been reported so far, we found higher levels of triglycerides in apo E2 and apo E4 men ( $p = .005$ ) and postmenopausal women ( $p = .056$ ). In their meta-analysis, Dallongeville et al. (19) showed a clear association between apo E phenotype and plasma triglyceride concentrations. They found that triglycerides were higher in subjects carrying the  $\epsilon 2$  allele and in subjects having the E4/E3 genotype. This relationship was observed in most populations of various groups and different origins (19). Our results showed the same trend for men and possibly for postmenopausal women (borderline significance), but not for premenopausal women. In the latter, triglyceride levels were lower than in men and postmenopausal women and were not influenced by the apo E polymorphism. These results might be attributable to factors such as endogenous sex steroid hormones that are known to have an influence on plasma lipid and lipoprotein

levels in premenopausal women (22). When women become postmenopausal, there is a worsening of their lipid profile. For triglycerides, this appears mainly in women carrying the  $\epsilon 2$  allele.

The average excesses of the three common apo E alleles reported here are in agreement with previous studies. The  $\epsilon 2$  allele substantially reduced CHOL and LDL-C levels in all subgroups, whereas the  $\epsilon 4$  allele had the opposite effect. The raising effect of the  $\epsilon 4$  allele was lower for CHOL and LDL-C in premenopausal women than in the other subgroups. This difference is difficult to explain and cannot be attributable to a difference in allele frequencies between pre and postmenopausal women, or between genders, since all subgroups had approximatively the same  $\epsilon 4$  allele frequency. These results suggest that the impact of the apo E gene may be influenced by hormonal levels which results in a decrease of its effect on CHOL and LDL-C without completely masking it. This possibility of an interaction between apo E polymorphism and menopausal status has already been observed in Mexican-American women (21). Deprivation of oestrogen results in a rise of CHOL and LDL-C levels in those carrying the  $\epsilon 4$  allele and an increase in triglycerides in those carrying the  $\epsilon 2$  allele. More studies on the interaction of hormones and genes or lipids in women are needed to understand how hormones exert their influence on lipid metabolism.

The  $\epsilon 2$  allele was associated with an increase of triglycerides in men and a more pronounced increase in postmenopausal women. Although pre and post menopausal women had the same  $\epsilon 2$  allele frequency, they showed a great difference in the effect of the allele. The higher

levels of triglycerides in men and postmenopausal women carrying the  $\epsilon 2$  allele can be explained by the slower plasma clearance of chylomicrons and VLDL remnants in those people (23, 24). An alteration of the lipolytic process of VLDL to LDL in individuals with the E2/E2 phenotype could also contribute to plasma triglycerides accumulation in these subjects (25).

The  $\epsilon 4$  allele was found to increase triglycerides in men but not in women. Based on a meta-analysis of 27 studies, the apo E4/E3 phenotype has been found to be associated with elevated plasma levels of triglycerides (19). These authors hypothesized that the apo E4 which is preferentially associated with VLDL, can interfere with plasma lipase activity and/or with the removal system resulting in delayed lipolysis and/or clearance of plasma triglycerides in subjects carrying the E4/E3 phenotype. Other reports also demonstrated that apo E modulates lipoprotein lipase and hepatic lipase activities (26-28). Our finding of a raising effect of the  $\epsilon 4$  allele on triglycerides in men is in agreement with this hypothesis, but does not explain why a similar effect is not observed in women. One explanation might be that the effect of  $\epsilon 4$  allele on triglycerides is gender specific, which would be in agreement with the results recently reported by Reilly et al. 1992 (29). The possible interaction of other factors on the apo gene in women can modulate its expression.

The major source of variability in lipid and lipoprotein traits are attributable to concomitants. Postmenopausal women present the highest percentage of variability for each lipid and lipoprotein traits, age accounting for the major fraction of variability. The

percentage of variability attributable to Apo E polymorphism on lipid and lipoprotein traits was in the same range as those observed in other reports (18). It varied between 4 and 13.55%. The greatest variance was observed for LDL-C in all subgroups. Sample variance for LDL-C in postmenopausal women was about twice that observed in men. These results might suggest that the influence of apo E polymorphism on cholesterol levels is more pronounced in women whose plasma lipids no longer reflect hormonal influences.

In summary, results of this study on the influence of apo E polymorphism in a large sample from the Lac St-Jean area revealed that the frequency of the  $\epsilon 2$  allele was higher in this sample than in other populations, and that women tended to have a higher  $\epsilon 2$  allele frequency than men. The  $\epsilon 2$  allele was associated with an elevation of triglyceride levels, specifically in men and postmenopausal women, but not in premenopausal women. Apo E polymorphism exerted the same influence on cholesterol and LDL-C levels as seen in other populations, although the effect of the  $\epsilon 4$  allele on these variables was lower in premenopausal women, suggesting an influence of sex hormone steroids on the impact of the apo E gene. These results are in accordance with precedent findings about the influence of apo E on lipid and lipoprotein variables, which is not only gender specific, but also presents some differences between pre and postmenopausal women.

### Acknowledgments

This study was supported by grants from the "Fonds pour la Formation de chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR)" and from the "Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi" \*. Thanks are expressed to all nurses as well as all individuals from the Community Health Department of Roberval, the Lipid Research Laboratory, University of Toronto who were involved in data collection of the present study. The authors also wish to thank Claudia Rodriguez and Michel Tremblay of the Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group, Clinical Research Institute of Montréal for apo E phenotyping, and Camille Simard, Robin Simard and Najet Ben Yaissef for technical assistance in creating the data file.

\* Gaétane Cormier is the recipient of an FCAR fellowship;

\* Louis Pérusse is a research scholar from " le Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ)



## REFERENCES

1. Mahley Robert W. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*. 1988; 240: 622-629.
2. Lin-Lee Y. C., Kao F.T., Cheung P., Chan L. Apolipoprotein E Gene Mapping and Expression: Localization of the Structural Gene to Human Chromosome 19 and Expression of ApoE mRNA in Lipoprotein- and Non-Lipoprotein-Producing Tissues. *Biochemistry*. 1985; 24: 3751-3756.
3. Das H.K., McPherson J., Bruns G.A.P., Karathanasis S.K., Breslow J.L. Isolation, Characterization, and Mapping to Chromosome 19 of the Human Apolipoprotein E Gene. *J. Biol.Chem.* 1985; 260: 6240-6247.
4. Hallman D.M., Boerwinkle E., Saha N., Sandholzer C., Menzel H.J., Csázár A., Utermann G. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 338-349.
5. Gerdes L.U., Klausen I.C., Sihm I., Færgeman O. Apolipoprotein E Polymorphism in a Danish Population Compared to Findings in 45 Other Study Populations around the World. *Genetic Epidemiology* 1992; 9: 155-167.
6. Bouchard G., De Braekeler M. Histoire d'un génôme. Presses de l'Université du Québec. 1991 607 pp.
7. Reeder B.A., Angel A., Ledoux M., Rabkin S.W., Young K., Lamont E.S. Obesity and its relation to cardiovascular disease risk factors in Canadian adults. 1992. Canadian Heart Health Surveys Research Group.
8. Lipid and Lipoprotein Analysis: Manual of Laboratory Operation, Lipid Research Clinics Program (DHEW publ no 75-678 rev) US Dept of Health, Education, and Welfare, Washington, 1982.
9. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentration without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18: 499-502.
10. Mailly F., Davignon J., Nestruck A.C. Analytic isoelectric focusing with immobilized pH gradients of human apolipoprotein E from very low density lipoproteins and total plasma. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 149-155.
11. SPSS-X Users's Guide. 3rd Edition. SPSS Inc. 444 N-Michigan Ave, Chicago Illinois, 60611 Copyright 1988 by SPSS Inc.
12. Templeton AR. The general relationship between average effect and average excess. *Genet Res.* 1987; 49: 69-70.
13. Matthews KA., Meilahn E., Kuller L.H., Kelsey S.F., Caggiula A.W., Wing R.R. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321: 641-646.

14. Xhignesse M., Lussier-Cacan S., Sing C.F., Kessling, A.M., Davignon J. Influences of Common Variants of Apolipoprotein E on Measures of Lipid Metabolism in a Sample Selected for Health. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 1100-1110.
15. Moorjani S., Morissette J., Laberge C., et al. Apo E polymorphism in Québec population. *Clin. and Invest. Med.* 1987; 10(4): B51.
16. Pouliot M.C., Després J.P., Moorjani S., Lupien P.J., Tremblay A., Bouchard C. Apolipoprotein E polymorphism alters the association between body fatness and plasma lipoproteins in women. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 1023-1029.
17. Xu C.F., Talmud P.J., Angelico F., Del Ben M., Savill J., Humphries S.E. Apolipoprotein E Polymorphism and Plasma Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Levels in Italian Children. *Genetic Epidemiology*. 1991; 8: 389-398.
18. Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 1-21.
19. Dallongeville J., Lussier-Cacan S., Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J. Lipid Research* 1992; 33: 447-454.
20. Eichner J. E., Kuller L.H., Ferrell R.E., Meilah E.N., Kamboh M.I. Phenotypic Effects of Apolipoprotein Structural Variation on Lipid Profiles. III. Contribution of Apolipoprotein E Phenotype to Prediction of Total Cholesterol, Apolipoprotein B, and Low Density Lipoprotein Cholesterol in the Healthy Women Study. *Arteriosclerosis*. 1990; 10: 379-385.
21. Hanis C.L., Hewett-Emmett D., Douglas T.C., Bertin T.K., Schull W.J. Effects of the Apolipoprotein E Polymorphism on Levels of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins Among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 362-370.
22. Lussier-Cacan S., Xhignesse M., Desmarais J.L., Davignon J., Kafrissen M.E., Chapdelaine A. Cyclic Fluctuations in Human Serum Lipid and Apolipoprotein Levels during the Normal Menstrual Cycle: Comparison with Changes Occuring during Oral Contraceptive Therapy. *Metabolism*. 1991; 40: 849-854.
23. Gregg R.R., Zech L.A., Schaefer E.J., Brewer H.B. Apolipoprotein E metabolism in normolipoproteinemic human subjects. *J. Lipid Res.* 1984; 25: 1167-1176.
24. Brenninkmeijer B.J.P., Stuyt P.M., Demacker P.N.M., Stalenhoef A.F.H., van't Laar A. Catabolism of chylomicron remnants in normolipidemic subjects in relation to the apoprotein E phenotype. *J. Lipid Res.* 1987; 28: 361-370.

25. Ehnholm C., Mahley R.W., Chappell D.A., Weisgraber K.H., Ludwig E., Witztum J.L. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of  $\beta$ -very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81: 5566-5570.
26. Yamada N., Murase.T. Modulation by apolipoprotein E of lipoprotein lipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 94: 710-715.
27. Wang C.S., McConathy W.J., Kloer H.U., Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. *J. Clin. Invest.* 1985; 75: 384-390.
28. McConathy W.J., Wang C.S. Inhibition of lipoprotein lipase by the receptor-binding domain of apolipoprotein E. *FEBS Lett.* 1989; 251: 250-252.
29. Reilly S.L., Ferrell R.E., Koktke B.A., Kamboh M.I., Sing C.F. The Gender-specific Apolipoprotein E Genotype Influence on the Distribution of Lipids and Apolipoproteins in the Population of Rochester, MN.I. Pleiotropic Effects on Means and Variances. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 1155-1166.

**TABLE 1:**

Relative Frequencies of the Three Common Apolipoprotein E Alleles  
in a Sample of the Lac St-Jean area.

Subgroup	ALLELES			
	<i>n</i>	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Men	233	0.118	0.762	0.120
All women	202	0.158	0.735	0.106
Premenopausal women	140	0.157	0.732	0.111
Postmenopausal women	62	0.161	0.742	0.097
<b>Total</b>	<b>435</b>	<b>0.137</b>	<b>0.749</b>	<b>0.114</b>

**TABLE 2:**

Descriptive Statistics of the Lac St-Jean area sample.

<b>Total:</b> <b>(n=435)</b>	<b>Men</b> <b>(n=235)</b>	<b>Women</b> <b>(n=202)</b>	<b>Premenopausal</b> <b>women</b> <b>(n=140)</b>	<b>Postmenopausal</b> <b>women</b> <b>(n=62)</b>
Variables				
Age (years)	44.8 ± 17.1	41.9 ± 17	32.1 ± 7.7	64.2 ± 9.6†
Weight (kg)	74.3 ± 12.6	61.9 ± 13*	60.8 ± 12.6	64.4 ± 13.6
Height (cm)	171.2 ± 7	159 ± 6.3*	160.4 ± 5.9	155.8 ± 5.9
Waist/hip ratio	.91 ± .07	.78 ± .06*	.77 ± .05	.82 ± .06
BMI (kg/m )	25.2 ± 3.6	24.5 ± 5.3	23.6 ± 4.9	26.6 ± 5.7
Lipids ‡				
CHOL	5.22 ± .95	5.02 ± 1.0*	4.70 ± .86	5.75 ± .95†
LDL-C	3.25 ± .83	3.00 ± .86*	2.79 ± .57	3.49 ± .90†
HDL-C	1.22 ± .29	1.39 ± .30*	1.35 ± .28	1.48 ± .33†
TG	1.65 ± .87	1.39 ± .70*	1.23 ± .62	1.72 ± .76†

All values are means ± standard deviation. ‡ All values are expressed in mmol/l.

BMI, body mass index; CHOL, cholesterol; LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins; TG, triglycerides

\* significant difference ( $p \leq .01$ ) between genders.

† significant difference ( $p \leq .01$ ) between pre and postmenopausal women.

**TABLE 3:**

Average adjusted serum lipid and lipoprotein levels among the 3 Apo E groups in men, premenopausal (1) and postmenopausal women (2).\*

	Apo E Groups			Means	p
	Apo E2	Apo E3	Apo E4		
<b>Total (n=432)</b>	108	233	91		
<b>Men (n=230)</b>	48	130	52		
CHOL	4.98 ± .80	5.21 ± .80	5.49 ± .92	5.22± .84	.007
LDL-C	2.93 ± .66	3.27 ± .74	3.52 ± .78	3.25± .75	.000
HDL-C	1.24 ± .26	1.26 ± .27	1.10 ± .22	1.22± .27	.001
TG †	1.70 ± .87	1.46 ± .67	1.82 ± .75	1.61± .76	.005
<b>Women (1) (n=140)</b>	42	70	28		
CHOL	4.42 ± .73	4.82 ± .78	4.82 ± .80	4.70 ± .79	.02
LDL-C	2.48 ± .73	2.92 ± .72	2.92 ± .58	2.79 ± .69	.002
HDL-C	1.36 ± .27	1.35 ± .25	1.34 ± .27	1.35 ± .26	.91
TG. †	1.24 ± .60	1.20 ± .55	1.21 ± .55	1.21 ± .56	.97
<b>Women (2) (n=62)</b>	18	33	11		
CHOL	5.47 ± .90	5.78 ± .70	6.12 ± .86	5.75 ± .81	.10
LDL-C	3.08 ± .86	3.58 ± .63	3.90 ± .84	3.49 ± .78	.014
HDL-C	1.46 ± .20	1.49 ± .30	1.49 ± .33	1.48 ± .28	.91
TG. †	1.98 ± .73	1.54 ± .60	1.60 ± .40	1.67 ± .63	.056

All values are means ± standard deviation

All values are expressed in mmol/L.

Chol, cholesterol; LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins; TG, triglycerides.

† transformation in neperien logarithm before regression.

\* lipids values were adjusted for the effects of age, BMI, Waist/hip ratio, height and weight.

Apo E2 group (E2/E2 and E3/E2), Apo E2 group (E3/E3), Apo E4 group (E4/E3 and E4/E4), 3 individuals with E4/E2 were excluded.

**TABLE 4:**

Average excesses of the three common Apo E alleles for lipid and lipoprotein traits in men, premenopausal women (1) and postmenopausal women (2).\*

Variables:(mmol/l) *		ALLELES		
		ε2	ε3	ε4
CHOL	Men	-0.240	-0.006	+0.265
	Women(1)	-0.274	+0.041	+0.116
	Women(2)	-0.194	-0.004	+0.359
LDL-C	Men	-0.340	+0.011	+0.260
	Women(1)	-0.313	+0.047	+0.133
	Women(2)	-0.336	+0.020	+0.407
HDL-C	Men	+0.016	+0.015	-0.112
	Women(1)	+0.010	+0.002	-0.025
	Women(2)	-0.026	+0.007	-0.008
TG.	Men	+0.169	-0.075	+0.235
	Women(1)	+0.065	-0.011	+0.015
	Women(2)	+0.342	-0.065	-0.066

Average excess values are in mmol/L

Chol, cholesterol, LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins; TG. triglycerides.

\* values are adjusted for age, BMI, WHR, height and weight.

**TABLE 5:**

Percentage of Sample Variance ( $R^2 \times 100$ ) of each lipid and lipoprotein trait attributable to Common Apo E Polymorphism in men, pre (1) and postmenopausal women (2).

Variables: mmol/L	Men	Women (1)	Women (2)
CHOL	4.29% †	5.53% *	7.47%
LDL-C	6.83% †	8.48% †	13.55% *
HDL-C	5.78% †	0.10%	0.42%
TRIG.	4.53% †	0.045%	9.26%

ANOVA were executed on Apo E2 group (E2/E2 and E3/E2), Apo E3 group (E3/E3) and Apo E4 group (E4/E3 and E4/E4)

3 men with the E4/E2 phenotype were excluded from the analysis

\*  $p \leq .05$

†  $p \leq .01$



## CHAPITRE VI

### POLYMORPHISME DE L'APOLIPOPROTÉINE E AU SEIN DE LA POPULATION DU LAC ST-JEAN CHIBOUGAMAU.

#### II.COMPARAISONS DES FRÉQUENCES ALLÉLIQUES ENTRE LES SOUS-RÉGIONS.

APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM IN A FRENCH-CANADIAN  
POPULATION OF NORTH-EASTERN QUÉBEC.

II. COMPARISON OF ALLELE FREQUENCIES BETWEEN SUBREGIONS.

N. Robitaille B.Sc.

G. Cormier B.Sc.

R. Couture M.Sc.

J. Davignon MD.

L. Pérusse Ph.D.

Human Sciences Department  
Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)  
Chicoutimi P.Québec  
Canada

Physical Activity Sciences Laboratory  
Laval University  
Québec Canada

Address correspondance and request for reprints:

Louis Pérusse Ph.D.  
Physical Activity Sciences Laboratory  
PEPS  
Laval University  
Ste-Foy, Québec  
Canada G1K 7P4

Sources of support: Fonds pour la Formation de chercheurs et  
l'aide à la Recherche (FCAR)  
Fondation de l'université du Québec à Chicou-  
timi

## ABSTRACT

We determined the apo E phenotypes and plasma lipid and lipoprotein levels of 435 subjects (233 men and 202 women) living in Lac St-Jean area which is located in the northeast of the province of Québec. The apo E allele frequencies in the population sample were  $\epsilon_2 = 0.137$ ,  $\epsilon_3 = 0.749$  and  $\epsilon_4 = 0.114$ . The Lac St-Jean area includes four geographical subregions named Alma, Roberval, Dolbeau and Chibougamau. Comparisons of allele frequencies among these subregions revealed no significant differences between Alma, Roberval and Dolbeau but a significantly higher frequency of the  $\epsilon_2$  allele in Chibougamau (0.181) compared to the three other subregions combined (0.119). The impact of apo E polymorphism and subregion (Chibougamau vs the 3 others) on blood lipid and lipoprotein levels adjusted for age, height, weight, body mass index, waist to hip ratio were assessed by a two way analysis-of-variance. Levels of total cholesterol (Chol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides were found to be significantly different among Apo E phenotype but not among subregions. No significant differences were observed in the effects of apo E on blood lipids and lipoproteins among the two subregions considered for the analyses, as revealed by the absence of interaction effects. In both subregions, Chol and LDL-C levels were the lowest in the apo E2 (E2/E2 and E3/E2) individuals and the highest in apo E4 (E4/E3 and E4/E4) individuals. In contrast with other studies done so far, the apo E polymorphism was also found to significantly influence triglyceride levels, the  $\epsilon_2$  and  $\epsilon_4$  alleles having a raising effect on triglycerides in both subregions. This

effect was more pronounced in the district of Chibougamau and when associated to lower HDL-C levels, higher CHOL and LDL-C levels, it may increase the risk of cardiovascular disease in this subset of people.

## INTRODUCTION

Apo E is a structural component of chylomicrons and chylomicron remnants, very low density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL), and high density lipoprotein (HDL) particles. It plays a central role in lipid metabolism serving as a ligand for the uptake of these several lipoproteins through the LDL (apoB/E) receptors and the Apo E receptors in order to ensure their catabolism (1) Apo E is a glycoprotein composed of 299 amino acids synthesized primarily by the liver, but also synthesized by the spleen, kidney, adrenals, gonads, brain, macrophages and astrocytic glia. The human Apo E gene has been mapped to chromosome 19 (2,3) and appeared to be polymorphic. Genetic polymorphism of Apo E is characterized by three common alleles:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ , coding for three isoforms of the protein, E2, E3 and E4 respectively. The combination of these three isoforms gives 6 phenotypes that are detectable on isoelectric focusing gel of VLDL protein. In all populations studied thus far, the  $\epsilon 3$  allele presented the highest frequency, although the relative frequencies of the three alleles showed considerable variation among populations (4,5). Most of the studies on the influence of Apo E polymorphism on plasma lipid and lipoprotein levels showed that the genetic variation at the Apo E locus exerted its major effect on cholesterol and LDL-C; the  $\epsilon 2$  allele being associated with lower and the  $\epsilon 4$  allele with higher levels of total cholesterol and LDL-C compare to  $\epsilon 3$  allele (4,6 for a review). These effects were observed in every population studied thus far, although some studies reported variation in the magnitude of the effects among populations (7) that might be modulated by diet (8). One study involving several popula-

tions indicated that, despite allelic variations at the apo E locus among populations, there were no significant difference in effects among these populations (4).

Only a few studies examined differences in apo E allele frequencies and effects among different regions of a given population. Regional differences in apo E phenotypes distribution and effects on blood lipids were examined in children living in Eastern and Western parts of Finland. Despite a higher rate of CHD in the eastern part of the country compared to the western part, no difference in apo E allele frequencies was found between the two regions (9). However, this cross-sectionnal study over a period of 6 years showed an association between apo E phenotypes and serum lipids in five areas of the country. Studies on the decline of serum lipids over this period also showed that the decline was apo E dependent in the western part but not in the eastern part of the country (10).

Few data are available on the Apo E allele frequencies in the population of the province of Québec. This study presents data on the population of the Saguenay Lac St-Jean (SLSJ) region located 260 km. northeast of Québec City (see Figure 1). The SLSJ region is divided in three subregions: Bas-Saguenay, Haut-Saguenay and Lac St-Jean. Each of these subregions are also subdivided in smaller subregions. The Lac St-Jean area has four subregions named Alma, Dolbeau, Roberval and Chibougamau (see Figure 2). The first three subregions are located around the lake St-Jean and are closely related together, whereas the Chibougamau subregion is geographically located at 244 km. northwest of Roberval. In this study we want to examine if the

apo E allele frequencies as well as the impact of apo E polymorphism on blood lipids and lipoproteins are different between the population of Chibougamau subregion, which has been developed recently (1954), and the populations of the 3 other districts, which have been developed earlier during the nineteenth century, around 1839.

Insert Figure 1 and 2 around here

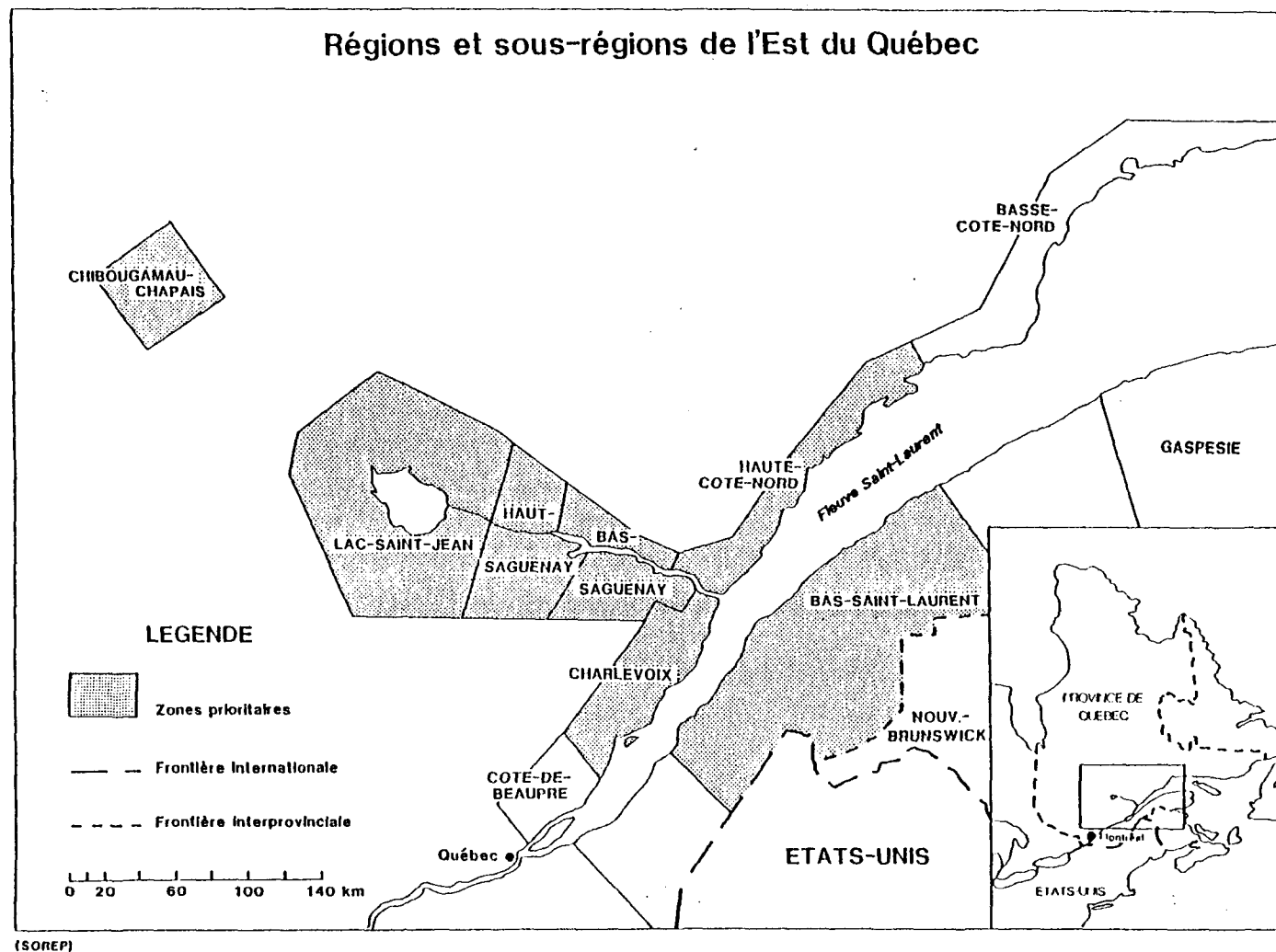


FIGURE 1: REGIONS AND SUBREGIONS OF THE EAST OF QUEBEC



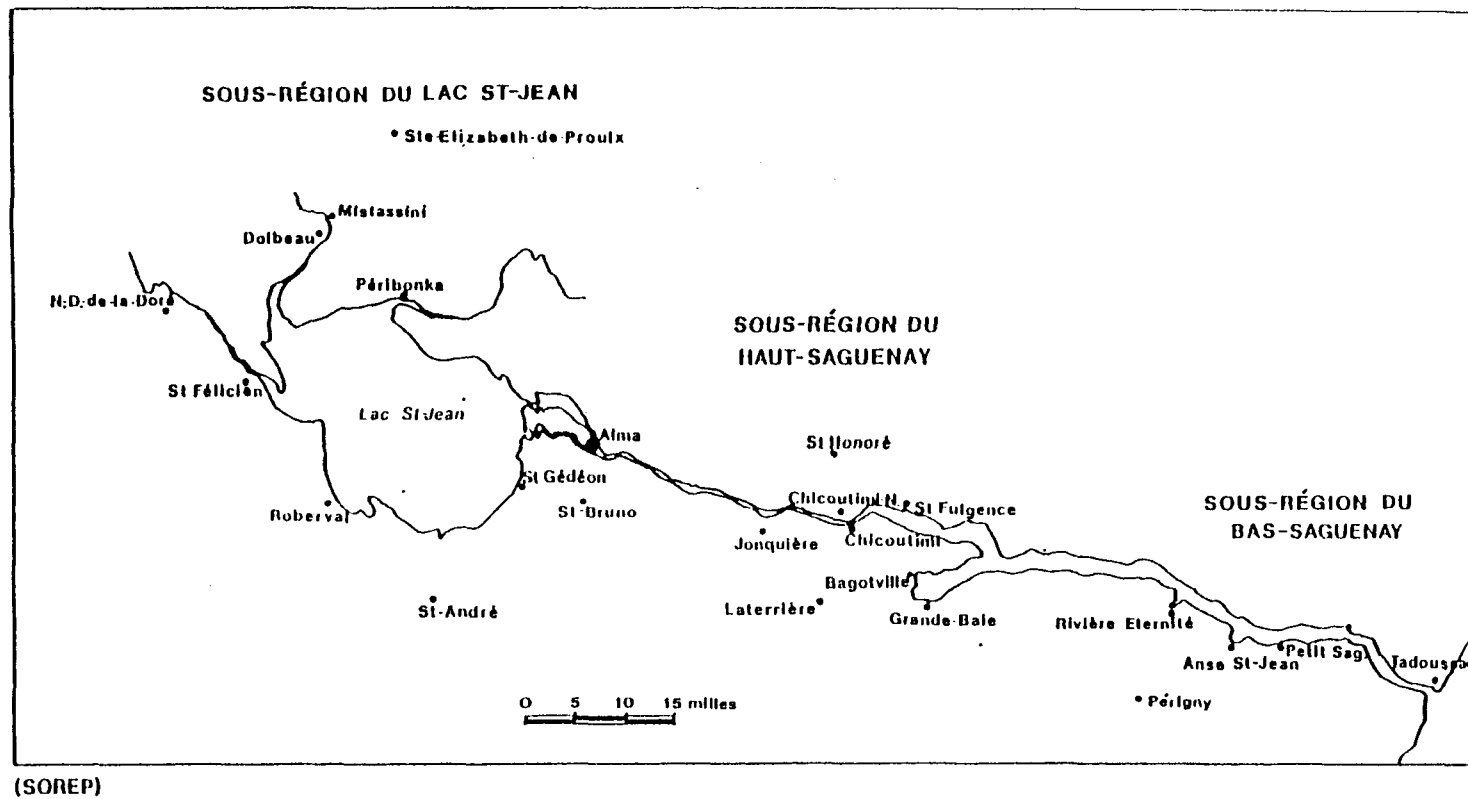


FIGURE 2: SUBREGIONS OF THE SAGUENAY LAC ST-JEAN AREA

## METHODS

### Study sample

This study was undertaken as a part of the Quebec Heart Health Survey (QHHS) conducted in 1990 by the Quebec department of Health. The QHHS was a part of a nationwide effort to gather data on cardiovascular disease risk factors in each province across Canada in order to develop strategies for cardiovascular disease prevention (Canadian Heart Health Surveys Research Group 1992). Therefore, all surveys were conducted under the same standardized protocol described in details by Connelly et al. (11). When the QHHS was initiated in 1990, some Community Health Departments across the province decided to extend the survey, to gather information on cardiovascular health in their own territory. Thus, the community health department of Roberval conducted the survey in the Lac St-Jean and Chibougamau area, which is located in the northeastern part of the province of Québec.

Eight hundred individuals aged from 18 to 74 years were randomly selected from the health insurance registry lists. Of those sampled, 94% (750) were either reached by telephone or letter or were contacted in person and 87% of them (n=656) agreed to participate in the study. Subjects were first visited by the nurse for home interviews on lifestyle, health status, attitudes and knowledge about risk factors. Within 2 weeks of home visit, the participant attended a local clinic for blood sampling and anthropometric measurements. These measures included height and weight measurements as well as

the measure of waist and hip circumferences. Next, these measures were used to calculate the body mass index (BMI weight in kg divided by height in m<sup>2</sup>) and the waist to hip ratio (WHR) as indicators of obesity and fat distribution, respectively. Details on these anthropometric measurements are given elsewhere (12).

Because some persons failed to attend the clinic or didn't give fasting blood samples or because losses due to laboratory manipulations, the apo E phenotyping was performed only on sample from 525 individuals. From those, we also excluded individuals who were not of French descent, pregnant women, individuals with diabetes or thyroid dysfunction, individuals on medication for thyroid problems and hyperlipidemia. After these exclusions the final sample included a total of 435 unrelated individuals. This sample was then subdivided in four groups according to the subregion of origin of each individual within the Lac St-Jean region. The number of individuals within each of the four subregions were 101, 94, 113 and 127 for Alma, Dolbeau, Roberval, and Chibougamau respectively. Here after, these four subregions will be referred as regions.

#### Laboratory Methods

After 12 hours fast, blood samples were collected from participants, centrifuged and frozen at -40 C. The blood samples were sent to the Lipid Research Clinic (LRC) Center of St-Michael's Hospital, Toronto, for determination of blood lipids and lipoproteins. This laboratory is a LRC center certified by the NHLBI-Centers for Disease Lipid Standardization Program. Levels of total plasma cholesterol,

triglycerides and high density lipoprotein (HDL) cholesterol were measured enzymatically according to the Lipid Research Clinics Protocol (13) using a Technicon Auto-analyser II. HDL-cholesterol was measured as the cholesterol in the supernatant after precipitation of non-HDL-cholesterol. LDL-cholesterol was calculated in mmol/l, using the Friedewald formula:  $\text{LDL-cholesterol} = \text{plasma cholesterol} - (\text{HDL-cholesterol} + \text{triglycerides}/2.2)$  (14).

Apo E phenotypes were determined by the method of Mailly et al. (15). This method requires only a small amount of total plasma (20  $\mu\text{l}$ ) and is suitable for large scale phenotyping. Isoelectrofocusing (IEF) of delipidated plasma sample was performed in immobilized pH gradients (IPG) commercially prepared. After isoelectric focusing, a passive transfer to nitrocellulose was made, followed by an immunoreaction with mouse anti-apoE monoclonal antibody. After several washing steps the membrane was incubated for 1 hour with a solution containing rabbit anti-mouse IgG conjugated with peroxidase. The samples were finally developed with a freshly prepared solution containing  $\text{H}_2\text{O}_2$ , until the bands were visible. The different apoE isoforms were then identified by two independent observers.

#### Statistical Methods.

We used the statistical package for the Social Science (SPSS) to do our analysis (16). Allele frequencies were estimated using the gene counting method. Chi-square tests for heterogeneity were used to compare apo E allele among regions. Means and standard deviations for age, weight, height, waist hip ratio (WHR), body mass index

(BMI) and lipid and lipoprotein traits were determined separately for each region. The sex specific distribution of subjects in each region was determined to ensure similarities in the distribution between the four regions. Individuals whose values  $\pm 4$  SD from the mean of their respective group were excluded from the analyses. All lipid and lipoprotein values were adjusted for linear and non-linear effects of age, height, weight, BMI and WHR, using common regression equations for subjects of the sample. The effects of the apo E polymorphism on each region were measured, using the residuals from the precedent regressions.

The one way analysis of variance was used to compare lipid and lipoprotein levels among phenotypic classes. The two way analysis of variance were also performed with apo E groups, subregions and an interaction term as independent variables to test the effect of sub-region and apo E type on the dependent variables: cholesterol, LDL-C, HDL-C and TG.

The impact of apo E alleles on levels of blood lipids and lipoproteins was determined separately within each subgroup using the average excess statistics. The average excess of a given allele is defined as the average phenotypic value of individuals carrying that allele minus the overall population mean (17). Finally, the contribution of phenotypic variance ( $R^2$ ) attributable to the apo E polymorphism was estimated by the sum of squares attributable to a main effect of the apo E divided by total sum of squares  $\times 100$ .

## RESULTS

The apo E allele frequencies for each region of the Lac St-Jean area are presented in TABLE 1. As expected,  $\epsilon 3$  was the most common allele in each region. The relative  $\epsilon 3$  allele frequencies were found to be quite similar among the regions of Alma, Dolbeau and Roberval (0.752, 0.771 and 0.770) whereas the frequency of  $\epsilon 3$  allele was lower (0.713) in the Chibougamau region. The frequency of the  $\epsilon 2$  allele was found to be significantly higher ( $p < .05$ ) in the region of Chibougamau (0.181) compared to each of the other regions. Among the latter, there were no significant difference in the  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  allele frequencies. The  $\epsilon 4$  allele has the lowest frequency in each region studied and the frequencies were not different among regions. Because no significant difference was found in apo E allele frequencies among the 3 regions of Alma, Dolbeau and Roberval, we pooled these regions together and compared them to the Chibougamau region. These two regions will be subsequently referred as the Chibougamau region and the Lac St-Jean region. The apo E phenotypes distribution and allele frequencies of these 2 regions are presented in TABLE 2. The apo  $\epsilon 2$  allele frequency was significantly higher ( $p < .05$ ) in Chibougamau region (0.181) compared to the Lac St-Jean region (0.119). This difference was associated with a lower frequency of the  $\epsilon 3$  allele in the former (0.713) compared to the latter (0.765). There was no difference in the  $\epsilon 4$  allele frequencies between the two regions.

Insert tables 1 and 2 about here

Descriptive statistics of concomitants, lipid and lipoprotein traits are presented in Table 3. Means for weight and BMI were statistically different between the two subgroups. As men are usually heavier and taller than women, the higher percentage of men in the Chibougamau region (61.3% vs 50.3%) compared to the Lac St-Jean region may have a significant impact on the weight and BMI of this subgroup and can explain the observed difference between the two populations. Mean values for lipid and lipoprotein levels were similar between the two regions.

Insert table 3 about here

A common regression analysis was performed on the sample. Regressions of CHOL, LDL-C, HDL-C and TG on age, height, weight, BMI and WHR revealed that these variables contributed significantly to the variation in lipids and lipoproteins. The percentage of variance attributable to concomitants ( $R^2 \times 100$ ) ranged from 19% to 22% (data not shown).

TABLE 4 presents the adjusted lipid and lipoprotein levels among apo E phenotypes in the region of Chibougamau and the Lac St-Jean as well as the F ratios, derived from the ANOVA, associated with the effects of apo E, region and the interaction between apo E and region. Because of the rarity of some phenotypes, three apo E groups were formed for the purpose of the analysis: the Apo E2 (apo E2/E2 and E3/E2 phenotypes), the Apo E3 (apo E3/E3 phenotype), and the apo E4 (apo E4/E3 and E4/E4 phenotypes). Three individuals with the E4/E2 phenotype were excluded from the analysis. The average plasma

lipid and lipoprotein levels for each apo E group are presented for both regions. Concentrations of all lipid variables varied significantly ( $p < .05$ ) among apo E groups as indicated by F ratio ranging from 3.6 for HDL-C to 17.8 for LDL-C. In each region, individuals of the Apo E2 and the Apo E4 groups had lower and higher levels of CHOL and LDL-C, respectively, compared to individuals of the Apo E3 group carrying the most common apo E phenotype.

Concentrations of HDL-C were found to be lower in Apo E4 individuals compared to Apo E2 and Apo E3 individuals. We also observed a significant effect of apo E polymorphism on triglycerides, with higher values in individuals of the Apo E2 and Apo E4 groups compared to those of the Apo E3 group.

No significant difference in blood lipids and lipoproteins were observed between the two regions ( $0.2 \leq F \text{ ratios} \leq 1.7$ ) and the absence of a significant interaction effect indicated that the effect of apo E polymorphism on lipid and lipoprotein levels was not different among the regions of Chibougamau and the Lac St-Jean.

Insert table around 4 here

The impact of the apo E polymorphism was assessed by measuring the average excess of each apo E allele on lipid and lipoprotein variable (TABLE 5). In the population of Chibougamau, the effect of the  $\epsilon 2$  allele was to lower Chol ( $-0.254 \text{ mmol/l}$ ) and LDL-C ( $-0.347 \text{ mmol/l}$ ) levels, while the effect of the  $\epsilon 4$  allele was to raise concentrations of Chol ( $+0.329 \text{ mmol/l}$ ) and LDL-C ( $+0.307 \text{ mmol/l}$ ). In



the Lac St-Jean population, the same effect was observed, but tended to be lower for the  $\epsilon 4$  allele. For instance, the rising effect of  $\epsilon 4$  allele was more pronounced in the Chibougamau population compared to the Lac ST-Jean population for Chol (+0.329 mmol/l and +0.239mmol/l respectively) and for LDL-C (+0307 mmol/l and +0.231 mmol/l, respectively).

Compared to Chol and LDL-C, the impact of the  $\epsilon 4$  allele on HDL-C and TG appeared to be different between the two regions. For example, the lowering effect of the  $\epsilon 4$  allele was found to be about 3 times higher in the region of Chibougamau (-0.141) compared to Lac St-Jean (-0.047). The same trend was observed for triglycerides.

## DISCUSSION

Results of the present study have shown differences in relative apo E allele frequencies between different regions of the Lac St-Jean population. As shown in Figure 1, the Chibougamau region is geographically distinct from the 3 other subregions (Alma, Dolbeau, Roberval) which are located around the lake and constituting what we called here the Lac St-Jean region, and its pattern of developpement was quite different. The Saguenay-Lac St-Jean was opened to development around 1840 and from 1838 to 1911 almost 75% of the 28656 immigrants came mainly from the Charlevoix region, which is located east of Québec City (see Figure 1). The remaining 25% came mostly from other eastern regions of the province (18). Even if the immigration was diversified since 1911, the familial character of the first immigration associated with a large fecondity and a high rate of settlement contributed, to a certain extent, to a cultural homogeneity of this population, which increased from 5,000 inhabitants in 1852 to 290,000 today (19).

In contrast to Lac St-Jean, the Chibougamau region which include the cities of Chibougamau and Chapais, has been developped latter, around 1950, mainly for mining and forest industry. The workers and their families came mainly from the Lac St-Jean area (40%) and from Abitibi (40%), a region located approximatively 400 km southwest of Chibougamau. The remaining 20% came from other parts of the province of Québec. The population raised from about 4,800 inhabitants in 1961 to 10,945 today. Only 3% of the population is over 65 years old (20).

Variation at the apo E locus was observed in these two regions, but our results indicated a significantly higher frequency of the  $\epsilon 2$  allele in the region of Chibougamau compared to the region of Lac St-Jean (0.181 and 0.119 respectively). The difference was mainly attributable to a greater number of E2/E2 and E3/E2 individuals which account for 30.7% and 22.4% of the population samples of Chibougamau and Lac St-Jean, respectively (see Table 2). This regional difference is difficult to explain and might be due to the recent admixture of the population which came from different regions of the province to live in Chibougamau region and/or to a sampling variation in selecting individuals of Chibougamau, unfortunately, there is insufficient information to favor either explanation for the moment. Indeed, based on other results in Québec and Canada, the frequency of the  $\epsilon 2$  allele estimated in the Chibougamau region is among the highest ever reported. Based on 173 subjects randomly sampled from blood donors in Québec and Saguenay areas, Moorjani et al. (21) reported a frequency of 0.191 for the  $\epsilon 2$  allele. In another study based on 63 premenopausal women living around Québec city, Pouliot et al. (22) reported a frequency of 0.201 for the  $\epsilon 2$  allele. Our results on the apo E allele frequencies in the region of Chibougamau are in the same range of those reported in these two studies (21, 22) and may reflect real variation in apo E allele frequencies among different regions of the province of Québec, specially for the  $\epsilon 2$  allele. Other studies will be certainly needed to verify whether these differences are real or only due to sampling fluctuations.

Although the relative frequency of the  $\epsilon 2$  alleles were different between Chibougamau and the Lac St-Jean regions, the average CHOL,

LDL-C, HDL-C AND TG levels did not differ significantly between these populations. The influence of apo E polymorphism on serum total cholesterol and LDL-C, seen in the present study, is in agreement with what has been reported in several other population studies (4,6,8,9,23,24). Subjects of the apo E2 and Apo E4 groups had respectively lower and higher levels of serum cholesterol and LDL-C than individuals of the apo E3 group, and this was observed in both regions. Despite difference in apo E allele frequencies between the two regions, adjusted lipid and lipoprotein values for each apo E group were remarkably similar, which was confirmed by the absence of significant interaction effect between apo E and region, suggesting that there was no difference in the effect of apo E polymorphism between the two regions. Although not significant, the interaction was found to contribute more to variation in HDL-C levels ( $F$  ratio= 1.139) than in other lipid variables. Indeed, in subjects from Chibougamau, but not from Lac St-Jean, a significant difference in HDL-C levels was observed among the 3 apo E groups (from one way ANOVA, results not shown). This association of apo E polymorphism and HDL-C had never been reported so far, except in a recent study done by Srinivasan et al. (25) who reported a positive association of the  $\epsilon$ 2 allele with HDL-C levels in Blacks from USA. Also, a meta-analysis of a large number of studies showed that the HDL-C levels were significantly lower in apo E4/E3 subjects than in E3/E3 subjects (26), suggesting a possible alteration of triglyceride metabolism in apo E4/E3 subjects which is associated with lower HDL-C levels.

In most studies done so far, the apo E polymorphism had no effect on triglyceride levels (6). However, in contrast with these previous studies, we observed a significant association between triglycerides and apo E polymorphism. The subjects of the apo E2 and apo E4 groups had significantly higher triglycerides levels than their respective apo E3 group. Measures of triglyceride levels present a great variability among and within subjects and this may explain the previous unsuccessful attempts to find a clear association between triglycerides and apo E polymorphism. However, a recent meta-analysis done by Dallongeville et al. (26) demonstrated a clear association between apo E polymorphism and plasma triglyceride concentrations. Triglyceride levels were higher in subjects carrying the  $\epsilon$ 2 allele and in subjects having the E4/E3 genotype. These results are in agreement with those reported in the present study.

Our estimates of average excess of the three common alleles in Chibougamau as well as in Lac St-Jean regions are consistent with the average excess reported in previous reports. The  $\epsilon$ 2 allele was associated with lower cholesterol and LDL-C levels, whereas the  $\epsilon$ 4 allele exerted its influence in the opposite direction on cholesterol and LDL-C levels. The  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 4 allele had also a rising effect on triglycerides. Although we observed a significant difference in  $\epsilon$ 2 allele frequency among the two regions, the average excesses on Chol, LDL-C and TG levels for this allele were approximatively the same between the two regions, whereas, the difference in the magnitude of the effect of the  $\epsilon$ 4 allele on cholesterol, LDL-C, HDL-C and TG between the two subgroups, could not be attributable to a difference in allele frequency. This is in agreement with results of a

recent study which average excesses of apo E alleles were compared among 9 different populations (4). It was found that, despite wide variations in mean cholesterol levels and apo E allele frequencies among populations, the difference in the average excesses between these populations were not statistically significant (4). The effects of a given apo E allele in different populations were relatively comparable despite differences in genetic background and environmental factors.

In conclusion, we observed a marked difference in apo E allele frequencies between two geographically distinct regions of the north eastern Québec: the Chibougamau and the Lac St-Jean. Despite this important regional difference, the influence and effects exerted by the Apo E allele on several lipid and lipoprotein traits was comparable between the two populations. These findings reveal that regional differences might exist in apo E allele frequencies and that these differences might be associated with increase risk of coronary heart disease in subgroups of individuals.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from the "Fonds pour la Formation de chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR)" and from the "Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi" \*. Thanks are expressed to all nurses as well as all individuals from the Community Health Department of Roberval, the Lipid Research Laboratory, University of Toronto who were involved in data collection of the present study. The authors also wish to thank Claudia Rodriguez and Michel Tremblay of the Hyperlipidemia and Atherosclerosis Research Group, Clinical Research Institute of Montréal for Apo E phenotyping, and Camille Simard, Robin Simard and Najet Ben Yaissef for technical assistance in creating the data file.

\* Gaétane Cormier is the recipient of an FCAR fellowship;

\* Louis Pérusse is a research scholar from " le Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ).

## REFERENCES:

1. Mahley Robert W. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*. 1988; 240: 622-629.
2. Lin-Lee Y.C., Kao F.T., Cheung P., Chan L. Apolipoprotein E Gene Mapping and Expression: Localization of the Structural Gene to Human Chromosome 19 and Expression of ApoE mRNA in Lipoprotein- and Non-Lipoprotein-Producing Tissues. *Biochemistry*. 1985; 24: 3751-3756.
3. Das H.K., McPherson J., Bruns G.A.P., Karathanasis S.K., Breslow J.L. Isolation, Characterization, and Mapping to Chromosome 19 of the Human Apolipoprotein E Gene. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 6240-6247.
4. Hallman D.M., Boerwinkle E., Saha N., Sandholzer C., Menzel H.J., Császár A., Utermann G. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 338-349.
5. Gerdes L.U., Klausen I.C., Sihm I., Færgeman O. Apolipoprotein E Polymorphism in a Danish Population Compared to Findings in 45 Other Study Populations around the World. *Genetic Epidemiology* 1992; 9: 155-167.
6. Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 1-21.
7. Sing C.F. Davignon J. Role of the Apolipoprotein E Polymorphism in Determining Normal Plasma Lipid and Lipoprotein Variation. *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37: 268-285.
8. Sepehrnia B., Kamboh M.I., Adams-Campbell L.L., Bunker C.H., Nwnakwo M., Majumder P.P., Ferrell R.E. Genetic Studies of Human Apolipoproteins. X. The effect of the Apolipoprotein E Polymorphism on Quantitative Levels of Lipoproteins in Nigerian Blacks. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45: 586-591.
9. Lehtimäki T., Moilanen T., Viikari J., Åkerblom H.K., Ehnholm C., Rönkämaa T., Marniemi J., Dahlen G., Nikkari T. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6 year follow-up study. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 487-495.
10. Lehtimäki T., Moilanen T., Nikkari T., Solakivi T., Porkka K., Ehnholm C., Rönkämaa T., Åkerblom H.K., Uhari M., Nuutinen E.M., Kaprio E.A., Pesonen E., Pietikäinen M., Dahl M., Salo M.K., Viikari J. Regional Differences in Apolipoprotein E Polymorphism in Finland. *Annals of Medicine*. 1991; 23: 61-66.
11. Connelly P.W., MacLean D.R., Horlick L., O'Connor B., Petrasovits A., Little A. Plasma lipids and lipoproteins and the prevalence of risk for coronary heart disease in Canadian adults.
12. Reeder B.A., Angel A., Ledoux M., Rabkin S.W., Young K., Lamont E.S. Obesity and its relation to cardiovascular disease risk factors in Canadian adults. 1992. Canadian Heart Health Surveys Research Group.



13. Lipid and Lipoprotein Analysis: Manual of Laboratory Operation, Lipid Research Clinics Program (DHEW publ no 75-678 rev) US Dept of Health, Education, and Welfare, Washington, 1982.
14. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentration without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 1972; 18: 499-502.
15. Mailly F., Davignon J., Nestruck A.C. Analytic isoelectric focusing with immobilized pH gradients of human apolipoprotein E from very low density lipoproteins and total plasma. J. Lipid Res. 1990;31:149-155.
16. SPSS-X Users's Guide. 3rd Edition. SPSS Inc. 444 N-Michigan Ave, Chicago Illinois, 60611 Copyright 1988 by SPSS Inc.
17. Templeton AR. The general relationship between average effect and average excess. Genet Res. 1987; 49: 69-70
18. Gauvreau D., Bourque M. Mouvements migratoires et familles: le peuplement du Saguenay avant 1911. Rev. Histoire Amerique Fr. 1988; 42: 167-191.
19. Bouchard G., De Braekeler M. Histoire d'un génôme. Presses de l'Université du Québec. 1991; 607 pp.
20. Statistics Canada. Profils. Catalogue. 95-325 1991.
21. Moorjani S., Morissette J., Laberge C., et al. Apo E polymorphism in Québec population. Clin. and Invest. Med. 1987; 10(4): B51.
22. Pouliot M.C., Després J.P., Moorjani S., Lupien P.J., Tremblay A., Bouchard C. Apolipoprotein E polymorphism alters the association between body fatness and plasma lipoproteins in women. J. Lipid Res. 1990; 31:1023-1029.
23. Xu C.F., Talmud P.J., Angelico F., Del Ben M., Savill J., Humphries S.E. Apolipoprotein E Polymorphism and Plasma Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Levels in Italian Children. Genetic Epidemiology. 1991; 8: 389-398.
24. Xhignesse M., Lussier-Cacan S., Sing C.F., Kessling, A.M., Davignon J. Influences of Common Variants of Apolipoprotein E on Measures of Lipid Metabolism in a Sample Selected for Health. Arteriosclerosis and Thrombosis. 1991; 11:1100-1110.
25. Srinivasan S.R., Ehnholm C., Wattigney W., Berenson G.S. Apolipoprotein E Polymorphism and Its Association With Serum Lipoprotein Concentrations in Black Versus White Children: The Bogalusa Heart Study. Metabolism. 1993; 42: 3, 381-386.
26. Dallongeville J., Lussier-Cacan S., Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. J. Lipid Research 1992; 33: 447-454.

**TABLE 1:**

Relative Frequencies of the Three Common Apolipoprotein E Alleles  
in Sample of four different regions of Lac St-Jean Area.

<b>Regions</b>	<b>ALLELES</b>			
	<b><i>N</i></b>	<b><math>\epsilon 2</math></b>	<b><math>\epsilon 3</math></b>	<b><math>\epsilon 4</math></b>
Alma	101	0.134	0.752	0.109
Dolbeau	94	0.117	0.771	0.112
Roberval	113	0.106	0.770	0.106
Chibougama	127	0.181	0.713	0.106
<b>Total</b>	<b>435</b>	<b>0.137</b>	<b>0.749</b>	<b>0.114</b>

**TABLE 2:**

Apo E phenotypes and allele frequencies in Chibougamau and Lac St-Jean regions.

	Chibougamau		Lac St-Jean*		Whole sample	
<b>Phenotypes</b>	N	%	N	%	N	%
E2/E2	6	4.7%	2	.6%	8	1.8%
E3/E2	33	26%	67	21.8%	100	23%
E4/E2	1	.8%	2	.6%	3	.7%
E3/E3	64	50.4%	169	54.9%	233	53.6%
E4/E3	20	15.7%	66	21.4%	86	19.8%
E4/E4	3	2.4%	2	.6%	5	1.15%
Total	127		308		435	
<b>Allele frequencies</b>						
ε2	0.181		0.119		0.137	
ε3	0.713		0.765		0.749	
ε4	0.106		0.117		0.114	

\* Lac St-Jean: Values from regions of Alma, Dolbeau and Roberval pooled together.

**TABLE 3:**

Descriptive Statistics of the Chibougamau and Lac St-Jean sample.\*

Total (n= 435)	Chibougamau (n= 127)	Lac St-Jean (n= 308)
Variables	n (%)	n (%)
Males	78 (61.4%)	155 (50.3%)
Females	49 (38.6%)	153 (49.7%)
Age (years)	41.46 ± 16.72	44.31 ± 17.23
Weight (kg)	72.51 ± 16.21	66.89 ± 12.97†
Height (cm)	166.19 ± 9.23	165.31 ± 8.98
Waist/hip ratio	.87 ± .09	.84 ± .09
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.16 ± 5.15	24.42 ± 4.05†
<b>Lipids ‡</b>		
T-Chol	5.08 ± .98	5.15 ± .98
LDL-C	3.06 ± .88	3.17 ± .84
HDL-C	1.28 ± .29	1.31 ± .31
Triglycerides	1.61 ± .86	1.49 ± .78

\* Lac St-Jean: values from regions of Alma, Dolbeau and Roberval pooled together.

‡All values are means ± standard deviation and are expressed in mmol/L

BMI, body mass index; CHOL, cholesterol; LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins.

† (p ≤ .01) significant difference between the two regions.

**TABLE 4:**Plasma lipid and lipoprotein levels among apo E groups by region<sup>(a)</sup>

VARIATION REGION	APO E GROUPS			F RATIOS		
	Apo E2 (39,69) <sup>(b)</sup>	Apo E3 (64,169)	Apo E4 (23,68)	Apo E	Region	Interaction
TOTAL CHOLESTEROL						
CHIBOUGAMAU	4.79 ± .73	5.15 ± .81	5.36 ± .86	10.3**	0.2	0.06
LAC ST-JEAN	4.87 ± .87	5.16 ± .82	5.39 ± .96			
LDL-C						
CHIBOUGAMAU	2.73 ± .66	3.16 ± .76	3.36 ± .73	17.8**	0.7	0.2
LAC TS-JEAN	2.82 ± .72	3.22 ± .75	3.40 ± .78			
HDL-C						
CHIBOUGAMAU	1.34 ± .25	1.37 ± .26	1.20 ± .22	3.57*	1.73	1.14
LAC ST-JEAN	1.28 ± .26	1.31 ± .28	1.25 ± .29			
TRIGLYCERIDES†						
CHIBOUGAMAU	1.52 ± .73	1.36 ± .66	1.72 ± .79	6.94*	.19	0.62
LAC ST-JEAN	1.66 ± .83	1.38 ± .63	1.58 ± .69			

a) values are means  $\pm$  SD and expressed in mmol/l after adjustment for concomitants as described in materials

b) number of subjects in the Chibougamau and Lac St-Jean regions, respectively

\*\*  $p \leq 0.000$  \*  $p \leq 0.05$  † transformation in neperien logarithm before regression.

LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins.

**TABLE 5:**

Average excesses of the three common ApoE alleles for lipid and lipoprotein traits in the regions of Chibougamau and Lac St-Jean. ■

		ALLELES		
Variables: (mmol/l) *		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
<b>Chibougamau</b>	frequency	.1811	.7125	.1062
Total Cholesterol		-0.254	+0.021	+0.329
LDL-C		-0.347	+0.040	+0.307
HDL-C		-0.004	+0.016	-0.141
Triglycerides		+0.163	-0.085	+0.321
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
<b>Lac St-Jean</b>	frequency	.1185	.7646	.1169
Total Cholesterol		-0.230	-0.002	+0.239
LDL-C		-0.318	+0.013	+0.231
HDL-C		-0.008	+0.007	-0.047
Triglycerides		+0.186	+0.041	+0.088

- Lac St-Jean: values from regions of Alma, Dolbeau and Roberval pooled together.  
 Average excess values are in mmol/L.  
 LDL-C, cholesterol associated with low density lipoproteins; HDL-C, cholesterol associated with high density lipoproteins.  
 \* values are adjusted for age, BMI, WHR, height and weight.

## LES CONCLUSIONS

Ayant observé une surmortalité par maladies cardiovasculaires dans la région du Lac St-Jean Chibougamau, la présente recherche avait pour but d'examiner si les fréquences alléliques de l'apolipoprotéine E étaient différentes de celles rapportées dans d'autres populations, et de voir si l'impact exercé sur le profil lipidique de cette population rendait celle-ci plus à risque de développer une MCV.

Dans notre étude, les fréquences de l'apolipoprotéine E ont été déterminées sur un échantillon de 435 personnes. On a constaté que la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  était plus élevée dans notre population que dans les autres populations caucasiennes; de plus les femmes présentaient une fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$  plus élevée que les hommes. Les études précédentes faites dans différentes populations avaient associé l'allèle  $\epsilon 4$  à un risque plus élevé de MCV parce que l'allèle  $\epsilon 4$  a pour effet d'augmenter les niveaux moyens de cholestérol. En effet, dans les populations où la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  était élevée, l'incidence de MCV était plus élevée (Lehtimäki et al. 1991). Quant à l'allèle  $\epsilon 2$ , on lui avait plutôt attribué un effet protecteur parce qu'elle a comme effet d'abaisser les niveaux moyens de cholestérol.

Dans notre échantillon, la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  n'est pas plus élevée que celles des autres populations caucasiennes; on ne peut donc l'associer à un risque accru de MCV dans notre population par rapport aux autres populations. Par contre, notre échantillon présente une fréquence plus élevée de l'allèle  $\epsilon 2$  associée de façon significative à des niveaux plus élevés de triglycérides chez les hommes et chez les femmes ménopausées.

L'allèle  $\epsilon 4$  est également associé significativement à des niveaux plus élevés de triglycérides chez les hommes. Or, dans l'étude de Nieminen et al. (1992), en plus du cholestérol et des LDL-C, les concentrations moyennes de VLDL-TG sont significativement plus élevées chez les patients (CAD+) que chez les contrôles, ce qui suggère une association entre des triglycérides élevés et la maladie coronarienne. De plus, dans l'analyse discriminante, les auteurs ont montré que, chez les hommes, les VLDL-TG apparaissaient comme étant un discriminant significatif de la maladie coronarienne entre les patients et les contrôles, tandis que chez les femmes, les TG apparaissaient comme étant le seul discriminant significatif. En effet, les données récentes renforcent l'idée que des TG élevés apparaissent comme étant un facteur de risque indépendant de la maladie coronarienne (Austin et al. 1991. pour une revue) De nouvelles analyses provenant de l'étude de Framingham (Framingham Heart Study) ont montré que la maladie coronarienne était associée à des niveaux de TG élevés. En effet, l'incidence de maladie coronarienne augmente significativement avec l'augmentation des niveaux de triglycérides. De plus, en stratifiant les niveaux de HDLs, l'incidence de maladie coronarienne apparaît la plus élevée dans les cas où les TG sont plus élevés que 1.57 mmol/l et les HDLs plus bas que 1.03 mmol/l (Castelli et al. 1992 pour une revue). Au niveau métabolique, la présence de TG élevés ( $TG > 1.57$  mmol/l) associés à un bas niveau de HDLs ( $HDL < 1.03$  mmol/l) serait le reflet d'une anomalie dans le métabolisme des VLDLs, anomalie qui se traduirait par l'apparition de VLDLs plus denses (Sf 12-60) ( $\beta$ VLDLs), par la présence de LDL denses (de patron B), tous deux très athérogéniques, et par une anomalie dans les activités de transfert entre les HDLs et les VLDLs. Il a été démontré que les  $\beta$ VLDLs sont facilement capter par les macrophages et que les LDLs denses sont significativement associés à une augmentation



des triglycérides (Austin M. 1991). Or, dans notre échantillon, l'apo E2 a pour effet d'augmenter significativement le niveau moyen de triglycérides par rapport au groupe Apo E3 chez les hommes et les femmes ménopausées; ainsi, l'effet exercé par l'apo E2 pourrait contribuer à augmenter le risque de développement d'athérosclérose du fait que l'isoforme E2 a une mauvaise capacité de liaison avec les récepteurs spécifiques de l'apo E, ce qui a pour effet de ralentir l'élimination des résidus de chylomicrons et de VLDLs de la circulation plasmatique. De plus, l'isoforme E2 interfèrerait aussi dans le processus de lipolyse des VLDLs (Gregg et al. 1984; Ehnholm et al. 1984). Les sujets du groupe Apo E4, surtout les hommes, en plus d'avoir des niveaux de Chol et de LDL-C plus élevés, ont également des niveaux de TG plus élevés et des niveaux de HDLs plus bas que les sujets du groupe Apo E3. Basé sur certaines observations, Dallongeville et al. (1992) ont proposé que l'isoforme E4, qui est préférentiellement associée aux VLDLs (Steinmetz et al. 1989), interfèrerait aussi au niveau des activités de la lipoprotéine lipase et/ou au niveau du processus d'élimination des résidus des TG ce qui amènerait un délai dans la lipolyse des TG et dans l'élimination des TG du plasma.

En général, les particules de VLDLs contiennent moins de cholestérol que les LDLs, mais à partir du moment où les concentrations de TG augmentent à plus de 1.7 mmol/l, et que les HDLs sont bas, la proportion de VLDLs et de LDLs denses augmente dans le plasma (Castelli et al. 1992). Comme ceux-ci sont très athérogéniques, les hommes et les femmes ménopausées possédant l'apo E2, ayant des TG élevés et des HDLs bas pourraient être plus à risque de développer une maladie coronarienne. De plus, comme l'allèle  $\epsilon 4$  a déjà été proposé comme facteur de risque de la maladie coronarienne en vertu de son effet sur les niveaux de cholestérol, les

individus possédant le phénotype E4/E3, seraient davantage à risque du fait qu'ils ont aussi tendance à avoir des niveaux de HDLs plus bas et des niveaux de triglycérides plus élevés.

Il semble de plus en plus évident les isoformes E2 et E4 perturbent les activités normales du métabolisme des lipides et que ces altérations peuvent avoir un rapport avec le développement de la maladie coronarienne. Comme dans notre échantillon, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle  $\epsilon 2$ , une plus grande proportion de personnes dans la population pourrait être plus à risque de développer de l'hypertriglycémie, et serait finalement plus à risque aussi de développer la maladie coronarienne.

## RÉFÉRENCES

1. Abbott R.D., Carroll F.R. Interpreting multiple logistic regression coefficients in prospective observational studies. *Am. J. Epidemiol.* 1984; 119: 830-836.
2. Austin M. Plasma Triglyceride and Coronary Heart Disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis.* 1991; 11: 2-14
3. Blakenhorn D.H., Nessim S.A., Jonhson R.L., Sanmarco M.E., Azen S.R., Hemphill L. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA.* 1987; 257, 3233-3240.
4. Boerwinkle E., Brown S.A., Rohrbach K., Gotto A.M., Patsch W. Role of Apolipoprotein E and B Gene Variation in Determining Response of Lipid, Lipoprotein and Apolipoprotein Levels to Increased Dietary Cholesterol. *Am. J. Hum Genet.* 1991, 1991 49, 1145-1154.
5. Boerwinkle E., Utermann G. Simultaneous Effects of the Apolipoprotein E Polymorphism on Apolipoprotein E, Apolipoprotein B, and Cholesterol Metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 1988, 42, 104-112.
6. Borghini I., James R. W., Blatter M-C., Pometta D. Distribution of apolipoprotein E Between free and A-II complexed forms in very-low- and high-density lipoproteins: functional implications. *Biochimica and Physica Acta.* 1991; 1083: 139-146.
7. Bouchard C., Veillette S., Perron M., Hébert G. Les causes de mortalité au Saguenay, 1969-1983, DSC de Chicoutimi, le Groupe Ecobes, décembre 1989, 79 pages.
8. Bouthillier D., Sing C.F., Davignon J. Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method: application to the study of informative matings. *J. Lipid Res.* 1983; 24: 1060-1069.
9. Brenninkmeijer B.J., Stuyt P.M., Demacker P.N., Stalenhoef A.F., van't Laar A. Apo E polymorphism and lipoproteins in coronary artery disease and peripheral vascular disease. *Arteriosclerosis.* 1984; 4: 542a.
10. Brown M.S., Goldstein J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage. Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1983; 52: 223.
11. Brunzell J.D., Schrott H.G., Motulsky A.G., Bierman E.L. Myocardial infarction in the familial forms of hypertriglyceridemia. *Metabolism.* 1976; 25: 313-320.
12. Castelli W.P. Cardiovascular disease and multifactorial risk: Challenge of the 1980s. *Am. Heart J.* 1983; 106: 1191-1200.
13. Castelli W.P. Epidemiology of Triglycerides: A View from Framingham. *Am. J. Cardiol.* 1992; 70: 3H-9H.

14. Connor W.E., Connor S.L. Dietary cholesterol and fat and the prevention of coronary heart disease: risks and benefits of nutritional change. In Diet and Prevention of Heart Disease and Cancer. Hallgren B. Levin O. Rossner A. and Vessby B. Editors Raven Press New York. 1986. 113-117.
15. Cumming A., Robertson F.W. Polymorphism at the Apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease. Clinical Genetic 1984; 25: 310-313.
16. Dallongeville J., Lussier-Cacan S., Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. J. Lipid Research 1992; 33: 447-454.
17. Dallongeville J., Roy M., Leboeuf N., Xhignesse M., Davignon J., Lussier-Cacan S. Apolipoprotein E Polymorphism Association with Lipoprotein Profile in Endogenous Hypertriglyceridemia and Familial Hypercholesterolemia. Arteriosclerosis and Thrombosis. 1991; 11: 272-278.
18. Davignon J., Gregg R.E., Sing C.F. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. Arteriosclerosis. 1988; 8: 1-21.
19. De Knijff P., Stalenhoef A.F.H., Mol M.J.T.M., Leuven J.A.G., Smit J., Erkelens D.W., Schouten J., Frants R.R., Havekes L.M. Influence of Apo E polymorphism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 1990; 83: 89-97.
20. Ehnholm C., Lukka M., Kuusi T., Nikkilä E., Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. J. Lipid Res. 1986; 27: 227-235.
21. Ehnholm C., Mahley D.A., Chappell K.H., Weisgraber E., Ludwig E., Witztum J.L. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of  $\beta$ -very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 5566-5570.
22. Eichner J.E., Kuller L.H., Ferrell R.E., Meilahn E.N., Kamboh M.I. Phenotypic Effects of Apolipoprotein Structural Variation on Lipid Profiles. III. Contribution of Apolipoprotein E Phenotype to Prediction of Total Cholesterol, Apolipoprotein B, and Low Density Lipoprotein Cholesterol in the Healthy Women Study. Arteriosclerosis. 1990; 10: 379-385.
23. Eisenberg S. Lipoprotein Abnormalities in hypertriglyceridemia: Significance in Atherosclerosis. Am. Heart J. 1987; 113: 555-560.
24. Eto M., Sato T., Watanabe K., Iwashima Y., Makino I. Effects of probucol on plasma lipids and lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients with and without apolipoprotein E4. Atherosclerosis. 1990; 84:49-53.
25. Fiscal Year 1983, Fact Book, National, Heart, Lung and Blood Institute, (NIH) Bethesda, Maryland, October, 1983.
26. Fisher E.A., Coates P.M., Cortner J.A. Gene polymorphism and variability of human apolipoproteins. Am. Rev. Nutr. 1989; 9: 139-160.

27. Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H., The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine*. 1992; 326 (4): 242-250.
28. Gerdes L.U., Klausen I.C., Sihm I., Faergeman O. Apolipoprotein E Polymorphism in a Danish Population Compared to Findings in 45 Other Study Populations Around the World. *Genetic Epidemiology*. 1992; 9: 155-167.
29. Ghiselli G., Schaefer, E.J., Zech L.A., Gregg, R.E., Brewer H.B. Increased Prevalence of Apolipoprotein E4 in Type V Hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 1982; 70: 474-477.
30. Gotto A.M., LaRosa J.C., Hunninghake D., Grundy SM., Wilson P.W., Clarkson T.B., Hay J.W., Goodman D.S. The Cholesterol Facts. A Summary of the Evidence Relating Dietary Fats, Serum Cholesterol, and Coronary Heart Disease. *Circulation*. 1990; 81: 1721-1733.
31. Gregg R.R., Zech L.A., Schaefer E.J., Brewer H.B. Apolipoprotein E metabolism in normolipoproteinemic human subjects. *J. Lipid Research* 1984; 25: 1167-1176.
32. Gregg R.E., Zech L.A., Schaefer E.J., Stark D., Wilson D., Brewer H.B. Abnormal In Vivo Metabolism of Apolipoproteins E4 in Humans. *J. Clinical Invest.* 1986; 78: 815-821.
33. Hallman D.M., Boerwinkle E., Saha N., Sandholzer C., Menzel H.J., Császár A., Utermann G. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 338-349.
34. Hanis C.L., Hewett-Emmett D., Douglas T.C., Bertin T.K., Schull W.J. Effects of the Apolipoprotein E Polymorphism on Levels of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 362-370.
35. Hegele R.A., Breckenridge W.C., Cox D.W., Maguire G. F., Little J.A., Connelly P.W. Interaction Between Variant Apolipoproteins C-II and E That Affects Plasma Lipoprotein Concentrations. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991; 11: 1303-1309.
36. Hixson J.E. and the PDAY Research Group. Apolipoprotein E polymorphisms Affect Atherosclerosis in Young Males. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 1237-1244.
37. Jorde L.B., Williams R.R., Relation Between Family History of Coronary Artery Disease and Coronary Risk Variables. *Am. J. Cardiol.* 1988; 62: 708-713.
38. Kannel W.B. Hypertension and others risk factors in coronary heart disease. *Am. Heart J.* 1987; 114: 918-925.
39. Kannel W.B. Update on the role of cigarette smoking in coronary artery disease. *Am. Heart J.* 1981; 101: 319-328.

40. Kannel W.B., Thomas H.E., Kjelsberg M.O. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 32,548 men screened for the MRFIT. *Am. Heart J.* 1986; 112, 825-836.
41. Kaprio J., Ferrell R., Kottke B.A., Sing C. Effects of Polymorphisms in Apolipoproteins E, A-IV, and H on Quantitative Traits Related to Risk for Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis.* 1991; 11: 1330-1348.
42. Katan M.B., Beynen A.C., DeVries J.H.M., Nobels A. Existence of consistent hypo- and hyper-responders to dietary cholesterol in man. *Am. J. Epidemiology* 1986; 123: 221-234.
43. Kesäniemi Y.A., Ehnholm C., Miettinen T.A. Intestinal Cholesterol Absorption Efficiency in Man is related to Apoprotein E Phenotype. *J. Clinical Invest.* 1987; 80: 5787-581.
44. Keys A., Menotti A., Karvonen M.J., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Djordjevic B.S., Dontas A.S., Fidanza F., Keys M.F., Kromhout D., Nedeljkovic S., Punsar S., Seccareccia F., Toshima H. The diet and 25-year death rate in the seven countries. *Am. J. Epidemiol.* 1986; 124: 903-914.
45. Kuusi T., Nieminen M.S., Ehnholm C., Yhi-Järvinen H., Valle M., Nikkilä E. A., Taskinen M-R. Apoprotein E polymorphism and Coronary Artery Disease. Increased Prevalence of Apolipoprotein E-4 in Angiographically Verified Coronary Patients. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 237-241.
46. Lapierre R. La mortalité sur le territoire du DSC de Roberval. 1979-83. DSC de Roberval. Mars 1990.
47. Lapierre R. La mortalité sur le territoire du DSC de Roberval. 1984-1988. DSC de Roberval. Mai 1992.
48. Larsson Bo. Obesity, fat distribution and cardiovascular disease. *Intern. J. of Obesity.* 1991; 15: 53-57.
49. Lehtimäki T., Moilanen T., Viikari J., Åkerblom H.K., Ehnholm C., Rönemaa T., Marniemi J., Dahlen G., Nikkari T. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectionnal and 6-year follow-up study. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 487-495.
50. Lenzen H.J., Assmann G., Buchwalsky R., Schulte H. Association of Apolipoprotein E Polymorphsim, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Coronary Artery Disease. *Clin. Chem.* 1986; 32/5: 778-781.
51. Lipids Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary primary prevention study II. The relationship of reduction of incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA.* 1984; 251: 365-374.
52. Mahley R.W., Innerarity T.L. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983; 737: 197.
53. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C., Weisgraber K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.* 1984; 25: 1277-1294.

54. Mahley R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*. 1988; 240: 622-629.
55. Manninen V. Clinical results with gemfibrozil and background for the Helsinki Study. *Am. J. Cardiol.* 1983; 52: 35B-38B.
56. Mänttari M., Koskinen P., Ehnholm C., Huttunen J. K., Manninen V. Apolipoprotein E polymorphism Influences the Serum Cholesterol Response to Dietary Intervention. *Metabolism*. 1991; 40: 217-221.
57. Menzel H-J., Kladetzky R-G., Assmann G. Apolipoprotein E Polymorphism and Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 310-315.
58. Miettinen T.A., Gylling H., Vanhanen H. Serum cholesterol Response to Dietary Cholesterol and Apoprotein Phenotype. *Lancet*. 1988; Nov. p. 1261.
59. Nestruck A.C., Bouthillier D., Sing C.F., Davignon J. Apolipoprotein E Polymorphism and Plasma Cholesterol Response to Probucol. *Metabolism*. 1987; 36: 743-747.
60. Nicholls E., Nair C., MacWilliam L., Moen J., Mao Y., Cardiovascular Disease Mortality in Canada, Statistics Canada, Catalogue 77: 285-290, Ottawa 1988.
61. Nieminen M.S., Mattila K.J., Aalto-Setälä K., Kuusi T., Kontula K., Kauppinen-Mäkelin R., Ehnholm C., Jauhiainen M., Valle M., Taskinen M-R. Lipoproteins and Their Genetic Variation in Subjects With and Without Angiographically Verified Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1992; 12: 58-69.
62. Pedersen J.C., Berg K. Interaction between low density lipoprotein receptor (LDLR) and apolipoprotein E (apo E) alleles contributes to normal variation in lipid level. *Clinical Genetics*. 1989; 35: 331-337.
63. Rall S.C., Weisgraber K.H. Mahley R.W. Human Apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 4171-4178.
64. Reardon M.F., Nestel P.J., Craig I.H., Harper R.W. Lipoprotein predictors of the severity of coronary artery disease in men and women. *Circulation*. 1985; 71: 881-888.
65. Robertson T.L., Kato H., Rhoads G.G., Kagan A., Marmot M., Syme S.L., Gorgon T., Worth R. M., Belsky J.L., Dock D.S., Miyanishi M., Kawamoto S. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Incidence of Myocardial Infarction and Death From Coronary Heart Disease. *Am. J. Cardiol.* 1977; 39: 239-243.
66. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *New England J. of Medicine*. 1986; 314: 488-500

67. Savolainen M.J., Rantala M., Kervinen K., Järvi L., Suvanto K., Rantala T., Kesäniemi Y.A. Magnitude to dietary effects on plasma cholesterol concentration: role of sex and apolipoprotein E phenotype. *Atherosclerosis*. 1991; 86: 145-152.
68. Sepehrnia B., Kamboh M.I., Adams-Campbell L.L., Bunker C.H., Nwnakwo M., Majumder P.P., Ferrell R.E. Genetic Studies of Human Apolipoproteins. X. The effect of the Apolipoprotein E Polymorphism on Quantitative Levels of Lipoproteins in Nigerian Blacks. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45: 586-591.
69. Sing C.F., Boerwinkle E., Moll P.P., Templeton A.R. Characterization of Genes Affecting Quantitative Traits in Humans. Proceedings of the second international conference in Quantitative Genetics. Editors: Weir B.S., Eisen E.J., Goodman M.M., Namkoong G. Publishers: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 1988; 250-269.
70. Sing, C.F., Davignon J. Role of the Apolipoprotein E Polymorphism in Determining Normal Plasma Lipid and Lipoprotein variation. *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37: 268-285.
71. Sopko G., Obarzanek E., Stone E. Overview of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on physical activity and cardiovascular health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1992; 24: S192-S195.
72. Steinmetz A., Jakobs C., Motzny S., Kaffarnik H. Differential Distribution of Apolipoprotein E Isoforms in Human Plasma Lipoproteins. *Arteriosclerosis*. 1989; 9: 405-411.
73. Stein E.A. Lipids Lipoproteins, and Apolipoproteins. *Fundamentals of Clinical Chemistry* 3<sup>rd</sup> edition. Editor: Tietz N. W. Publisher: WB Saunder Company. 1987. chap. 14 448-480.
74. Stuyt P.M.J., Brenninkmeijer B.J., Demacker P.N.M., Hendriks J.C.M. Van Elteren P., Stalenhoef A.F.H., Van't Laar A. Apolipoprotein E phenotypes, serum lipoproteins and apolipoproteins in angiographically assessed coronary heart disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1991; 51: 425-435.
75. Templeton AR. The general relationship between average effect and average excess. *Genet Res.* 1987; 49: 69-70.
76. Tikkanen M.J., Huttunen J.K., Ehnholm C., Pietinen P. Apolipoprotein E4 Homozygosity Predisposes to Serum Cholesterol Elevation during High Fat Diet. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 285-288.
77. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Ame. Heart J.* 1987; 113: 433-440.
78. Utermann G., Hardewig A., Zimmer F. Apo E phenotypes in Patients with myocardial infarction. *Hum. Genet.* 1984; 65: 237-241.
79. Utermann G., Hees M., Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature*. 1977; 269: 604-607.
80. Utermann G., Kindermann I., Kaffarnik H., Steinmetz A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum. Genet.* 1984; 64: 232-236.



81. Utermann G., Pruin N., Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipoprotein metabolism. *Clin. Genet* 1979; 15: 63-72.
82. Utermann G., Steinmetz A., Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum. Genet.* 1982; 60: 344-351.
83. van Bockxmeer F.M., Mamotte C.D.S. Apolipoprotein E4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 340: 879-880.
84. Weintraub M.S., Eisenberg S., Breslow J.L. Dietary Fat Clearance in Normal Subjects is Regulated by Genetic Variation in Apolipoprotein E. *J. Clinical Invest.* 1987; 80: 1571-1577.
85. Xhignesse M., Lussier-Cacan S., Sing C.F., Kessling, A.M., Davignon J. Influences of Common Variants of Apolipoprotein E on Measures of Lipid Metabolism in a Sample Selected for Health. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1991; 11: 1100-1110.
86. Xu C.F., Boerwinkle M.J., Huttunen J.K., Humphries S.E., Talmud P.J. Genetic Variation at the Apolipoprotein Gene Loci Contribute to Response of Plasma Lipids to Dietary Change. *Genetic Epidemiology* 1990; 7: 261-275.
87. Xu C.F., Talmud P.J., Angelico F., Del Ben M., Savill J., Humphries S.E. Apolipoprotein E Polymorphism and Plasma Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Levels in Italian Children. *Genetic Epidemiology*. 1991; 8: 389-398.
88. Yagani H., Shimakura Y., Yamanouchi Y., Watanabe Y., Tsuchiya S., Hamaguchi H. Association of hypercholesterolemia and apolipoprotein E4 in school children. *Clinical Genetics*. 1990; 38: 264-269.
89. Zannis V.I., Breslow J.L. Human Very Low Density Lipoprotein Apolipoprotein E Isoprotein Polymorphism Is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification. *Biochemistry*. 1981; 20: 1031-1041
90. Zannis V.I., Just P.W., Breslow J.L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Genet.* 1981; 33: 11.