

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE**

PCSK9 : REGULATION ET IMPLICATION DANS LE SYNDROME METABOLIQUE
--

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de Biologie/Santé
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Nutrition et métabolisme

Présentée et soutenue publiquement par

Sanae KOURIMATE

Le 19 décembre 2008, devant le jury ci-dessous

Président	Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard, Université de Nantes
Rapporteurs	Monsieur le Docteur Thierry Pineau, INRA, Toulouse Monsieur le Docteur A. Majid Khatib, INSERM, Paris
Examineur	Monsieur le Docteur Nicolas Ancelin, GSK, les Ulis
Directeurs de Thèse	Monsieur le Professeur Patrick Nguyen, ENVN, Nantes Monsieur le Docteur Philippe Costet INSERM, Nantes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
Avant propos	11
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
Chapitre 1. Le Métabolisme des Lipides	14
I. Les lipids	14
I.1. Quelques definitions	14
I.2. Le cholestérol	14
I.3. Les apolipoprotéines : exemple de l'apolipoprotéine B	15
I.4. Les lipoprotéines	16
I.4.1. Structure et classification des Lipoprotéines	16
I.4.2. Le métabolisme des lipoprotéines	18
I.5. L'athérosclérose	21
II. Les dyslipidémies	21
II.1. Définitions	21
II.2. Les hypercholestérolémies familiales	22
II.2.1. Historique	22
II.2.2 Transmission génétique et prévalence	23
II.2.3. Manifestations cliniques	23
II.2.4 Traitements des FH par les statines	23
II.3. Le syndrome métabolique et le diabète	25
II.3.1. Définition du Syndrome Métabolique	25
II.3.2. Définition du diabète	25
Chapitre 2. Les proproteines convertases	27
I. Généralités sur les Proprotéines Convertases	27
I.1 Introduction	27
I.2. Structure générale des PCs	28
I.3. Classifications des PCs	30
I.3.1. Distribution tissulaire des PCs	30
I.3.2. Distribution cellulaire des PCs	30
II. Maturation des PCs : exemples de la furine et de PC5/6	31
II.1. La furine	31
II.2. PC5/6	
III. PCSK9	32
III.1. Du gène à la protéine	32
III.2. Domaines protéiques et cristallographie de PCSK9	33
III.2.1. Domaines protéiques	33
III.2.2. Structure cristallographique	35
III.2.1.1 Le prodomaine : peptide inhibiteur de l'activité catalytique de PCSK9	35
III.2.1.2. Le domaine catalytique	37
III.2.1.3. Le domaine C-terminal ou CHRD ou V-domain	37

III.3. Activité autocatalytique de PCSK9	39
III.4. PCSK9 : une protéine circulante	40
III.5. Mode d'action de PCSK9 sur le LDLR	41
III.5.1. Rappels sur le LDLR	41
III.5.1.1. Du gène à la protéine	41
III.5.1.2 Transport intracellulaire du LDLR et liaison aux particules à apoB etE	41
III.5.2. PCSK9 entraîne la dégradation du LDLR	43
III.5.2.1. Evidences expérimentales in vitro, in vivo	44
III.5.2.2. PCSK9 se lie au domaine extracellulaire du LDLR	44
III.5.2.3. Mécanismes de la dégradation du LDLR par PCSK9	46
III.6. PCSK9 et les autres récepteurs de la famille du LDLR	48
III.7. PCSK9 et la production d'apolipoprotéines B	49
III.8. Implication de PCSK9 dans la dégradation de BACE1	49
III.9. Mutations de PCSK9	50
III.9.1. Mutations gain de fonction :	51
III.9.2. Mutations perte de fonction	52
 Chapitre 3 : Régulation de PCSK9	 55
I. Les récepteurs nucléaires	55
I.1 Principe général de la signalisation par les récepteurs nucléaires	55
I.2. Historique de la découverte des récepteurs nucléaires	56
I.3. Structure générale des récepteurs nucléaires	57
I.4. Mécanisme général de la régulation des gènes par les récepteurs nucléaires	58
I.5. Régulation des gènes par les Peroxysome Proliferator Activated Receptors (PPARs)	59
I.5.1. les PPARs	59
I.5.2. PPAR α	60
I.5.2.1 Rôle dans le métabolisme des lipides	60
I.5.2.2. Rôle dans l'inflammation	61
I.5.3. Les principaux rôles des autres PPARs : PPAR β/δ et PPAR γ	61
I.6. Régulation de gène par les LXRs	61
I.6.1. Généralités	61
I.6.2. Rôles des LXRs	62
I.6.2.1. Rôle dans l'homéostasie du cholestérol	62
I.6.2.2. Rôle dans l'homéostasie lipidique	62
I.6.2.3. Rôle dans l'homéostasie glucidique	63
II. La famille des SREBPs	63
II.1. Généralités	63
II.2. Rôle des SREBPs	63
III. Régulation de PCSK9	64
III.1. Régulation par le cholestérol : mode d'action des SREBPs	64
III.2. Régulation par le statut nutritionnel	66
TRAVAUX PERSONNELS	67
Présentation du travail	68
I. Etude de régulation de PCSK9, la furine et PC5/6A par les fibrates	70
I.1 Introduction	70
I.2 Article Numéro 1:	71
I.3. Discussion et conclusion	80
II. Mise au point d'un test de mesure de l'activité autocatalytique de PCSK9 par	84

méthode fluorométrique	
II.1 Introduction	84
II.2 Article Numéro 2 :	86
II.3 Discussion et conclusion	107
III. PCSK9 : un nouveau lien moléculaire dans l'insulinorésistance et les dyslipidémies ?	108
III.1. Introduction	108
III.2. Résultats	109
III.2.1. le modèle d'insulinorésistance d'origine nutritionnelle	109
III.2.2. Le modèle de diabète de type 1	111
III.3. Conclusion	114
IV. Articles annexes : participation à d'autres travaux de recherche du laboratoire	115
Perspectives et conclusion générale	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Structure moléculaire du cholestérol.	15
Figure 2	Représentation schématique d'une lipoprotéine	16
Figure 3	Voie exogène du métabolisme des lipoprotéines	19
Figure 4	Voie endogène du métabolisme des lipoprotéines	20
Figure 5	Biosynthèse du cholestérol et mode d'action des statines	24
Figure 6	Classification des protéases, focus sur la famille des PCs	27
Figure 7	Représentation schématique des proprotéines convertases	29
Figure 8	Localisation Subcellulaire des PCs	30
Figure 9	Expression de PCSK9 par Northern Blot dans différents organes chez le rat	32
Figure 10	Structure schématique de PCSK9	34
Figure 11	Structure cristallographique de PCSK9	35
Figure 12	Interaction du prodomaine avec le domaine catalytique de PCSK9	36
Figure 13	Le domaine C-terminal de PCSK9	38
Figure 14	Structure du LDLR: changement de conformation dépendant du pH	42
Figure 15	Dégradation post-transcriptionnelle du LDLR médiée par PCSK9	43
Figure 16	PCSK9 se lie à l'EGF-A du LDLR et bloque le repliement en épingle à cheveux du LDLR	45
Figure 17	Représentation schématique des voies de dégradation du LDLR par PCSK9	47
Figure 18	PCSK9 : implication dans la prise en charge de la forme non acétylée de BACE1	50
Figure 19	Mutations de PCSK9	51
Figure 20	Principe générale de la signalisation par les récepteurs nucléaires	55
Figure 21	La superfamille des récepteurs nucléaires	56
Figure 22	Structure générale des Récepteurs Nucléaires	57
Figure 23	Formation de complexes co-régulateurs	58
Figure 24	Propriétés anti-inflammatoires de PPAR α	61
Figure 25	Co-régulation de PCSK9 et du LDLR par SREBP2	65
Figure 26	Schéma général de la régulation de PCSK9	80
Figure 27	Impact du régime « 60% fructose » sur les paramètres insulinémique, lipidiques, glycémique et poids chez le Hamster	110
Figure 28	Expression de l'ARNm de PCSK9 dans le foie des Hamsters FF vs CTRL	110
Figure 29	Glycémie des souris contrôles vs injectées par la streptozotocine à 150 mg/ kg	111
Figure 30	Insulinémie des souris contrôles (« vehicle ») vs injectées par la streptozotocine (STZ) dans un modèle de diabète modéré ou sévère	112
Figure 31	Expression de l'ARNm de PCSK9 dans le foie des souris STZ vs « vehicle » selon un diabète de type 1 modéré ou sévère	112
Figure 32	Expression de la protéine PCSK9 détectée par Western Blot dans le foie des souris STZ diabète sévère vs « vehicle »	113
Tableau 1	Les apolipoprotéines chez l'homme	16
Tableau 2	Les différentes classes de lipoprotéines chez l'homme (Gotto, 1986)	19
Tableau 3	Les PPARs	59
Tableau 4	Les LXRs	62
Tableau 5	Activité de PCSK9 d'après les résultats de Naureckiene et al.	85

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH	Autosomal Dominant Hypercholesterolemia
AF	Acide Fénofibrique
ARH	Autosomal Recessive Hypercholesterolemia
AG	Appareil de Golgi
Apo	Apolipoprotéine
BACE1	Beta-site Amyloid precursor protein (APP)- Cleaving Enzyme 1
CE	Cholestérol Estérifié
CHRD	Cystein and Histidine Rich Domain
CL	Cholestérol Libre
CM	Chylomicron
DBD	DNA Binding Domain
DD	Dimerization-Domain
DR	Direct Repeat
EL	Endothelial Lipase
HF	Hypercholestérolémie Familiale
KO	Knock-Out
LBD	Ligand Binding Domain
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LH	Lipase Hépatique
LPL	LipoProtéine Lipase
LXR	Liver X Receptor
PCs	Proprotéines Convertases

PCSK9	Proprotéine Convertase Subtilisin Kexin type 9
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PUFA	Poly-Unsaturated Fatty Acid
RE	Réticulum Endoplasmique
RN	Récepteur Nucleaire
TG	Triglycérides
SM	Syndrome Métabolique
SREBP	Sterol Responsive Element Binding Protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor
WT	Wild Type

AVANT-PROPOS

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) est une serine protéase appartenant à la famille des subtilisines, jouant un rôle important dans la régulation des niveaux de cholestérol circulant (pour revue, Costet et al., 2008). Les mutations gains de fonction de PCSK9 sont associées à une hypercholestérolémie autosomale dominante due à une augmentation de la concentration en cholestérol associé aux low density Lipoprotein (LDL-c) (Abifadel et al., 2003). A l'inverse, des mutations perte de fonction de PCSK9, sont associées à une diminution de ces concentrations et à une réduction de 88% du risque d'apparition de maladies coronariennes (Cohen et al., 2006).

Tout comme le LDLR (LDL Receptor), PCSK9 est positivement régulé par les statines via le facteur de transcription Sterol Responsive Element Binding Protein 2 (SREBP2). Les statines sont très utilisées en clinique pour leurs effets hypocholestérolémiants, ajouter des inhibiteurs de PCSK9 pourrait donc améliorer leur efficacité.

A mon arrivée au laboratoire, notre équipe venait de montrer que PCSK9 était positivement régulé par l'insuline et les agonistes du Liver X Receptor (LXR) via l'activation de SREBP-1c. L'expression de PCSK9 était également régulée par le statut nutritionnel. En effet, chez la souris, un jeûne de 24 heures diminue de 50% l'expression de PCSK9 dans le foie, de manière réversible puisque nourrir à nouveau ces souris restore le niveau d'expression de PCSK9 (Costet et al., 2006). De plus, nous savons que lors du jeûne le catabolisme des acides gras est augmenté grâce à l'activation de PPAR α (Staels and Fruchart, 2005). L'hypothèse était donc que la diminution de l'expression de PCSK9 observée lors du jeûne avait été due non seulement à une baisse de l'insulinémie, mais aussi à l'activation de PPAR α . Afin de vérifier cette hypothèse, notre laboratoire a mené une étude in vivo chez la souris. Il a été démontré que le fénofibrate -agoniste synthétique de PPAR α - était capable de réprimer l'expression de PCSK9 dans le foie des souris Wild Type mais pas dans celui des souris PPAR α ^{-/-} (Lambert et al., 2006).

L'objectif premier de mon projet de thèse a été de caractériser les mécanismes de répression de PCSK9 par PPAR α dans des cellules humaines et de vérifier l'efficacité de cette répression sur les voies de régulations positives de PCSK9, notamment les voies régies par les statines ou LXR.

Dans le réticulum endoplasmique, Pro-PCSK9 subit un autoclivage indispensable à sa maturation et à sa sécrétion. PCSK9 peut ensuite atteindre le LDLR et l'entraîner préférentiellement vers la dégradation lysosomale, empêchant son éventuel recyclage à la surface cellulaire (pour revue, Costet et al., 2008). Afin d'apprécier l'activité enzymatique de PCSK9, la deuxième partie de mes travaux de thèse a porté sur la mise au point d'un test fluorométrique de dosage de l'activité autocatalytique de PCSK9.

Enfin, notre laboratoire a également montré que la surexpression par adénovirus de PCSK9 chez la souris à jeun entraîne une augmentation des triglycérides associés aux very low density lipoprotein (VLDL) (Lambert et al., 2006). Ces résultats sont venus confirmer des données auparavant obtenues chez l'homme par notre laboratoire montrant que des patients porteurs de la mutation gain de fonction PCSK9-S127R, présentaient une surproduction d'apolipoprotéine B100 (ApoB-100) et une sécrétion accrue en VLDL (Ouguerram et al., 2004). La découverte de la régulation de PCSK9 par l'insuline via SREBP-1c (Costet et al., 2006) et les données montrant que l'insuline réprime la sécrétion d'ApoB nous ont mené à faire l'hypothèse d'un lien entre l'expression de PCSK9 et l'hypertriglycéridémie observée couramment chez le diabétique. C'est pourquoi la troisième partie de ma thèse, a consisté en la caractérisation de l'expression de PCSK9 dans divers modèles animaux de diabète de type II d'origine génétique ou nutritionnelle ou de diabète de type I.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Le Métabolisme des Lipides

I. Les lipides

I.1. Quelques définitions

Les lipides sont des molécules organiques hydrophobes, composées de triglycérides, de cholestérol libre ou estérifié et de phospholipides. Etant insolubles dans l'eau, ces molécules sont incapables de circuler librement dans le sang. Elles circulent donc sous forme de lipoprotéines à partir de leur site de synthèse ou d'absorption (l'intestin). Les acides gras libres peuvent également se fixer sur l'albumine.

Les lipides peuvent être classés selon leur composition chimique et leur structure.

Leur composition est la suivante :

- Acides gras, ce sont des acides carboxyliques possédant une chaîne de carbone avec une ou plusieurs insaturations. Les plus connus sont l'acide palmitique (à 16 atomes de carbone) et l'acide oléique (à 18 atomes de carbone).
- Glycérides, qui sont des esters de glycérol et d'acides gras. Ils existent sous forme mono-, di- ou triglycérides en fonction de l'estérification d'un, deux ou trois groupements alcool du glycérol en question. Les triglycérides (TG), constituent 90% des lipides apportés par l'alimentation. C'est la forme privilégiée pour la mise en réserve d'énergie au niveau du tissu adipeux.
- Stérols, ils se caractérisent par un noyau cyclopentaphénanthrenoïque. Les différents types de stérols se distinguent selon le nombre de position d'insaturations et de chaînes latérales. Le plus connu est le cholestérol (Figure 1).

I.2. Le cholestérol

Le cholestérol est une molécule hydrophobe qui est un composant essentiel à la vie des cellules de l'organisme.

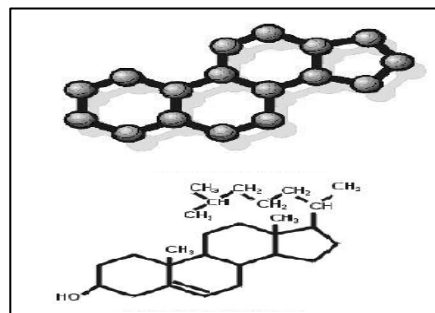


Figure 1 : Structure moléculaire du cholestérol.

Le cholestérol est présent dans différents organes et tissus de l'organisme sous forme estérifiée. Le cholestérol s'intercale entre les phospholipides des membranes cellulaires, il est ainsi un composant indispensable au maintien et à la stabilité de la structure des cellules. Le cholestérol peut aussi servir de précurseur de synthèse de nombreuses molécules endocriniennes, notamment pour des hormones stéroïdiennes sexuelles (estrogènes, testostérone, progestérone) ou non (cortisol, aldostérone...), mais aussi la vitamine D3, et les acides biliaires.

I.3. Les apolipoprotéines : exemple de l'apolipoprotéine B

Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines permettant la circulation des lipides dans le sang. Il existe divers types d'apolipoprotéines, certaines d'entre elles jouent le rôle de ligands de divers récepteurs (ex. LDLR) (tableau 1.)

apolipoprotéine	tissu	distribution	fonction
A-I	Foie, intestin	Chylomicron, HDL	Structurale, activateur de la LCAT, efflux de cholestérol
A-II	Foie	HDL	Structurale, activateur/inhibiteur de la HL, efflux de cholestérol
A-IV	Foie, intestin	Chylomicron, HDL	Transport inverse du cholestérol, activateur de la LCAT, métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
A-V	Foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
B100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurale, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du LDL-receptor
B48	Intestin	Chylomicron	Structurale, synthèse et sécrétion des chylomicrons, ligand de l'apoB48-receptor
C-I	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibiteur de la CETP, activateur de la LCAT, inhibiteur de la liaison aux LDL-receptor et LRP
C-II	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Activateur de la LPL
C-III	Foie, intestin	Chylomicron, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL, inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides
D (A-III)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	VLDL, LDL, HDL	?
E	Foie, macrophages, cerveau	Chylomicron, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL-receptor et LRP

Tableau 1. Expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.

L'apolipoprotéine B (apoB) est une glycoprotéine dont il existe deux formes :

- L'apoB-100 constituée de 4536 acides aminés, résultant de la traduction complète du gène codant pour l'apoB.
- L'apoB-48 de 2152 acides aminés, soit 48% de la forme complète, obtenue par épissage.

Chez l'homme, l'apoB-100 est d'origine hépatique et se retrouve dans les lipoprotéines riches en TG : les VLDL et IDL, mais aussi les LDL. L'apoB-48, est l'apolipoprotéine prédominante des chylomicrons (CM).

Enfin, l'apoB-100 tout comme l'apoE possèdent un domaine de liaison spécifique pour le LDLR.

I.4. Les lipoprotéines

I.4.1. Structure et classification des Lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes sphériques composés de lipides et d'apolipoprotéines qui stabilisent les émulsions lipidiques.

Les lipoprotéines sont constituées d'un noyau central composé de cholestérol estérifié (CE) et de TG entouré d'une couche de phospholipides, d'apolipoprotéines et de cholestérol libre (CL) (Figure 2).

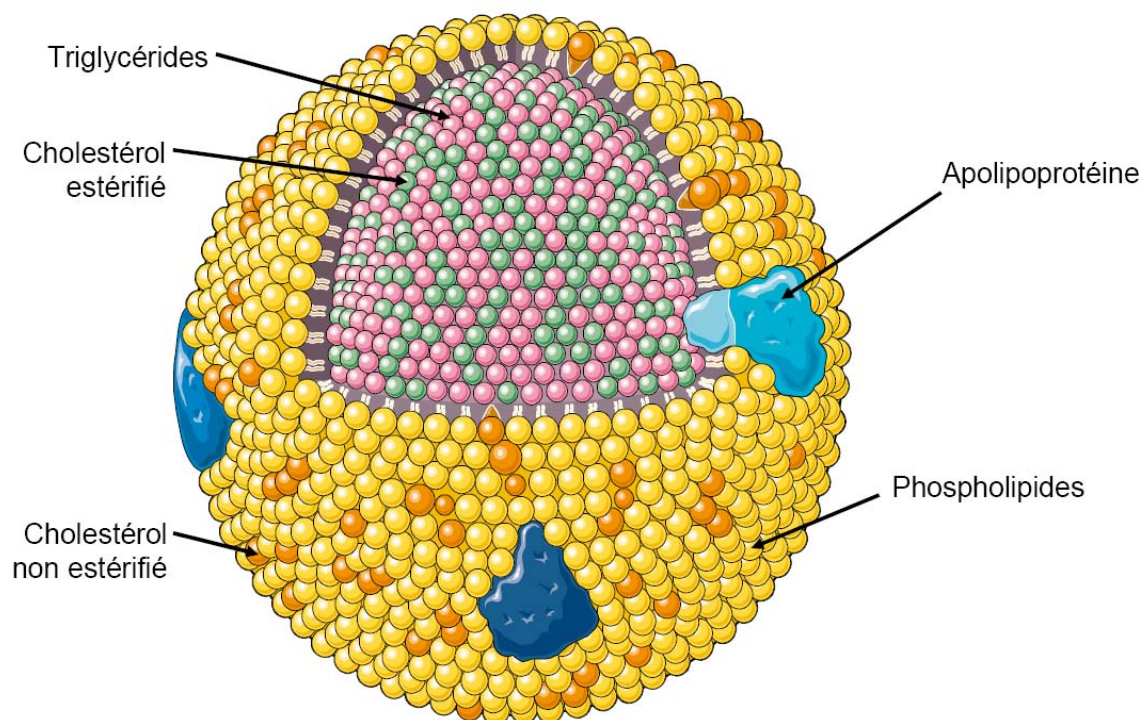


Figure 2 : Représentation schématique d'une lipoprotéine

Si cette composition est commune à toutes les lipoprotéines, la proportion en chacun des constituants est cependant très variable. L'équipe de Gofman (GOFMAN *et al.*, 1949) a établi par ultracentrifugation une classification basée sur la densité des lipoprotéines :

- HDL (high density lipoprotein),
- IDL (intermediate density lipoprotein),
- LDL (low density lipoprotein),
- VLDL (Very low density lipoprotein),
- et les chylomicrons (CM)

Chacune de ces particules a un contenu spécifique en lipides et apolipoprotéines. Les particules les plus riches en lipides sont les moins denses (CM), les plus riches en protéines sont les plus denses (HDL).

Ci-dessous un tableau récapitulatif des différentes classes de lipoprotéines chez l'homme :

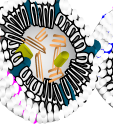
	chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
						
diamètre (Å)	800-5000	300-400	250-350	200-250	95-120	55-95
densité (g/mL)	<0.93	0.93-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.125	1.125-1.210
protéine*	2	10	17	23	42	56
apolipoprotéines majeures	B48, A, C, E	B100, A, C, E	B100, C, E	B100, E	A-I	A-I, A-II
TG*	90	54	20	4	5	3
CE*	2	13	34	41	13	15
CL*	1	7	9	11	5	3
PL*	5	16	20	21	35	23

Tableau 2 : Les différentes classes de lipoprotéines chez l'homme (Gotto, Jr. *et al.*, 1986)
 (* % masse; CE, cholesteryl esters; CL, cholestérol; PL, phospholipides, TG, triglycérides)

I.4.2. Le métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines est nécessaire au trafic des lipides circulants. Il est composé de trois voies principales :

- Voie exogène : (Figure 3)

Cette voie a pour rôle d'amener les lipides d'origine alimentaire vers les sites de production d'énergie, de stockage ou de synthèse de nouvelles molécules.

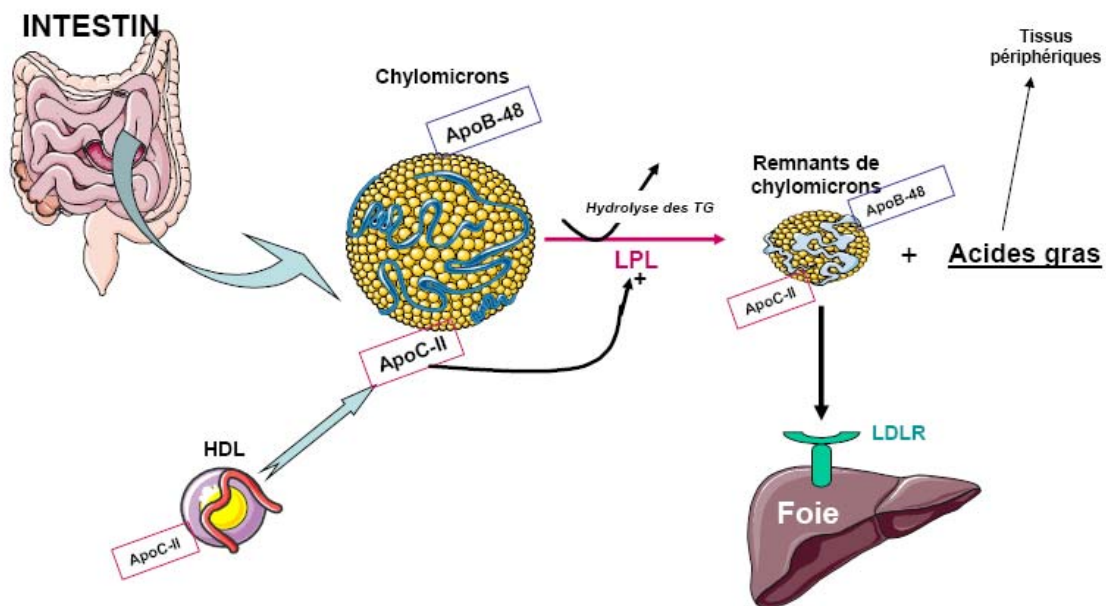


Figure 3 : Voie exogène du métabolisme des lipoprotéines

La voie exogène débute au niveau intestinal, par la formation de CM grâce à la présence de l'apoB48. Après passage dans la lymphe, les CM sont déversés dans le plasma, où ils incorporent l'apolipoprotéine-CII, cédée par les HDL et nécessaire à l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL). Sous l'action de cette enzyme, les triglycérides contenus dans les CM sont hydrolysés et libèrent des acides gras libres qui sont captés par les cellules. Cette lipolyse des CM se poursuit jusqu'au détachement des différents composants de surface des CM, comme les phospholipides, le cholestérol libre, les apo-AI, AII, AIV qui peuvent contribuer à la synthèse de nouvelles HDL. Les résidus de CM (remnants) contenant toujours l'apo-B48 sont captés par le foie par l'intermédiaire du LDLR ainsi que de la LRP (Low density lipoprotein receptor related protein).

Outre les CM, des travaux récents sur des souris déficientes en ATP Binding Cassette Transporter A1 intestinal (*ABCA1*) ont suggéré que 30% des HDL seraient

synthétisées dans l'intestin puis directement sécrétées dans la circulation (Brunham *et al.*, 2006).

▪ Voie endogène (Figure 4)

Cette voie permet le transport des lipides endogènes du foie vers les tissus périphériques. Elle se met plus particulièrement en place lorsque la quantité en CM circulants est faible et que les besoins en TG et cholestérol des tissus périphériques doivent être assurés.

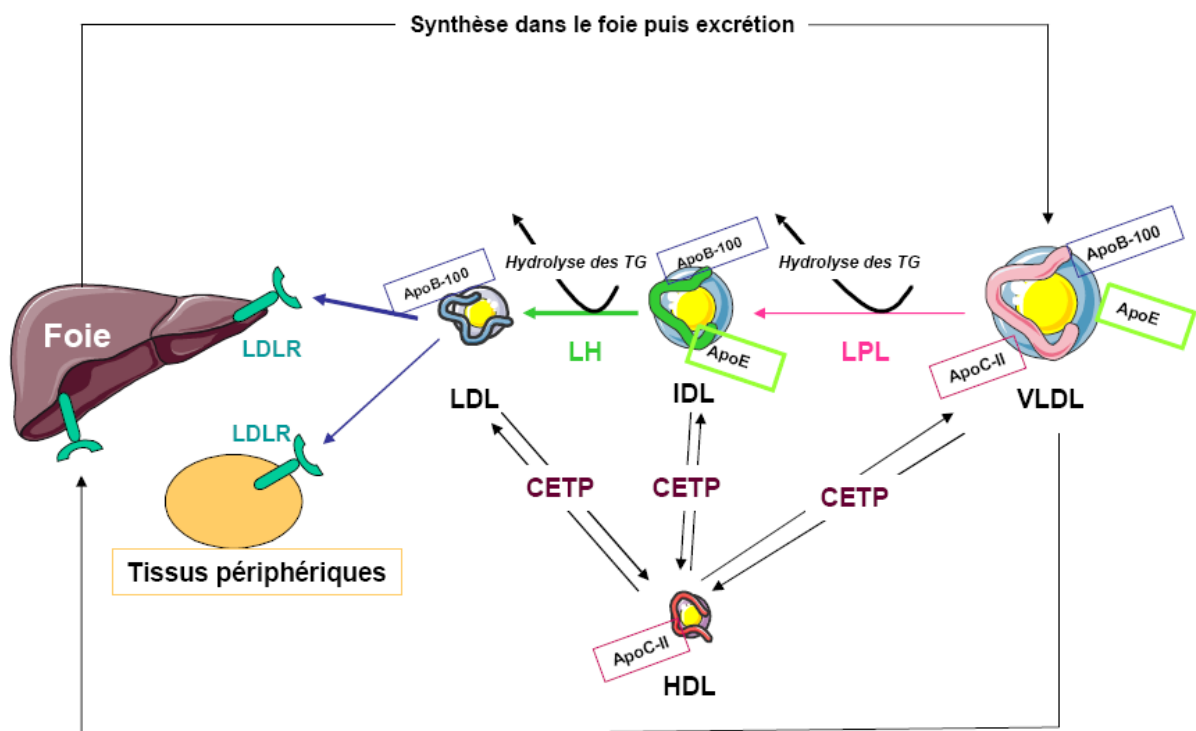


Figure 4 : Voie endogène du métabolisme des lipoprotéines

Elle débute dans le foie par la formation de VLDL, qui sont des particules enrichies en TG et esters de cholestérol (CE). Les VLDL contenant l'apoB-100 sont sécrétées, puis ils incorporent par la suite les apoE et CII. Cette dernière active la LPL pour hydrolyser les TG contenus dans les VLDL. Ceci induit la libération des acides gras, source d'énergie pour divers organes. Les TG des IDL sont ensuite hydrolysés par la lipase hépatique (LH) pour donner des particules de LDL, riches en cholestérol estérifié et associées à l'apoB100.

Les LDL peuvent ensuite :

- Subir l'hydrolyse de leurs TG par la LH,
- Subir l'action de la LCAT (Lécithine Cholesterol AcylTransferase), qui permet l'estérification du cholestérol libre contenu dans ces particules.

- Subir l'action de la CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein) qui permet l'échange de CE depuis les HDL vers les LDL, IDL et VLDL contre des TG dans la direction opposée.
- Etre capturées par le foie ou les cellules périphériques, grâce au LDLR qui reconnaît spécifiquement leur apoB100.

- Le transport inverse du cholestérol

Il s'agit du retour du cholestérol excédentaire de la périphérie vers le foie. Les particules d'HDL produites par l'intestin ou provenant de la lipolyse des particules riches en TG (comme les VLDL ou CM), contiennent l'apo-AI et ont la particularité d'avoir une forte affinité pour le CL, qu'elles transforment en CE grâce à l'action de la LCAT. Au fur et à mesure que les HDL incorporent du cholestérol, leur taille augmente, et elles passent d'HDL natives dites pré β à des HDL₃ puis HDL₂. Il y a ensuite échange de CE contre des TG entre ces HDL et les LDL ou VLDL grâce à la CETP. Le cholestérol estérifié porté par les LDL retourne ainsi au foie en étant capté par le LDLR. Par ailleurs, les HDL peuvent également être captées par le récepteur SR-B1 situé à la surface des hépatocytes. Sans être internalisées, les HDL libèrent leur CE dans le foie et reviennent ensuite dans la circulation pour re-capturer du CL. Ce processus est très majoritairement observé chez la souris.

Enfin, dans le foie, le cholestérol est ensuite transformé en sels biliaires -grâce à notamment l'enzyme Cyp7A1- et est ainsi excrété.

I.5. L'athérosclérose

L'athérosclérose se définit par l'occlusion progressive de la lumière vasculaire due à la formation de plaque athéromateuse.

La formation de la plaque athéromateuse débute par l'infiltration de l'endothélium vasculaire par des LDL oxydées qui deviennent toxiques. Ceci déclenche la migration de monocytes vers le site d'infiltration où ils deviennent macrophages et se chargent de phagocyter les LDL oxydées grâce aux récepteurs « scavengers » (Lox1 et CD36) situés à leur surface. Au fur et à mesure qu'ils internalisent le cholestérol, ces macrophages deviennent des cellules spumeuses dont l'accumulation dans la paroi du vaisseau sanguin entraîne progressivement la formation de la plaque athéromateuse. Prévenir ou ralentir ce processus est donc primordial et une des solutions est de diminuer la quantité de LDL-c circulante ou d'augmenter le transport inverse du cholestérol.

II. Les dyslipidémies

II.1. Définitions

Les dyslipidémies sont souvent associées à l'existence d'autres maladies métaboliques et des complications cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

Il existe 4 types principaux de dyslipidémies :

- Les hypercholestérolémies pures
- Les hypertriglycéridémies pures
- Les dyslipidémies mixtes
- L'hypoHDLémies

Il existe également d'autres types de dyslipidémies plus rares comme l'hypoalphalipoprotéinémie (associée à une diminution des HDL) ainsi que l'hypobétalipoprotéinémie (associée à une diminution des particules associées aux apoB comme les LDL et VLDL).

Fredrickson a établi en 1967 une classification internationale des dyslipidémies en fonction du type de lipoprotéine dont la concentration plasmatique est augmentée.

Il décrit au total 6 phénotypes :

- Les dyslipidémies de type I : il s'agit d'une élévation des chylomicrons.
- Les dyslipidémies de type IIa, caractérisées par une augmentation des LDL.
- Les dyslipidémies de type IIb : elles sont mixtes du fait qu'il s'agit d'une augmentation des LDL et VLDL.
- Les dyslipidémies de type III : les remnants de particules riches en TG ou IDL sont à l'origine de ce phénotype.
- Les dyslipidémies de type IV, liées à une élévation des VLDL
- Les dyslipidémies de type V : il s'agit de dyslipidémies mixtes puisque qu'elles sont liées à l'augmentation conjointe des VLDL et des chylomicrons.

Cependant, il faut noter que l'hypoHDLémie est une anomalie non répertoriée dans cette classification du fait qu'elle soit souvent associée aux hypertriglycéridémies (dyslipidémies de types III ou IV.).

II.2. Les hypercholestérolémies familiales

II.2.1. Historique

L'hypercholestérolémie Familiale (HF), a été la première maladie génétique identifiée comme étant responsable d'infarctus du myocarde.

Dans les années 1930, la « triade clinique » hypercholestérolémie, xanthomes et athérosclérose précoce a été reconnue comme étant associée à une maladie familiale.

Dans les années 1950, grâce à l'étude de différents cas familiaux, cette « triade clinique » fut identifiée comme étant d'origine génétique. De plus l'avancée technologique de l'époque -l'ultracentrifugation analytique- (GOFMAN *et al.*, 1949) a aussi permis de démontrer que l'HF était due à l'augmentation sélective d'une seule classe de lipoprotéines : les LDL.

L'arrivée de la biologie moléculaire a permis d'identifier le gène responsable de l'HF : *LDLR*, codant pour une protéine membranaire, qui fut purifiée en 1982. Le clonage, la caractérisation du locus du *LDLR*, et la découverte du rôle du LDLR valurent le Prix Nobel à Brown et Goldstein. S'en suivit alors l'émergence d'études sur le rôle du LDLR dans le métabolisme des lipoprotéines et les mécanismes de régulation contrôlant son expression.

Plus tard il a été mis en évidence deux types d'HF selon le type de mutation à l'origine de l'affection génétique :

- Les ADH : Autosomal Dominant Hypercholesterolemia, il s'agit de mutations à transmission génétique dominante touchant soit les gènes codant pour le LDLR, ou pour l'apoB-100 ou encore PCSK9.
- Les ARH : Autosomal Recessive Hypercholesterolemia, il s'agit de mutations à transmission génétique récessive touchant le gène codant pour la protéine adaptatrice nécessaire à l'internalisation du LDLR du même nom : la protéine ARH.

II.2.2 Transmission génétique et prévalence

L'HF présente un même profil de transmission génétique en trois modes distincts :

- Une population portant deux allèles mutés identiques, (homozygotes), leur profil clinique est très grave, la prévalence de cette maladie est d'un cas sur 1 million de naissances.
- Les patients portant deux allèles mutés différents (hétérozygotes composés) les sujets présentent un profil clinique similaire et une prévalence similaires à la population précédemment citée.

- Les sujets hétérozygotes ayant hérité d'un seul allèle muté, présentant un profil clinique intermédiaire par rapport aux sujets homozygotes porteurs de deux allèles mutés et les sujets normaux.

La prévalence mondiale de l'HF est d'un cas sur 500, ce qui classe cette maladie comme la plus fréquente de toutes les affections génétiques. Dans certaines régions du monde la prévalence de cette hétérozygotie peut être plus importante et atteindre 1/67, c'est le cas des Juifs de Lituanie, mais aussi d'Africains du sud 1/100 et des Québécois 1/270.

II.2.3. Manifestations cliniques

Au cours de sa vie l'homme développe de l'athérosclérose spontanément, mais pour un patient atteint d'une HF, l'athérosclérose ainsi que les maladies cardiovasculaires qui en découlent se développent de manière prématurée dès la naissance. Ainsi, la sévérité des manifestations cliniques de l'HF est proportionnelle au nombre d'allèles mutés du *LDLR* ou du ligand l'apoB. Les sujets hétérozygotes auront dès la naissance l'apparition de xanthomes tendineux et d'arc cornéen vers l'âge de 20 ans, puis risque de coronaropathie entre 20 et 40 ans. Si ce schéma clinique semble grave, celui des patients homozygotes ainsi que celui des hétérozygotes composés est plus sévère dès la naissance et constant tout au long de l'enfance. L'apparition d'athérosclérose généralisée dès l'enfance aboutit souvent à des anomalies au niveau cardiovasculaire, comme l'infiltration xanthomateuse de la valve aortique donnant lieu à un rétrécissement aortique puis une mort par infarctus du myocarde avant la troisième décennie.

II.2.4 Traitements des FH par les statines

Les statines sont des inhibiteurs compétitifs de la HMG-CoA-réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-réductase), enzyme limitante de la voie de synthèse endogène du cholestérol par les hépatocytes (Figure 5). L'inhibition de cette enzyme entraîne une baisse de la concentration intracellulaire du cholestérol, ce qui a pour conséquence l'activation du facteur de transcription SREBP2 qui induit une activation de la transcription du *LDLR* (*cf. la partie consacrée aux SREBPs*).

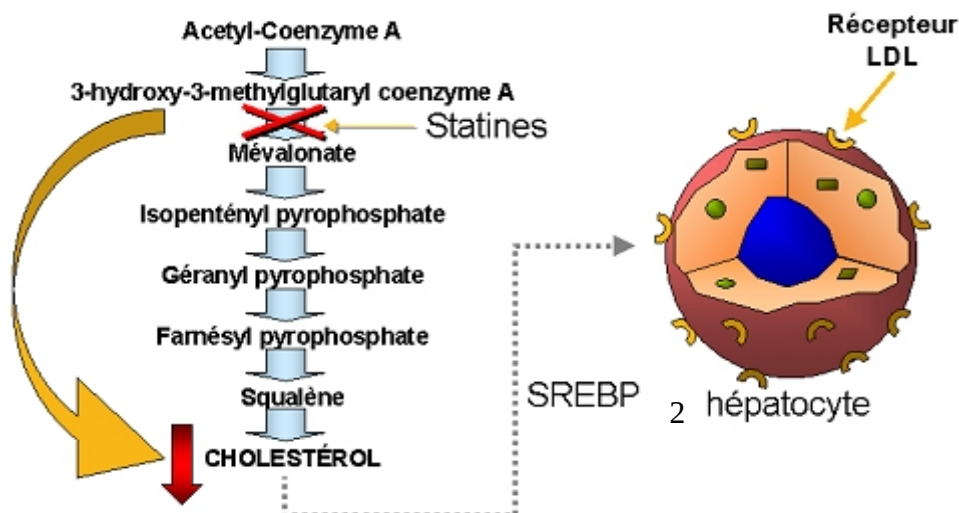


Figure 5 : Biosynthèse du cholestérol et mode d'action des statines

Cependant, certains sujets répondent moins bien à ce traitement. En effet, les statines augmentent également la transcription de *PCSK9* (Dubuc et al., 2004). Or PCSK9 augmente la dégradation du LDLR. Un traitement inhibant PCSK9 en complément des statines pourrait augmenter l'efficacité de ces dernières. Il s'agit d'un des points étudiés dans ma thèse (cf. la partie « Travaux personnels »).

II.3. Le syndrome métabolique et le diabète

Près de 80% des 200 millions d'adultes souffrant de diabète dans le monde décéderont d'une maladie cardiovasculaire. Les personnes souffrant de syndrome métabolique multiplient par trois fois le risque de développer une maladie cardiovasculaire (Isomaa et al., 2001).

II.3.1. Définition du syndrome métabolique

En 1923, Kylin décrit un syndrome associant l'hypertension artérielle, hyperglycémie et l'hyperuricémie (pour revue, Abate et al., 2004).

Ce n'est qu'en 1988, que Reaven créa le terme de Syndrome X pour désigner l'association de plusieurs anomalies métaboliques chez un même patient : intolérance au glucose, hyperinsulinémie, hypertriglycéridémie, hypoHDLémie, et hypertension artérielle (Reaven, 1988). Plus tard, l'obésité de type androïde, la microalbuminurie, le défaut de fibrinolyse viendront s'ajouter à la caractérisation de ce syndrome. D'autres dénominations seront proposées pour le qualifier : syndrome d'insulinorésistance, syndrome métabolique

(SM) dit pluri ou polymétabolique. Le SM a été reconnu comme entité clinique en 1998 par l'OMS puis par les instances de santé américaines en 2001.

Selon l'OMS, l'association d'une intolérance au glucose, d'une hyperinsulinémie ou d'un diabète à au moins deux autres anomalies métaboliques précitées ci-dessus constitue un SM.

La définition européenne admise par le groupe Européen d'Etude sur l'Insulino-resistance : EGIR, est identique à celle de l'OMS, à l'exception des critères de définition de l'obésité.

II.3.2. Définition du diabète

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieur à 1,26 g/l (7 mmol/l).

La France compte deux millions de diabétiques, et cette maladie touche 135 millions de personnes de part le monde. L'OMS distingue principalement trois types de diabète :

Le diabète de type 1, dit insulino-dépendant et dont l'origine est auto-immune ou idiopathique. L'origine de cette maladie est la destruction rapide et massive des cellules bêta contenues dans les îlots de Langerhans. Il s'agit d'une réaction inflammatoire auto-immune dont l'origine -bien que très souvent inconnue- peut être génétique, infectieuse ou alimentaire.

Le diabète de type 2, dit diabète non insulino-dépendant et dont l'insulinorésistance est une des caractéristiques les plus importantes.

Cette maladie débute par une mauvaise efficacité de l'insuline sur la pénétration intracellulaire du glucose, ce qui entraîne une hyperglycémie. Pour palier ce problème, l'organisme augmente sa production d'insuline, en vain. Cette hyperinsulinémie ne permet plus d'assurer la régulation de la glycémie et induit une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline : c'est l'insulinorésistance. La production accrue d'insuline par les cellules bêta finit par épuiser ces dernières et entraîne leur destruction ce qui conduit à une insulinopénie.

Autres formes de diabètes : il existe d'autres types de diabètes spécifiques qui ne sont ni de type 1 ni de type 2, ils sont liés à une endocrinopathie (syndrome de Turner, acromégalie, hyperthyroïdie, glucagonome...)

Une partie de mes travaux de recherche a porté sur la caractérisation de l'expression de PCSK9 dans un modèle animal de diabète de type 1 (la souris traitée par la streptozotocine) et dans un modèle d'insulinorésistance nutritionnelle (le hamster doré de Syrie soumis à un régime riche en fructose (*cf. la partie « Travaux personnels »*).

Chapitre 2. Les proprotéines convertases

I. Généralités sur les Proprotéines Convertases

I.1 Introduction

Le génome humain contient plus de 500 gènes codant pour des enzymes protéolytiques ou protéases (Nakayama, 1997; Scamuffa *et al.*, 2006; Seidah *et al.*, 2006; Seidah *et al.*, 2008).

Il existe six classes de protéases, (Figure 6) : les sérines-protéases, les metallo-protéases, les cysteine-protéases, les aspartyl-protéases, les threonine-protéases, et les glutamyl-protéases.

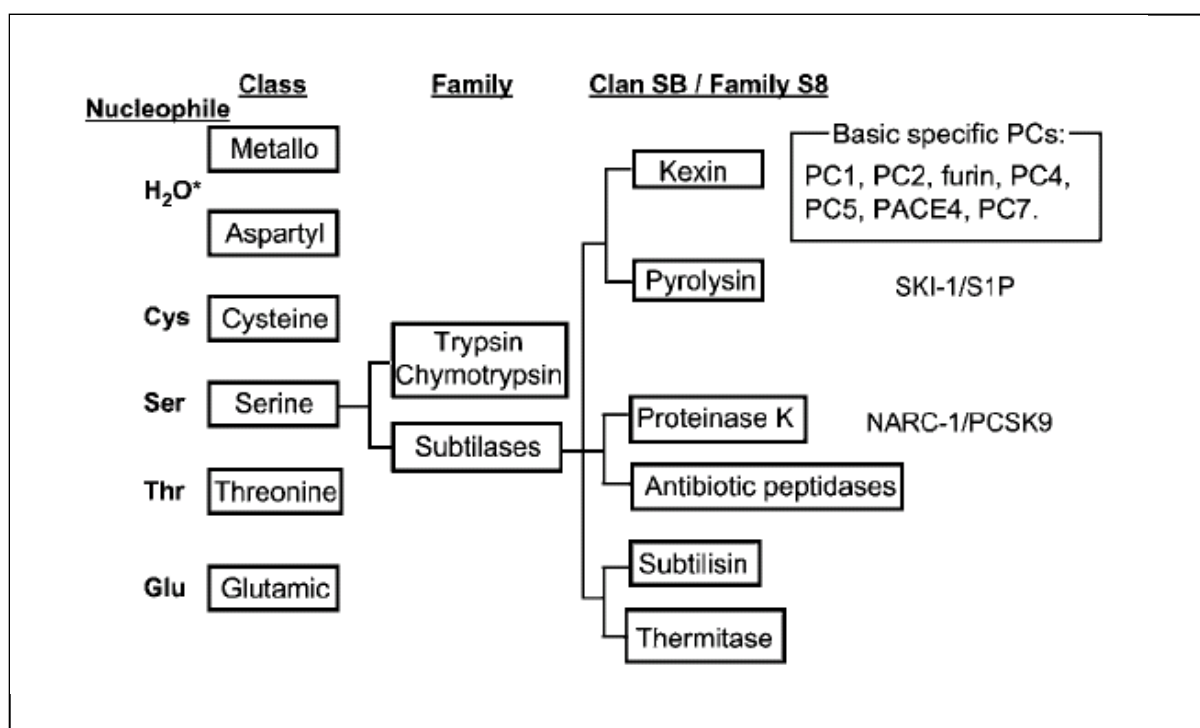


Figure 6 : Classification des protéases, « focus » sur la famille des Proprotéines Convertases (d'après Seidah *et al.*, 2006)

Toutes ces protéases sont impliquées dans les processus de clivages de protéines ou de peptides, le plus souvent pour permettre leur maturation et leur entrée dans les voies de sécrétion. C'est le cas de facteurs de croissance, d'hormones, d'enzymes et de récepteurs (Seidah *et al.*, 2006).

Je m'intéresserai ici uniquement à la classe des sérines-protéases, et plus particulièrement à la sous-famille des proprotéines convertases (PCs) d'origine mammalienne. Les PCs sont issues de la famille des subtilases, elle-même constituée de 6 sous-familles regroupées sous le nom de clan SB ou famille S8.

La famille des PCs est composée de neuf membres appartenant à trois sous-familles principalement. Nous pouvons distinguer deux types de PCs :

- Sept PCs appartenant à la sous-famille des kexines, elles clivent spécifiquement leur substrat après des acides aminés basiques. Ces protéases clivent des précurseurs au niveau de séquences consensus de type : $K/R-(X)_n-(K/R)\downarrow$ avec $n=0,2,4$ ou 6 , et où X est un acide aminé quelconque excepté une cystéine. Il s'agit de PC1/3, PC2, Furine, PC4, PC5/6, PACE4 et PC7. Les gènes codants pour chacune de ces protéases sont nommés *PCSK1* à *PCSK7* respectivement.
- Les deux PCs restantes ont la spécificité de cliver leur substrat après des acides aminés non basiques et à une séquence consensus du type : $(R/K)-X-(\text{acide aminé hydrophobe})-X\downarrow$. La huitième protéase est donc appelée subtilisin kexine isozyme-1 (SK-1) également connue sous le nom de S1P pour site-1 protéase. Elle appartient à la sous-famille des pyrolysines et est codée par le gène *PCSK8*. La dernière PC découverte appartient à la sous-famille des protéinases K et est codée par le gène *PCSK9*.

1.2. Structure générale des PCs

Les PCs possèdent différentes régions caractéristiques : (Figure 7)

- Le propeptide, dont le site de clivage est différent selon le type de PCs, est une région très conservée parmi toutes les PCs.
- Le domaine catalytique des PCs de la famille des subtilases est très conservé, il compte environ 330 acides aminés. Trois acides aminés particuliers forment la triade catalytique : il s'agit de l'acide aspartique, de l'histidine et de la serine. La présence d'un quatrième acide aminé -l'asparagine- stabilisateur du trou à oxyanion est également cruciale au bon fonctionnement du site catalytique de ces PCs.
- Toutes les PCs excepté *PCSK9* possèdent un domaine P également appelé domaine Homo B. il est à noter que les PCs d'origine bactérienne sont dépourvues de ce domaine. Il semblerait que ce domaine soit essentiel pour les processus de repliement dans l'espace des PCs avant leur sécrétion ainsi que pour la régulation de leur activité catalytique (Zhong *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999). Ce domaine est

caractérisé par la présence d'une séquence de trois acides aminés : Arginine, Glycine, acide aspartique : RGD. Une mutation touchant l'un de ces trois acides aminés dans PC1/3 se traduit par une perte totale de l'activité catalytique ainsi qu'un défaut de sécrétion de cette protéine (Lusson *et al.*, 1997).

- Le domaine riche en cystéine est commun à la furine, PACE4, PC5/6A et B et PCSK9. Cette région semble être impliquée dans les interactions « protéine-protéine »
- Enfin, certaines PCs sont transmembranaires. C'est le cas de la furine, de PC5/6B et PC7.

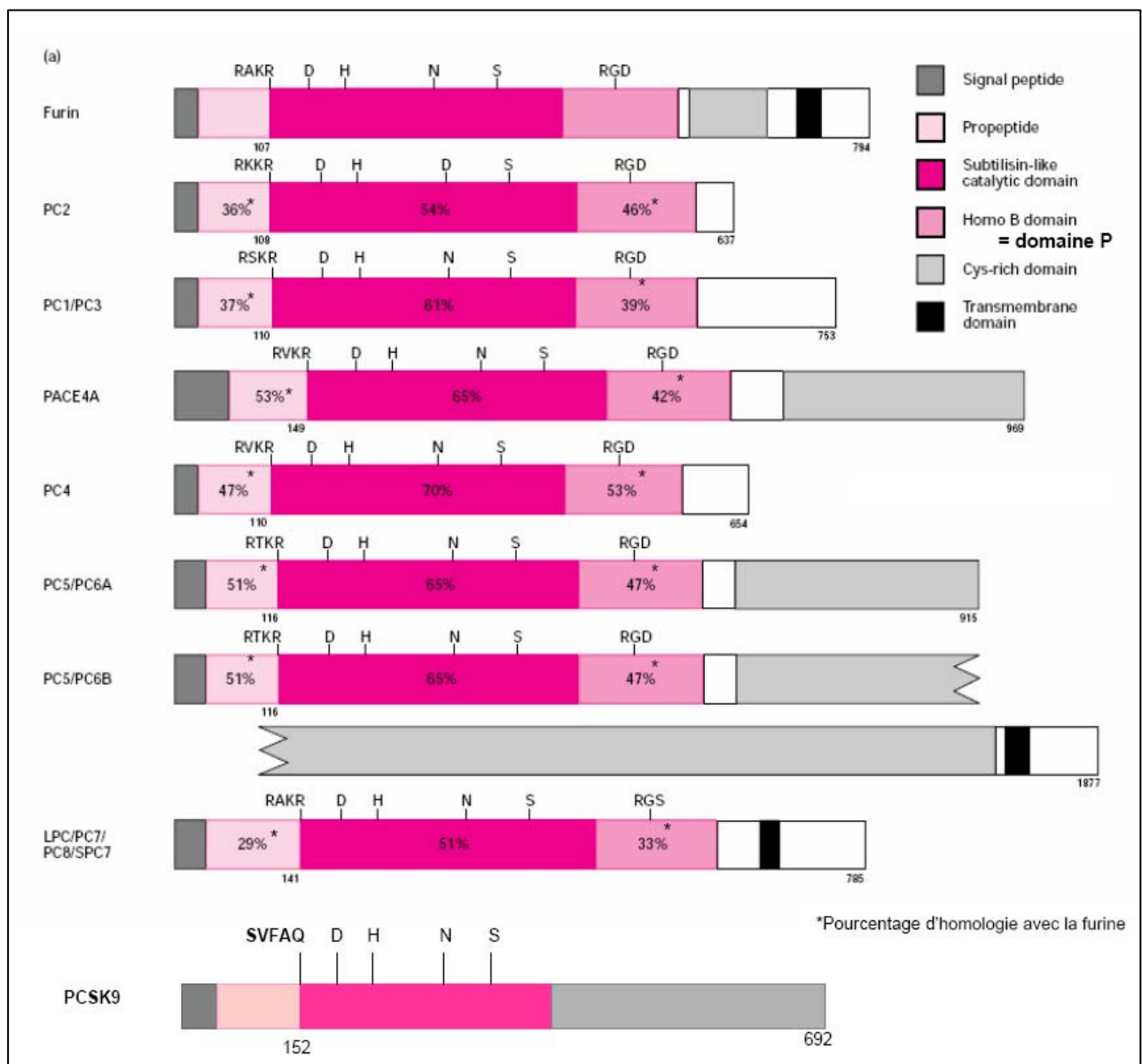


Figure 7 : Représentation schématique des proprotéines convertases
(modifiée d'après Nakayama *et al.*, 1996)

I.3. Classifications des PCs

I.3.1. Distribution tissulaire des PCs

Il est possible de classer les PCs en trois grands groupes distincts selon leur localisation tissulaire (Seidah *et al.*, 2008) :

- Le premier groupe est constitué de la furine, de PACE4, PC5/6 et PC7, PCSK9, et SK-1. Ces PCs sont retrouvés de manière ubiquitaire dans tous les types cellulaires.
- Le second groupe comprend PC2 et PC1/3, retrouvées uniquement dans les tissus neuroendocriniens comme les îlots du pancréas, les glandes pituitaires, et différentes régions du cerveau.
- Enfin le troisième groupe est représenté par PC4, dont la localisation est restreinte au niveau du testicule.

I.3.2. Distribution cellulaire des PCs

Il est également possible de faire un classement de ces différentes PCs en fonction du compartiment cellulaire où elles se trouvent et/ où elles clivent leur substrat (Seidah *et al.*, 2006) (Figure 8) :

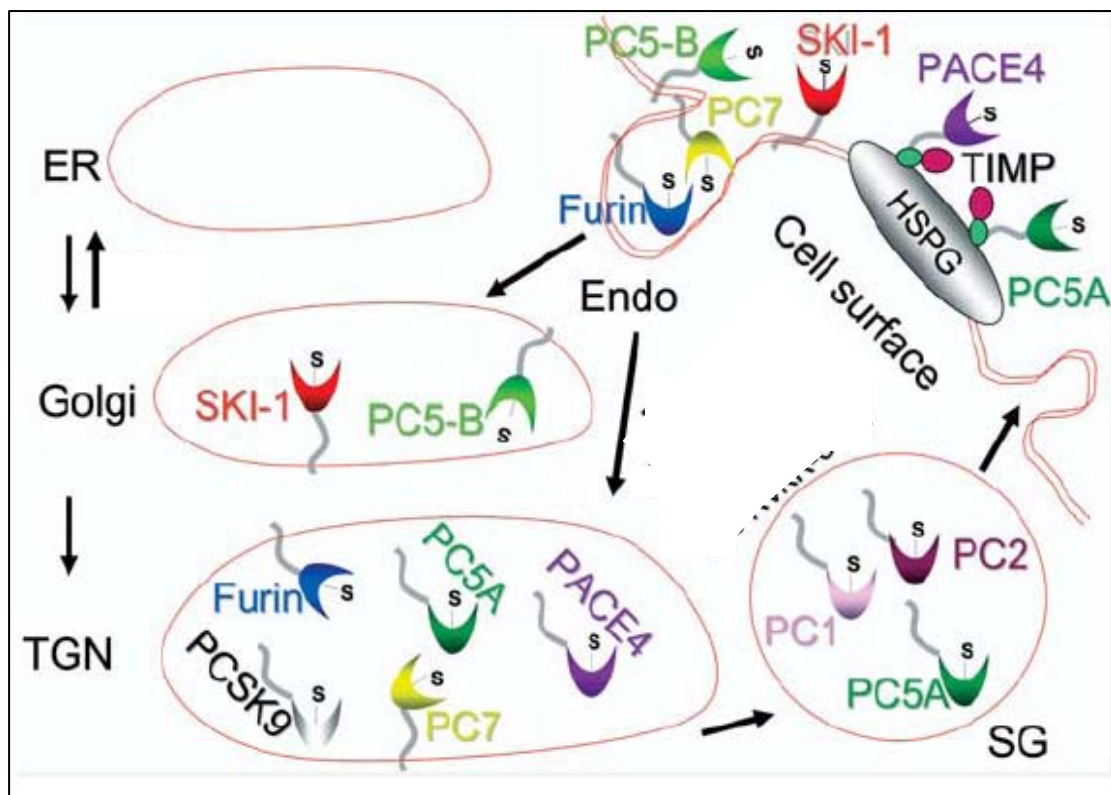


Figure 8 : Localisation Subcellulaire des PCs (d'après Seidah *et al.*, 2006)

(TGN = Transgolgi, SG granule sécrétoire, Endo = endosome, ER =Réticulum Endoplasmique)

- La furine, PC7 et l'isoforme B de PC5/6 et SK-1 sont spécifiquement localisées, liées à la membrane, elles effectuent plusieurs cycles en passant par la voie endosomale, entre la surface cellulaire et le réseau transgolgien (TGN). Ces PCs clivent leur substrat dans l'endosome, ou dans le Golgi ou à la surface cellulaire. La furine et PC5/6 subissent souvent un clivage par des métallo-protéases pour être sécrétées. SK-1 peut également être une enzyme soluble grâce à un autoclivage.
- Les protéases PC1/3, PC2 et parfois l'isoforme A de PC5/6 sont accumulées dans des granules sécrétoires (SG). Elles sont sécrétées de manière inductible et sont chargées de cliver des hormones.
- Enfin, PC4, l'isoforme A de PC5/6, PACE4 et PCSK9 sont quant à elles constitutivement sécrétées. Ces PCs possèdent un domaine riche en cystéine qui pour certaines d'entre elles -PC5/6A et PACE4- leur permet de se lier au domaine C-terminal des TIMPs (Tissue inhibitor metalloproteases), puis d'être retenue à la surface cellulaire par les régions riches en HSPG (Heparin sulfate proteoglycans) lieu de clivage de leur substrat.

II. Maturation des PCs : exemples de la furine et de PC5/6

II.1. La furine

La forme « pro » de la furine est synthétisée sous forme d'une protéine membranaire de 100 kDa dont le prodomaine est rapidement clivé pour donner une protéine mature de 94kDa. Il s'agit d'un autoclivage qui a lieu dans le réticulum endoplasmique, nécessaire au transit de la furine dans les compartiments avals. Cependant, cet autoclivage n'est pas suffisant pour activer la furine. En effet, le propeptide en restant associé à la forme mature de la protéase agit comme un inhibiteur de l'activité de celle-ci. Lorsque la furine se trouve en conditions de pH acide et en présence d'ions calcium -c'est le cas lors de son arrivée dans le TGN- un second clivage a lieu pour libérer le prodomaine (Anderson *et al.*, 1997). Ce processus rend la furine catalytiquement active vis-à-vis de ses éventuels substrats.

II.2. PC5/6

Il existe deux isoformes de PC5/6 : A (915 acides aminés) et B (1877 acides aminés) obtenues par épissage alternatif du même ARNm de *PC5/6*. L'isoforme A est cytosolique tandis que B est transmembranaire. (Pour revue, Seidah *et al.*, 2008).

Tout comme la furine, PC5/6A doit subir un second clivage pour être catalytiquement active. Cependant, le lieu exact de ce clivage n'est pas encore connu. Comme décrit ci-dessus, nous savons cependant que PC5/6A agit sur ses substrats à la surface cellulaire grâce à une interaction entre son domaine CRD et les HSPGs. Ces dernières sont des molécules facilitant les liaisons protéines-protéines, qui auraient ici le rôle de présenter les substrats à PC5/6A (Mayer *et al.*, 2008)

III. PCSK9

III.1. Du gène à la protéine

PCSK9 est un gène de 22 kb localisé sur le chromosome numéro 1, comprenant 12 exons (Abifadel *et al.*, 2003). Il existe une « isoforme » de PCSK9 obtenue par épissage alternatif. En effet, suite à la délétion du huitième exon de *PCSK9* codant pour 58 acides aminés, une protéine plus courte, qui ne subira ni autoclivage ni sécrétion, est produite (Schmidt *et al.*, 2008a). Ce variant est retrouvé de manière ubiquitaire dans divers organes dont le foie mais il ne semble pas influencer sur l'expression du LDLR (Schmidt *et al.*, 2008a).

PCSK9 est synthétisée sous forme d'une proprotéine zymogène soluble de 692 acides aminés chez l'homme (Seidah *et al.*, 2003) et de 691 acides aminés chez le rongeur (Grozdanov *et al.*, 2006). Pro-PCSK9 dont le poids moléculaire est de 74kDa subit un clivage autocatalytique dans le réticulum endoplasmique pour donner une protéine catalytiquement active de 63kD (Figure 10). L'ARNm de PCSK9 est retrouvé de manière ubiquitaire dans l'organisme mais il est cependant plus abondant dans le foie, l'intestin et le rein (Seidah *et al.*, 2003) (Figure 9).

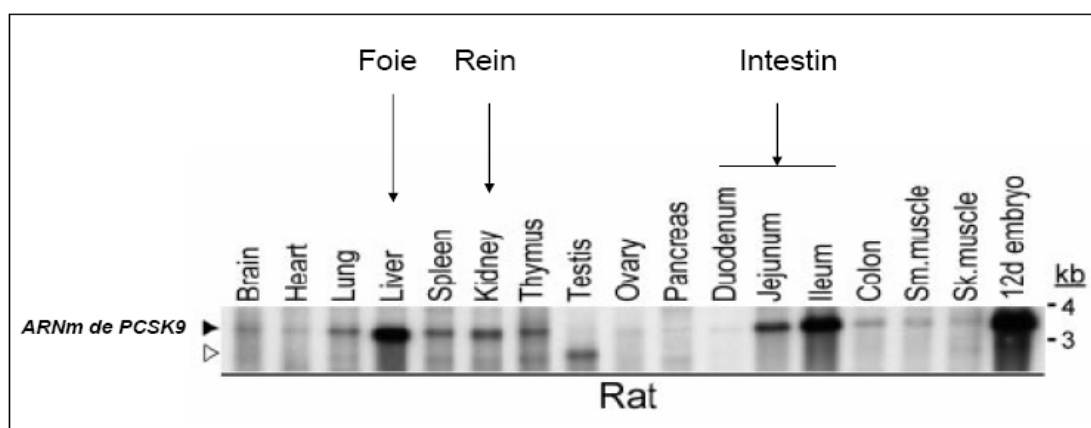


Figure 9 : Expression de PCSK9 par Northern Blot dans différents organes chez le rat. (d'après Seidah *et al.* 2003)

Chez les mammifères, PCSK9 apparaît très tôt lors de l'embryogenèse, plus particulièrement lors du développement du système nerveux. En effet, PCSK9 est fortement exprimée dans le télencéphale et le cerebellum, mais à l'âge adulte son expression semble être restreinte au niveau de la région du pédoncule olfactif (Seidah *et al.*, 2008)

III.2. Domaines protéiques et cristallographie de PCSK9

III.2.1. Domaines protéiques

La figure 10 représente la structure protéique de PCSK9 :

- une séquence signal (signal peptide : SP) constitue les 30 premiers acides aminés,
- le prodomaine : acides aminés 31 à 152,
- Le domaine catalytique, très conservé par rapport aux autres PCs, comprenant les acides aminés 153 à 452,
- un domaine C-terminal riche en histidines et cystéines appelé CHRD, de l'acide aminé 453 à 692.

La structure de PCSK9 diffère de celle des autres PCs par le fait qu'elle ne possède pas de domaine P (Naureckiene *et al.*, 2003). Chez les autres PCs, ce domaine P est nécessaire pour les différents processus de repliement dans l'espace et de régulation de ces protéases (Zhou *et al.*, 1999). Par contre, le domaine CRD est entièrement spécifique à PCSK9 (Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007).

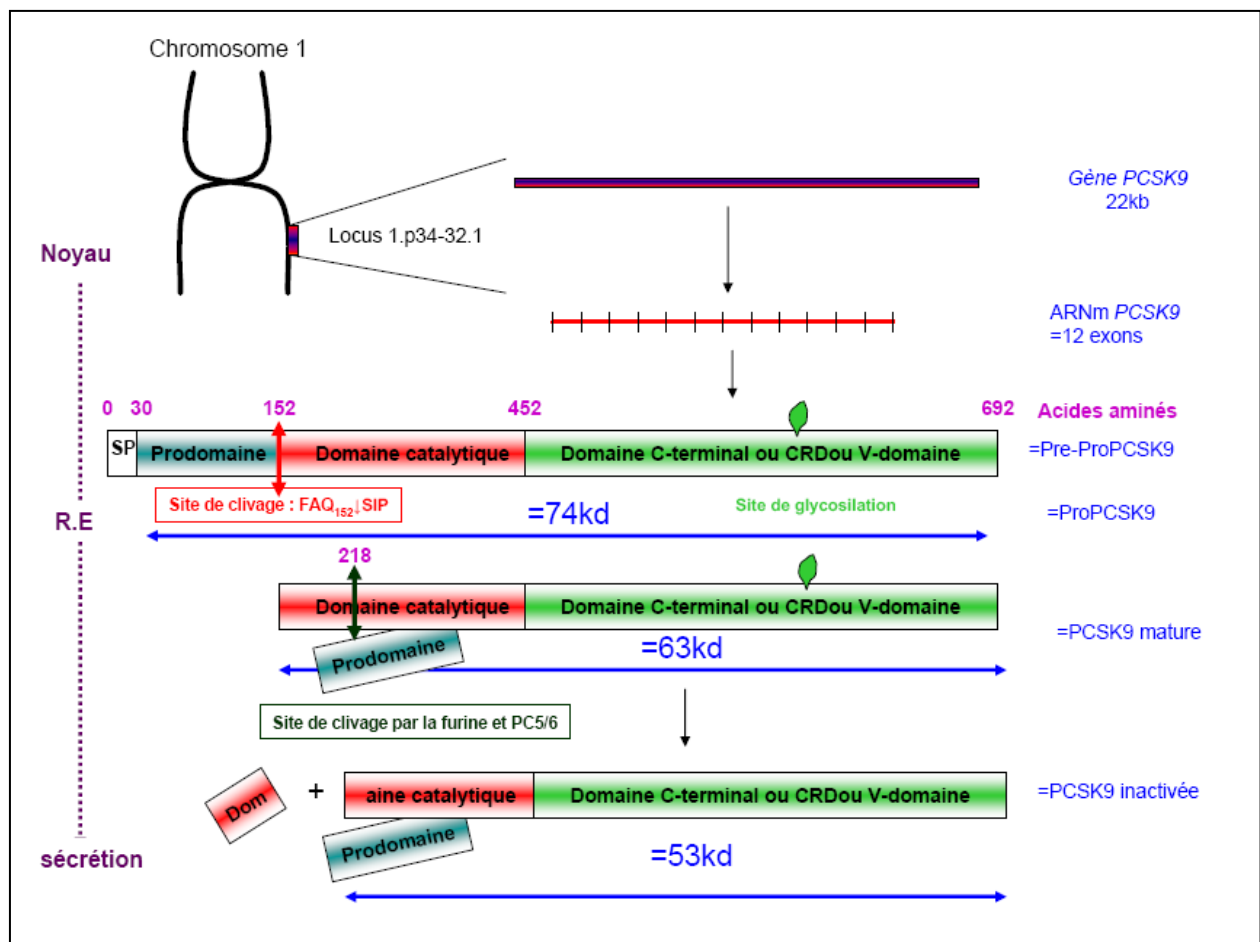


Figure 10 : Structure schématique de PCSK9

Il faut également noter que PCSK9 subit des modifications post-traductionnelles :

- Une glycosilation au niveau de l'acide aminé N533 (Seidah *et al.*, 2003)
- Une sulfatation sur l'acide aminé Y38 (Benjannet *et al.*, 2006)
- Une phosphorylation des acides aminés S47 et S688 (Dewpura *et al.*, 2008). Cet événement semble être crucial pour la régulation de l'activité de PCSK9.
- Dans certaines lignées cellulaires, PCSK9 est retrouvé clivée en une protéine de 53 kDa. Ce clivage à l'arginine 218, serait dû à l'intervention de deux autres PCs, la furine et PC5/6 qui entraînent une inactivation de PCSK9 (Benjannet *et al.*, 2004; Benjannet *et al.*, 2006).
- Enfin, une équipe a montré qu'*in vitro*, en conditions spécifiques de pH, de température et dès la concentration physiologique de 0.5 à 1 µg/ml, PCSK9 semble avoir des propriétés de dimérisation et de trimérisation. L'association entre protéines PCSK9 s'effectuerait grâce au domaine catalytique. De plus cette nouvelle caractéristique de PCSK9, aurait pour conséquence une augmentation de la dégradation du LDLR (Fan *et al.*, 2008).

III.2.2. Structure cristallographique

La purification et l'élucidation de la structure cristallographique de PCSK9 en 2006 (Figure 11) ont révélé son association avec son prodomaine. Ces travaux ont permis d'avancer dans la compréhension des interactions entre le prodomaine et le site catalytique. Ces résultats permettent également de prédire les effets des mutations de *PCSK9* sur le repliement de la protéine et d'utiliser ces indications pour la mise au point d'inhibiteurs de l'interaction de PCSK9 avec le LDLR.

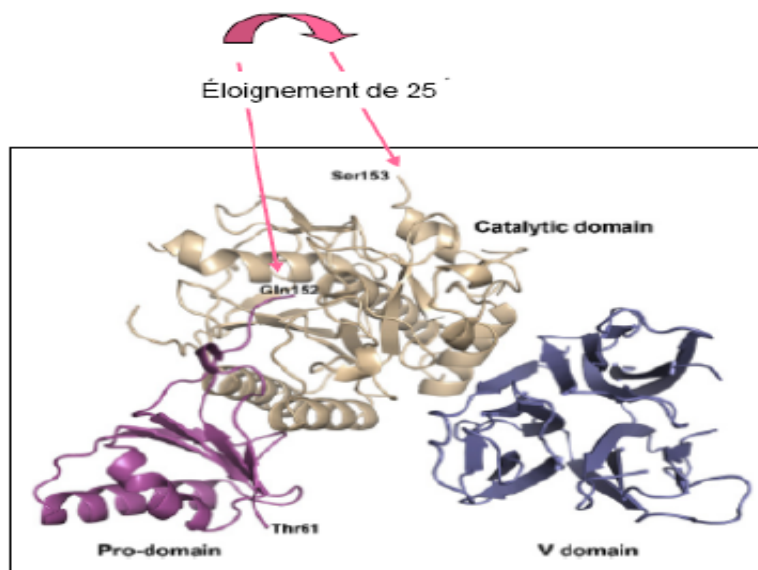


Figure 11 : Structure cristallographique de PCSK9

(D'après Piper et al., 2006)

III.2.1.1 Le prodomaine : peptide inhibiteur de l'activité catalytique de PCSK9

Le prodomaine, peptide de 14kd, reste lié de manière non covalente par les résidus d'acides aminés de 149 à 152 (Piper *et al.*, 2007) ou 147 à 152 (Cunningham *et al.*, 2007) à la poche catalytique de PCSK9 (Figure12. A et B). En empêchant l'accès de ligands exogènes au site catalytique, il jouerait le rôle d'un peptide inhibiteur de l'activité catalytique de PCSK9 (Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007).

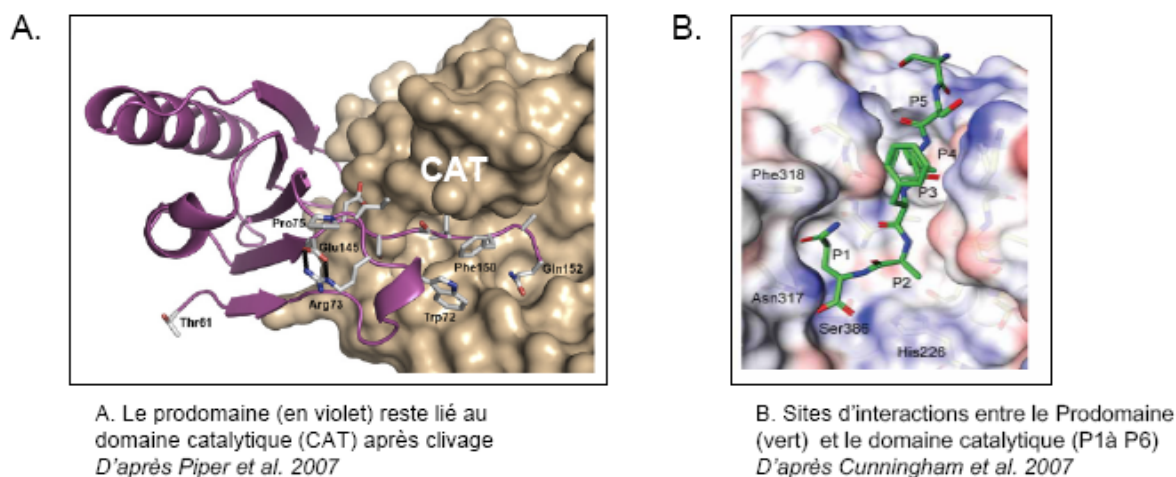


Figure 12 : Interaction du prodomaine avec le domaine catalytique de PCSK9

L'équipe de Cunningham a plus précisément décrit les sites d'interaction les plus importants du prodomaine en nommant chaque point de contact du prodomaine - P1 à P6- avec les différentes cavités du domaine catalytique -S1 à S4-.

- La glutamine en 152 forme une liaison hydrogène avec l'asparagine en 317 (« trou à oxyanion ») et interagit très faiblement avec la phénylalanine en 318. Il s'agit du site P1.
- Le site P2 correspond à l'alanine 151 décrit comme « plongeant » dans la région S2 de la poche catalytique.
- La région S3 interagissant avec le site P3 représenté par la phénylalanine en 150 et le tryptophane en 72 n'est pas bien définie, mais semble être importante pour le maintien du prodomaine en place.
- Le site P4, représenté par la Valine en 149, est « enfoui » au sein d'un site hydrophobe de la poche catalytique -S4- composé des acides aminés : Leucine 253, Valine 261, Leucine 289 et Leucine 297.

Il existent deux autres sites P5 et P6 qui n'interagissent pas avec des cavités spécifiques du domaine catalytique.

Les auteurs suggèrent d'étudier plus précisément les sites d'interaction de S1 à S4 pour le développement d'inhibiteur de PCSK9 (Cunningham *et al.*, 2007)

III.2.1.2. Le domaine catalytique

La structure cristallographique du domaine catalytique de PCSK9, est similaire à celle des autres PCs. Son architecture est composée de 7 feuillets- β parallèles pris en « sandwich » entre 2 hélices- α . Il est également à noter la présence de trois ponts dissulfures (Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007).

Après autoclivage, la partie N-terminale constituée d'une hélice- α , commençant par l'acide aminé numéro 153, subit un déplacement dans l'espace, de 25Å par rapport à la terminaison C-terminale du prodomaine représentée par l'acide aminé numéro 152 (Figure 11). Ce changement conformationnel est nécessaire pour la sécrétion de PCSK9 (Piper *et al.*, 2007).

L'équipe de Piper *et al.* a également mis en évidence la présence de deux boucles dans le domaine catalytique.

- La première relie les acides aminés 168 à 175.
- La deuxième joint les acides aminés 212 à 218.

Cependant de par la faible densité en électron de ces deux boucles, les auteurs n'ont pas pu les prendre en considération pour l'élaboration du modèle cristallographique de PCSK9.

Comme pour toutes les autres protéases de la famille des subtilisines, le domaine catalytique est actif grâce à la présence d'une triade d'acides aminés : l'acide aspartique en position 186, l'histidine en 226 et la serine en 386. L'asparagine en 317, stabilisateur « du trou à oxyanion » ou « de la poche catalytique » est aussi capitale pour l'activité de PCSK9 (Piper *et al.*, 2007).

Enfin, Il faut également noter que la poche catalytique des autres protéases est négativement chargée tandis que celle de PCSK9 est neutre. Ceci semble être crucial pour la spécificité de reconnaissance du substrat de PCSK9 (Cunningham *et al.*, 2007). En effet, contrairement aux autres PCs PCSK9 est avec S1P la seule PC clivant après des résidus d'acides aminés non basiques (Naureckiene *et al.*, 2003).

III.2.1.3. Le domaine C-terminal ou CHRD ou V-domain

Le CHRD (Cystein and Histidine Rich Domain) également appelé V-domaine, est décrit comme étant composé de trois sous domaines (SD1 à SD3) de 6 feuillets β distincts, empaquetés symétriquement les uns sur les autres, sans hélice- α mais stabilisés par trois ponts dissulfures. (Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007) (Figure 13A). La présence des résidus de cystéines permet ainsi la liaison des feuillets β 1 à β 6 (résidus 457-527, 534-601, 608-679), β 2 à β 6 (477-526, 552-600, 626-678), et enfin β 3 à β 5 (486-526, 552-600,

626-678). Le feuillet $\beta 4$ ne possède pas de pont dissulfure, il semblerait plus « flexible » dans l'espace (Cunningham *et al.*, 2007).

L'équipe de Hampton propose le concept que le domaine C-terminal de PCSK9 soit présenté comme un arrangement en hétérotrimères, structure similaire à celle de la famille des résistines. Ces dernières sont des protéines plasmatiques de type cytokine, impliquées dans l'installation de l'obésité et du diabète. (Hampton *et al.*, 2007) (Figure 13B).

Cette observation renforce notre hypothèse, précédemment décrite, selon laquelle PCSK9 serait impliquée dans le syndrome métabolique. Afin de vérifier cela, la dernière partie de mes travaux de thèse a porté sur l'étude de l'implication de PCSK9 dans des modèles animaux de diabète et d'insulinorésistance (*voir la partie « résultats »*).

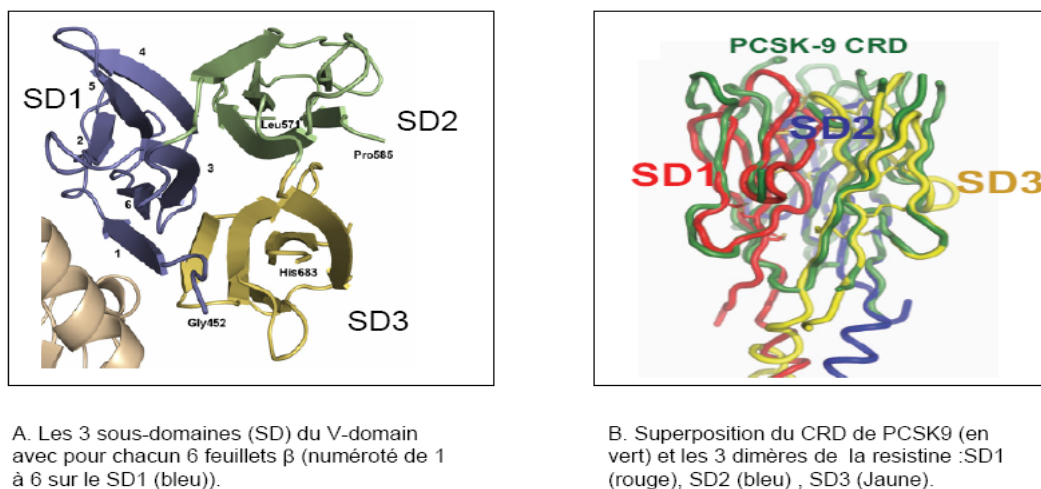


Figure 13 : Le domaine C-terminal de PCSK9
(d'après Piper *et al.*, 2007 et Hampton *et al.*, 2007)

Le domaine CHRD interagit avec le domaine catalytique en formant soit :

- des liaisons hydrogènes, c'est le cas des liaisons entre les acides aminés Asp480 et Glu481-Cys526 (du CHRD) et respectivement Thr407 et Gln413 (du domaine catalytique)
- des liaisons hydrophobes du type de van der Waals (Piper *et al.*, 2007).

L'équipe de Piper a également montré un enrichissement en résidus de histidines au niveau du domaine C-terminal. Ceci est une caractéristique des domaines de liaisons protéine à protéine dépendantes du pH. Ces observations suggéreraient que le « domaine V » soit impliqué dans les liaisons avec l'EGF-A du récepteur aux LDL. En effet, la liaison « PCSK9-LDLR » serait beaucoup plus forte dans l'endosome à pH 5,2 par rapport à pH 7.4

(Piper *et al.*, 2007). Cette hypothèse a été vérifiée et validée par l'équipe de Kwon *et al.* (*cf. la partie dédiée au « mode d'action de PCSK9 sur le LDLR » III.5.*).

III.3. Activité autocatalytique de PCSK9

PCSK9 clive-t-elle un autre substrat qu'elle-même ? Cette question n'est toujours pas résolue aujourd'hui. Mais comme la structure cristallographique le démontre, il est très vite apparu que des conditions exceptionnelles seraient requises pour libérer le site catalytique de la présence du prodomaine.

PCSK9 est avec SK1/S1P la seule PC clivant après des acides aminés non basiques. Le site d'autoclivage de PCSK9 est le suivant : **VFAQ152↓SIP** (Naureckiene *et al.*, 2003). Ce clivage a lieu dans le RE et est capital pour que PCSK9 puisse être sécrétée. Le prodomaine libéré reste cependant fortement lié à PCSK9 de manière non covalente (Seidah *et al.*, 2003;Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007). Comme nous l'avons vu auparavant pour la furine, il est admis que pour la plupart des PCs, un deuxième autoclivage ait lieu pour libérer le prodomaine et activer la protéase avant sa sécrétion. Pour PCSK9, l'absence ou la présence d'un deuxième autoclivage n'a pas encore été mise en évidence. Mais la protéine purifiée reste liée au prodomaine, suggérant que c'est sous cette forme que PCSK9 circule dans le plasma.

Une controverse persiste sur la possibilité de doser l'activité d'autoclivage de PCSK9. Elle tient à l'impossibilité de reproduire les résultats obtenus par Naureckiene *et al.* qui a développé un test fluorogénique basé sur le clivage par la protéine recombinante d'un peptide correspondant au site de clivage du prodomaine. Le peptide, porteur d'un « quencher » et d'un fluorophore, émet de la fluorescence lorsqu'il est clivé. (*Ces aspects techniques seront développés dans la partie « Travaux personnels »*). Aucune autre équipe n'a réussi à reproduire les résultats de Naureckiene *et al.* Cependant les raisons de cet échec restent floues puisque les conditions expérimentales n'ont pas été clairement détaillées.

Toutefois, nous avons réussi à appliquer le test de Naureckiene *et al.* en choisissant de mesurer l'activité de lysats cellulaires, sans étape de purification de PCSK9.

En effet, Une partie de mon travail de thèse a été consacrée au développement d'un test d'activité de PCSK9. Le test de Naureckiene *et al.* a été adapté pour mesurer l'activité autocatalytique de PCSK9 endogène et non pas purifiée dans des lignées de cellules hépatocytaires mais aussi ex-vivo dans des hépatocytes primaires de souris WT ou PCSK9^{-/-} afin de valider la spécificité de ce test. Les résultats sont en cours de révision pour une future publication (*cf. la partie « Travaux personnels »*).

III.4. PCSK9 : une protéine circulante

PCSK9 est considérée comme une hormone circulante (Zhao *et al.*, 2006), sa concentration dans le plasma humain est estimée par ELISA à 50 ng/ml lorsqu'un ELISA utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine entière a été utilisé. D'autres études basées sur l'analyse de western blot après immunoprécipitations, ou l'utilisation en ELISA d'anticorps polyclonaux donnent des chiffres dix fois supérieurs. (Costet *et al.*, 2008). La concentration circulante de PCSK9 semble néanmoins corrélée à celle en LDL-c circulants et en cholestérol total (Mayne *et al.*, 2007; Alborn *et al.*, 2007). Nous attendons cependant les résultats de dosages sur les cohortes initiales des études ARIC et de la Dallas Heart Study (Cohen *et al.*, 2006). Par ailleurs, il n'existe pas encore de données sur les concentrations circulantes des divers variants naturels.

In vitro, il a été mis en évidence une liaison possible entre PCSK9 et les lipoprotéines : LDL et HDL, mais pas VLDL (Fan *et al.*, 2008).

Comme le démontre l'équipe de Lagace *et al.* sur des souris parabiotiques, PCSK9 circulante aurait un mode d'action endocrine sur le LDLR. En effet, les auteurs ont mis au point une technique où il s'agissait de mettre en commun la circulation sanguine d'une souris WT avec celle d'une souris transgénique surexprimant PCSK9 dans le foie. La libération de PCSK9 dans la circulation sanguine des souris WT entraîne une forte diminution de l'expression du LDLR à des niveaux quasiment indétectables (Lagace *et al.*, 2006).

D'autres études sont venues appuyer ces résultats. En effet, l'infusion de PCSK9 directement dans la circulation sanguine de souris WT a été effectuée par deux autres équipes. Elles mettent en évidence une réduction de 90% des LDLR préférentiellement au niveau hépatique en seulement 2 heures après injection de 30-32 µg de protéine recombinée de PCSK9 directement dans la circulation sanguine. La demie vie de la protéine PCSK9 semble être très courte, elle est de l'ordre de 5 minutes (Grefhorst *et al.*, 2002) à 15 minutes (Schmidt *et al.*, 2008b).

De plus, PCSK9 paraît être principalement éliminée par le foie dès 15min après injection dans la circulation sanguine. Cependant, il doit exister un autre mécanisme d'épuration de PCSK9 indépendant du LDLR, puisque les souris KO-*LDLR* évacue 60% de la protéine PCSK9, le pourcentage dépendant du LDLR est donc de seulement 40% (pour revue, Costet *et al.* 2008).

Enfin, PCSK9 semblerait être dégradée avec le LDLR dans le lysosome, il n'y aurait pas de recyclage (Zhang *et al.*, 2008).

III.5. Mode d'action de PCSK9 sur le LDLR

III.5.1. Rappels sur le LDLR

III.5.1.1. Du gène à la protéine

La découverte du *LDLR* (Brown and Goldstein, 1986) a permis de comprendre le mécanisme d'épuration hépatique du LDL-c. Le gène de 45kb codant pour le LDLR est situé sur le bras court du chromosome 19, et est constitué de 18 exons et 17 introns, correspondants à un ARNm de 5.3kb.

Le LDLR est ubiquitaire dans l'organisme, cependant il est plus fortement exprimé dans les tissus fortement demandeurs en cholestérol.

Le LDLR est une protéine transmembranaire possédant 5 domaines structuraux principaux (Figure 14) (Rudenko *et al.*, 2002)

o Partie extracellulaire :

- Une premier domaine correspondant au domaine de liaison au ligand (LDL ou VLDL), il est constitué de 7 sous-domaines riches en résidus de cystéine allant de R1 à R7, appelés « ligand binding repeats ».
- Le domaine "EGF-like precursor homology" est constitué successivement de deux sous-domaines « EGF-like » A et B, suivi d'une structure nommée « β -propeller » (=YWTD) à 6 hélices et enfin un troisième sous-domaine « EGF-like » C. Ce dernier est nécessaire à la sécrétion du LDLR.
- Le domaine « O-linked sugar », il s'agit d'une région riche en sucre permettant de relier la partie extracellulaire au reste du LDLR

o Partie intracellulaire

- un domaine transmembranaire
- une queue cytoplasmique de 50 acides aminés contenant la séquence ARH, nécessaire pour l'internalisation du LDLR

III.5.1.2. Transport intracellulaire du LDLR et liaison aux particules à apoB et apoE

Le LDLR est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme d'un précurseur de 860acides aminés (pour revue, S. Marsot, *Hypercholestérolémies primaires*). Au cours de son trafic dans le RE puis dans l'appareil de golgi, il perd sa séquence signal et subit une glycosylation pour atteindre le poids moléculaire de 160kDa. Il rejoint ensuite la

surface cellulaire et en particulier les régions riches en clathrines, où il lie les apoB ou apoE des lipoprotéines.

La partie extracellulaire du LDLR subi un changement de conformation en fonction du pH (Rudenko *et al.*, 2002) (Figure 14) :

- A pH neutre, le domaine extracellulaire est en conformation linéaire. Il s'agit de la conformation du LDLR lorsqu'il est à la surface de la cellule qui lui permet de lier les particules de LDL ou VLDL via les « ligand-binding repeats » R4 et R5. Ceci déclenche l'endocytose de vésicules recouvertes de clathrines. La liaison d'une protéine adaptatrice au domaine intracellulaire du LDLR est nécessaire à son internalisation. Il s'agit de la protéine ARH.
- L'acidification du pH dans les endosomes entraîne une modification conformationnelle du LDLR. Le domaine extracellulaire se replie pour former une structure dite en « épingle à cheveux ». R4 et R5 se retrouve lier au « β -propeller » (Brown *et al.*, 1986). Ce changement de conformation entraîne la dissociation du LDLR et de la lipoprotéine. Celle-ci est dirigée vers les lysosomes, alors que le récepteur est recyclé vers la surface cellulaire.

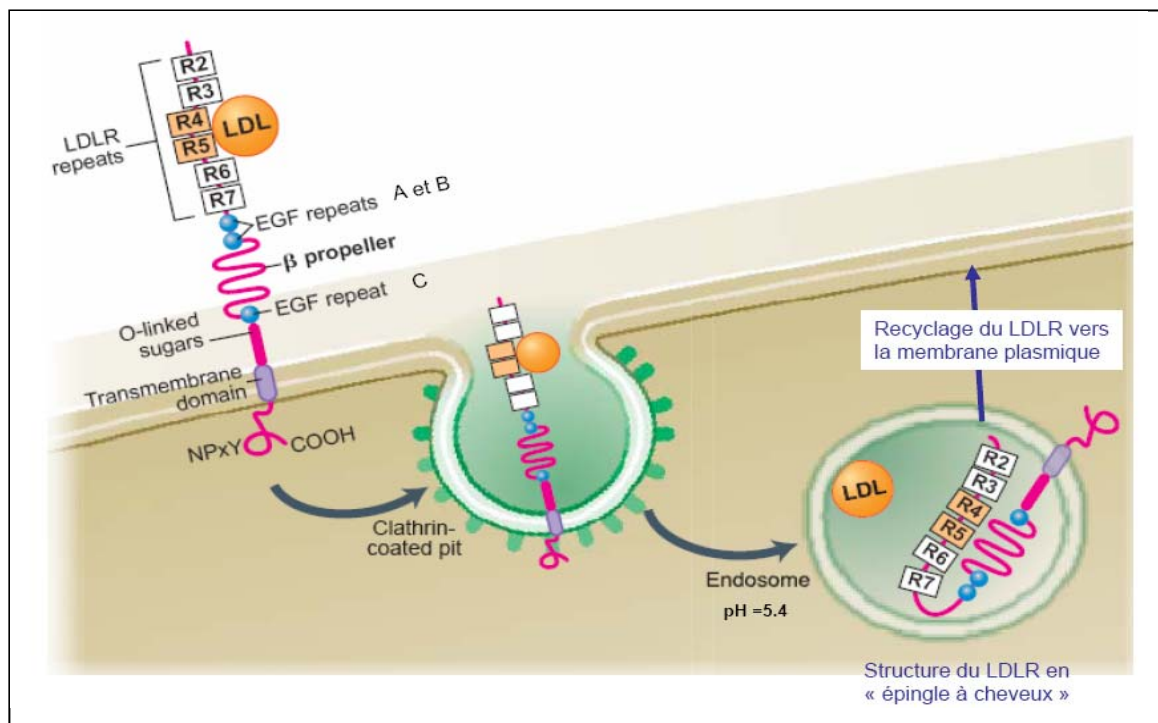


Figure 14 : Structure du LDLR: changement de conformation dépendant du pH
(modifiée d'après Rudenko *et al.*, 2002)

III.5.2. PCSK9 entraîne la dégradation du LDLR

III.5.2.1. Evidences expérimentales in vitro, in vivo

PCSK9 agit sur le LDLR de manière post-transcriptionnelle en accélérant la dégradation de la protéine et sans en affecter l'ARNm (Maxwell *et al.*, 2005). Les premières preuves sont apparues lorsque la surexpression de PCSK9 a entraîné un phénotype proche de celui des souris LDLR^{-/-} (Maxwell and Breslow, 2004). Ces résultats ont été confirmés dans les hépatomes HepG2, à l'aide d'expériences de « pulse-chase ». (Figure 15).

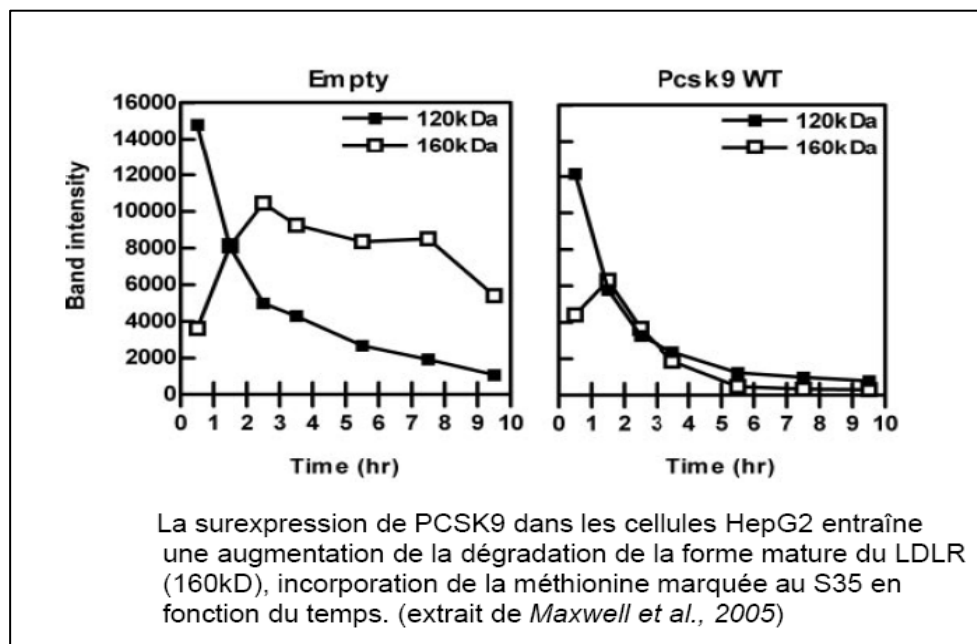


Figure 15 : Dégradation post-transcriptionnelle du LDLR médiée par PCSK9

D'autres équipes dont notre laboratoire ont également démontré que la surexpression de la forme Wild type ou de mutations gain de fonction de PCSK9 (S127R et F216L) chez la souris, se caractérise par une hypercholestérolémie (Maxwell *et al.*, 2004; Lalanne *et al.*, 2005; Maxwell *et al.*, 2005). En revanche en 2005, Rashid *et al.* publient des résultats concernant l'étude de souris PCSK9^{-/-}. Le fait d'invalider PCSK9 chez la souris entraîne une augmentation très importante de l'expression hépatique du LDLR ce qui a pour conséquence directe d'accélérer la clairance des lipoprotéines circulantes et en particulier les HDL, on observe une diminution de 30% du HDL-c chez la souris PCSK9^{-/-} par rapport à les souris WT. Le HDL étant le transporteur majeur du cholestérol chez la souris, sa diminution se traduit par une réduction du taux plasmatique en cholestérol de 47% (soit 46 mg/dl pour PCSK9^{-/-} par rapport à 96 mg/dl pour les souris WT) (Rashid *et al.*, 2005).

Récemment, a été réalisé un modèle de souris knock-out *PCSK9* conditionnel, spécifiquement invalidées au niveau du foie. Les résultats de cette étude ont permis de comparer la diminution des taux de cholestérol dans le plasma des souris spécifiquement invalidées au niveau du foie (27%) par rapport aux souris totalement invalidées pour *PCSK9* (42%). Ceci a également permis de statuer sur le fait que *PCSK9* issu du foie n'est impliqué qu'à 2/3 dans le phénotype lié au cholestérol. Ainsi, cette étude suggère que l'effet de *PCSK9* provenant d'autres voies extra-hépatiques n'est pas négligeable (Zaid *et al.*, 2008). L'intestin pourrait être mis a contribution, il s'agit d'une autre étude actuellement en cours d'investigation dans notre laboratoire.

III.5.2.2. *PCSK9* se lie au domaine extracellulaire du LDLR

Une première étude menée par Zhang *et al.* a permis de mettre en évidence la liaison de *PCSK9* au domaine « EGF precursor homology » du LDLR plus précisément au niveau de l'EGF-A (Figure 14). Cette liaison nécessite la présence de calcium et est spécifique du LDLR, puisque d'après cette même étude le VLDLR ainsi que les autres membres de la même famille, ne semblent pas se lier à *PCSK9*. La spécificité d'interaction entre *PCSK9* et le LDLR réside, en partie, en la présence d'un acide aminé hautement conservé : la leucine en position 318 de la protéine LDLR. Cet acide aminé est en effet absent dans l'EGF-A des autres récepteurs de la même famille, son introduction en position équivalente au sein de l'EGF-A du VLDLR permet « sa liaison artificielle » à *PCSK9*. Cependant, d'autres protéines comme notch, fibrillin TGF beta binding protein, ont également une leucine en position équivalente au sein de leur domaine EGF, malgré cela elles ne se lient pas à *PCSK9*. Ceci suggère que la leucine en 318 est certes indispensable pour la liaison de *PCSK9* à l'EGF-A du LDLR mais que cet acide aminé n'est pas le seul déterminant de la spécificité de liaison de *PCSK9* au LDLR. Il doit probablement exister d'autres sites d'interaction (Zhang *et al.*, 2007).

Le site de liaison de *PCSK9* sur le LDLR est éloigné du site de liaison du ligand : LDL ou β -VLDL, de plus, sa délétion n'affecte pas la liaison de *PCSK9* au LDLR, ni la dégradation de celui-ci (Zhang *et al.*, 2007). Ceci implique que la liaison de *PCSK9* au LDLR peut se faire avec ou en absence de ligand lipoprotéique sur le LDLR.

De plus, l'étude de la structure cristallographique du complexe formé par *PCSK9* et l'EGF-A montre que c'est le domaine catalytique de *PCSK9* qui est impliqué dans la liaison avec l'EGF-A via des liaisons hydrogènes. En effet, l'équipe de Kwon *et al.* démontre qu'il s'agit de la portion d'acides aminés allant des résidus 367 à 381 du domaine catalytique qui est en contact avec l'EGF-A. En outre cette étude révèle que l'acide aminé Asp-374 de *PCSK9* est fortement impliqué dans cette liaison (Kwon *et al.*, 2008). Cette information est

d'autant plus importante, que nous savons que la mutation PCSK9-D374Y se traduit par une augmentation de l'affinité de PCSK9 pour le LDLR. Ceci a pour conséquence une augmentation de la dégradation du LDLR et entraîne des taux de LDL-c circulant élevés dans le plasma de patients porteurs de cette mutation (*cf. la partie « mutations de PCSK9 » III.9.*). En outre, les acides aminés Arg-194 et phe-379 de PCSK9 sont également cruciaux pour la formation du complexe PCSK9-EGF-A. Enfin, cette étude a permis de démontrer qu'il n'y avait pas de contact entre le prodomaine de PCSK9 et le LDLR ni même entre le domaine C-terminale de PCSK9 et ce dernier (Kwon *et al.*, 2008).

Des expériences d'immunoprécipitations du LDLR et de différentes régions de PCSK9, ont montré que seul le domaine N-terminal de PCSK9 était capable de se lier au LDLR. Cependant, cette région N-terminale de PCSK9 seule, n'est pas suffisante pour entraîner la dégradation du LDLR. Seule, la présence de la protéine mature PCSK9 entière et non mutée permet de réduire l'expression du LDLR (Zhang *et al.*, 2008). L'hypothèse serait qu'une séquence signal pour la voie lysosomale soit présente sur PCSK9.

En se liant au domaine EGF-A, PCSK9 empêche le repliement en « épingle à cheveux » du domaine extracellulaire du LDLR décrit par Brown et Goldstein. Le LDLR étant complexé à PCSK9 ne peut être recyclé, il est dirigé vers le lysosome pour être dégradé. Ce concept est récapitulé dans le schéma ci-dessous (Figure 16) :

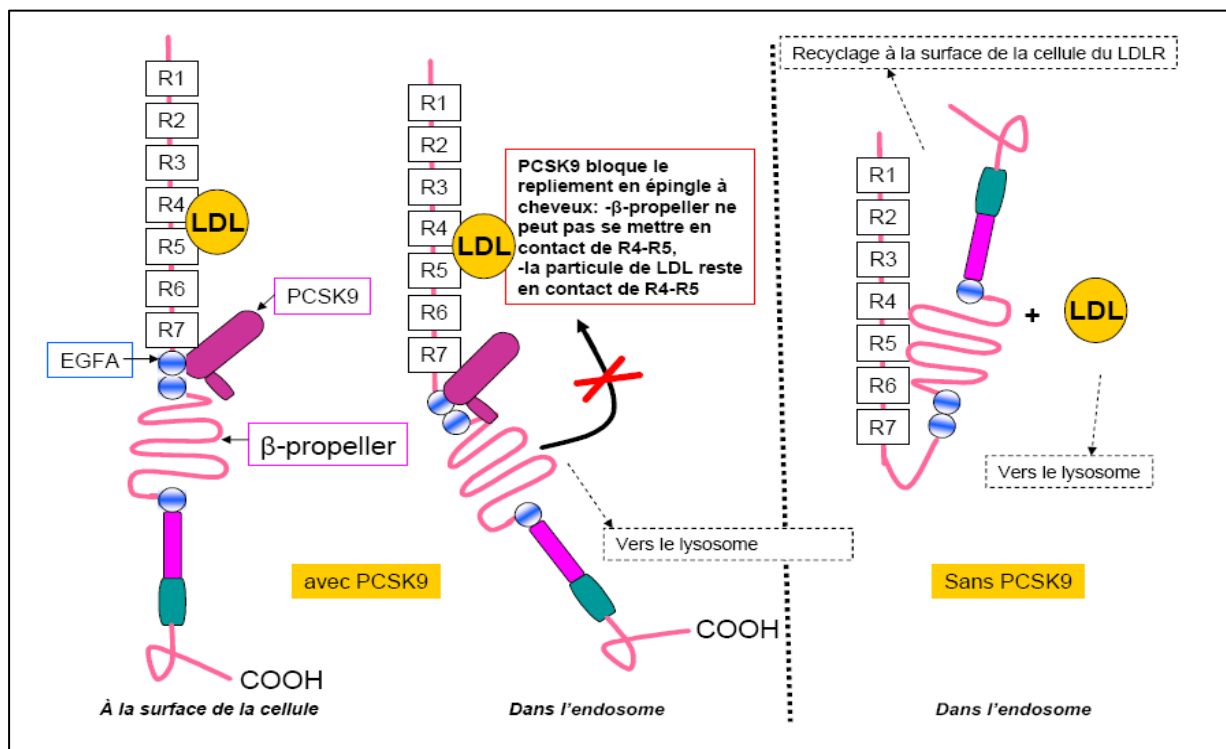


Figure 16 : PCSK9 se lie à l'EGF-A du LDLR et bloque le repliement en « épingle à cheveux » du LDLR

Une mutation quelconque d'une ou plusieurs (au plus quatre) des « ligand binding repeats » -y compris R4 et R5- n'interfère pas avec la dégradation du LDLR. Cependant, la présence d'au moins 3 de ces répétitions est indispensable à cette dégradation. Par contre, PCSK9 se lie au LDLR et est internalisé avec celui-ci malgré la mutation de ces répétitions.

En revanche, la délétion du β -propeller ne permet plus la dégradation du LDLR, même si la liaison de PCSK9 au LDLR et leur internalisation est maintenue (Zhang *et al.*, 2008).

Enfin, la délétion de l'EGF-B ou du domaine « O-linked sugar » n'interfère pas avec la dégradation du LDLR médiée par PCSK9. Pour ce qui concerne l'EGF-C, sa délétion, d'emblée ne permet plus au LDLR de quitter le réticulum endoplasmique (Zhang *et al.*, 2007).

III.5.2.3. Mécanismes de la dégradation du LDLR par PCSK9

Il faut distinguer l'action intracellulaire de PCSK9 sur le LDLR, de celle de la protéine circulante. C'est cette dernière qui a été le plus étudiée, car c'est la cible thérapeutique stratégiquement la plus évidente. Pourtant, à l'heure actuelle, la part respective dans la dégradation du LDLR de chacune de ces voies reste inconnue, et il reste difficile de prédire quelle activité résiduelle serait présente si on inhibait 100% des interactions de la protéine circulante avec le LDLR.

- Voie intracellulaire :

Très tôt, l'équipe du Pr Breslow a montré que la surexpression cellulaire d'un variant catalytiquement inactif de PCSK9 (S402A) n'entraînait pas de dégradation du LDLR (Maxwell *et al.*, 2004). Diminuer le clivage de PCSK9 est donc théoriquement une stratégie thérapeutique valide. Les auteurs avaient noté que la forme précurseur du LDLR était légèrement dégradée lorsque PCSK9 est surexprimée, mais de manière moins spectaculaire par rapport à la forme mature. Par la suite, les études de variants non -ou très peu- sécrétés, ont confirmé qu'il existe une voie de dégradation intracellulaire (Maxwell *et al.*, 2005).

L'ARH est une protéine adaptatrice indispensable à l'endocytose du complexe LDLR-LDL. Lorsque PCSK9 est surexprimé chez la souris *KO-ARH* ou la souris WT, l'expression du LDLR est diminuée de la même manière dans les deux types de souris (Park *et al.*, 2004). A partir de ces données, il s'est développé l'hypothèse que PCSK9 pourrait agir sur le LDLR de manière intracellulaire avant même son adressage à la surface cellulaire.

- Voie extracellulaire :

PCSK9 est rapidement secrété par les hépatocytes, et son internalisation se fait grâce à sa liaison avec le LDLR (Lagace *et al.*, 2006). En aval, ces deux protéines sont colocalisées dans l'endosome et les lysosomes. L'internalisation de PCSK9 liée directement au domaine extracellulaire du LDLR a été mise en évidence sur des cellules HepG2 (Lagace *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2007). Lorsque PCSK9 est d'origine extracellulaire, son action sur le LDLR requiert la présence de la protéine ARH. En effet, lorsque PCSK9 est ajouté de manière exogène dans le milieu d'hépatocytes primaires de souris *Arh*^{-/-}, (Lagace *et al.*, 2006) ou lorsque le gène codant pour l'ARH est éteint par l'utilisation de RNAi interférents dans des cellules HepG2 (Qian *et al.*, 2007), la dégradation du LDLR n'est plus observée.

Deux équipes (McNutt *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007) ont mis au point une technique de co-transfection en *trans*, dans des cellules HEK-293, afin de produire une protéine mutant de PCSK9 (S386A) liée de manière chimérique à son prodomaine et capable d'être secrétée tout en étant catalytiquement inactive. Celle-ci fut ensuite purifiée et ajoutée au milieu de culture cellulaire de cellules HepG2. Cette protéine était parfaitement capable de réduire le nombre de LDLR à la surface cellulaire ainsi que de la capture du LDL-c. Ces résultats sont en faveur du fait que la protéine PCSK9 circulante n'ait aucune activité protéolytique sur le LDLR et agirait comme une protéine chaperonne.

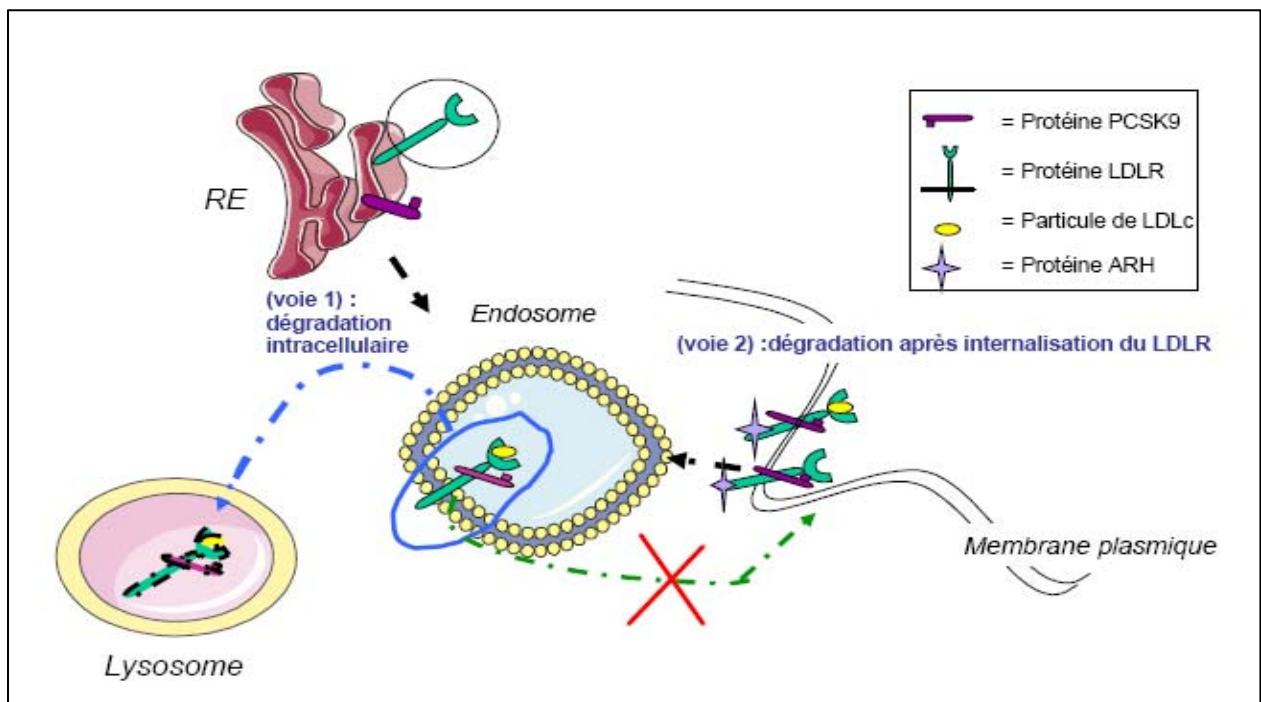


Figure 17 : Représentation schématique des voies de dégradation du LDLR par PCSK9

Bien que ces deux mécanismes de dégradation du LDLR aient très probablement lieu en même temps dans la cellule, il reste à savoir laquelle de ces deux voies est prédominante sur l'autre. L'hypothèse serait que l'une des deux voies soit privilégiée par rapport à l'autre selon les conditions pathologiques ou physiologiques. Ainsi, la voie de dégradation extracellulaire serait la voie physiologique. En situations pathologiques, comme par exemple une surexpression de PCSK9, la forte accumulation de PCSK9 intracellulaire entraînerait une liaison avec le LDLR bien plus précocement, c'est-à-dire avant même la sécrétion. Le complexe serait dirigé directement vers les lysosomes (Lagace *et al.*, 2006; Pandit *et al.*, 2008).

En outre, suivant la mutation de PCSK9, une voie de dégradation du LDLR serait privilégiée par rapport à une autre. Ceci a été mis en évidence dans un modèle *in vitro* de mutations de PCSK9 au niveau de la Serine en 127 et l'acide aspartique en 374. En effet, PCSK9 portant la mutation S127R étant beaucoup moins sécrétée, le phénotype gain de fonction observé ne peut être expliqué que par un mode d'action intracellulaire sur le LDLR (Pandit *et al.*, 2008). En revanche, pour la mutation D374Y de PCSK9, connue pour sa forte affinité pour le LDLR, la protéine PCSK9 qui en découle est autant sécrétée que la *WT*, de plus, lorsque cette protéine est ajoutée de manière exogène dans le milieu de cellules HepG2, la dégradation du LDLR observée est multipliée par 10 par rapport à PCSK9 non muté. Ces résultats suggèrent que pour cette mutation, le mode d'action de PCSK9 sur le LDLR privilégié est extracellulaire (Lagace *et al.*, 2006; Pandit *et al.*, 2008)

III.6. PCSK9 et les autres récepteurs de la famille du LDLR

Comme décrit précédemment, selon les résultats obtenus par Zhang *et al.* en 2007, PCSK9 se lie exclusivement au LDLR et pas aux autres membres de la même famille. De ce fait, seul le LDLR serait touché par la dégradation induite par PCSK9. Cependant, une autre étude menée par l'équipe de Poirier *et al.* montre que la surexpression de PCSK9 ou de son mutant D374Y est aussi bien capable d'induire la dégradation de deux autres membres de la famille du LDLR : le VLDLR et l'ApoER2. De plus cette dégradation est indépendante de la présence ou non du LDLR (Poirier *et al.*, 2008).

Enfin, récemment, une nouvelle étude est venue appuyer les résultats obtenus par l'équipe de Poirier *et al.* Shan *et al.* développèrent un test pour mesurer la liaison de PCSK9. Ils mirent en évidence que PCSK9 était capable de se lier directement et de manière dose-dépendante aux récepteurs LDLR, VLDLR et ApoER2. De plus, dans des cellules HepG2, ils démontrèrent que l'ajout d'un peptide synthétique mimant l'EGF-A du LDLR est capable de bloquer la dégradation du LDLR et rétablir ses fonctions de capture du LDL-c (Shan *et al.*, 2008).

III.7. PCSK9 et la production d'apolipoprotéines B

Il semblerait, qu'outre son rôle sur la dégradation du LDLR, PCSK9 puisse interférer dans le métabolisme des VLDL. Plusieurs études confortent cette hypothèse :

- Notre laboratoire a montré par étude de la cinétique de production de l'apoB-100 chez des patients porteurs de la mutation S127R, une surproduction de l'apoB-100 ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des particules VLDL et IDL (Ouguerram *et al.*, 2004).
- De plus, la surexpression de mutant de PCSK9 -D374Y et S127R- dans des cellules issues d'hépatome de rat, les McArdle-RH7777, entraîne une augmentation de la production d'apoB100 (Sun *et al.*, 2005).
- Notre laboratoire a également mis en évidence chez la souris, que la surexpression de PCSK9, entraîne non seulement une diminution de la clairance du LDL-c plasmatique mais également une augmentation de la sécrétion des VLDL par le foie (Lambert *et al.*, 2006).
- Enfin, une autre étude en cours d'investigation dans notre laboratoire montre également une diminution de la sécrétion d'apoB lorsque l'expression de PCSK9 est inhibée par des shRNA. En revanche, la surexpression de PCSK9 par adenovirus-PCSK9 entraîne une augmentation de la production d'apoB par les cellules Caco2 (Le May *et al.*, données en cours de révision cf. article en annexe)

Ces informations nous ont également mené à l'hypothèse d'une éventuelle implication de PCSK9 dans les maladies métaboliques liées à un défaut de sécrétion de VLDL comme l'insulinorésistance. Il s'agira de la dernière partie de mes travaux de thèse (cf. la partie « travaux personnels »).

III.8. Implication de PCSK9 dans la dégradation de BACE1

BACE1 (pour β -site Amyloid precursor protein (APP)-Cleaving Enzyme 1) est une enzyme importante pour la production du peptide amyloid- β qui est à l'origine du développement de la maladie d'Alzheimer. BACE1 est une cible thérapeutique importante dans ce domaine.

Après sa synthèse dans le RE rugueux, sept acides aminés lysine de BACE1 subissent une acétylation. Ce processus est nécessaire pour son transit vers l'appareil de Golgi. Les protéines BACE1 non acétylées restent bloquées dans le RE pour être ensuite dégradé dans un compartiment post-RE (Costantini *et al.*, 2007).

D'après une étude récemment publiée, Jonas *et al.*, suggère que PCSK9 prendrait en charge les protéines BACE1 non acétylées. En effet, la surexpression de PCSK9 diminue les

niveaux d'expression de BACE1, tandis que l'inhibition par RNAi de *PCSK9* augmente ces derniers. De plus ils démontrent clairement une stimulation de la dégradation de BACE1 par la protéine PCSK9 circulante (figure 18) (Jonas *et al.*, 2008).

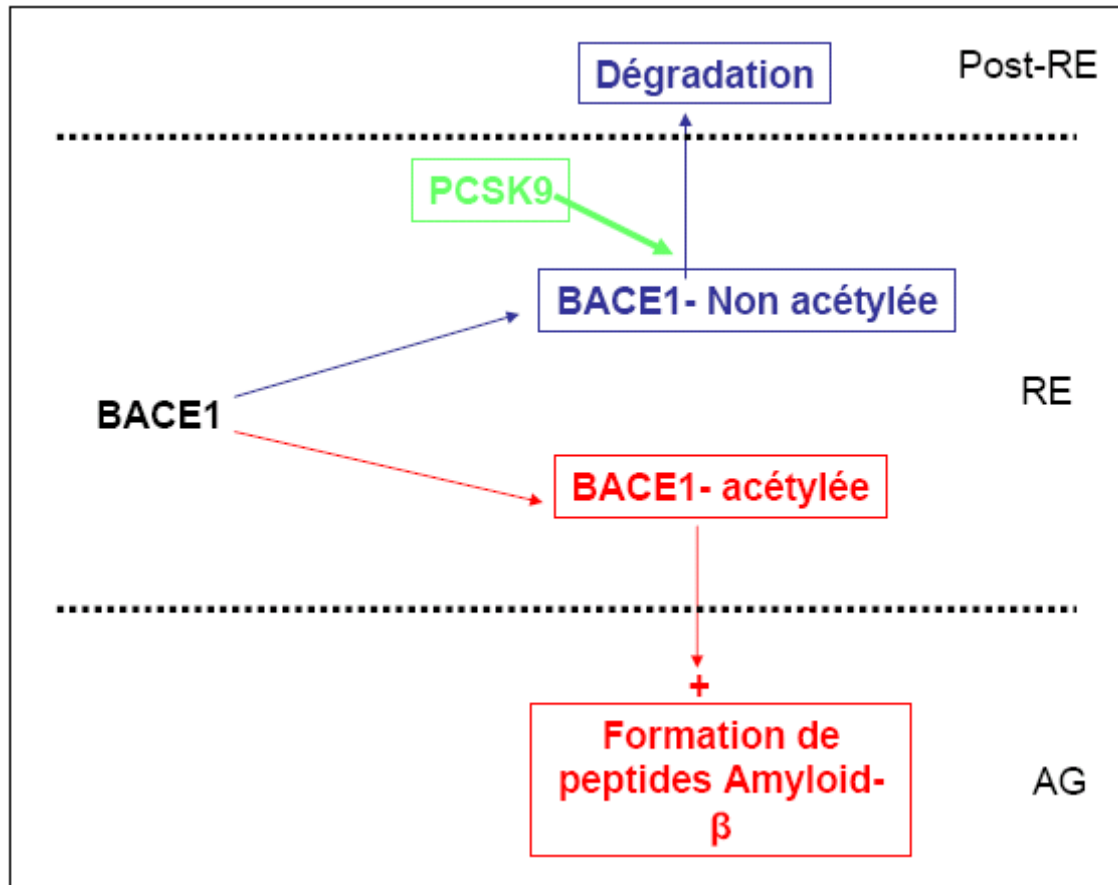


Figure 18 : PCSK9 : implication dans la prise en charge de la forme non acétylée de BACE1

En outre, cette étude montre que la forme précurseur du LDLR est également acétylée dans le RE, ce qui ouvre l'hypothèse d'une éventuelle prise en charge du LDLR non-acétylé par PCSK9 pour entraîner celui-ci vers la dégradation.

III.9. Mutations de *PCSK9*

La figure 19. répertorie les principales mutations de PCSK9 chez l'homme. Un classement selon leur caractère « gain de fonction » pour un phénotype hypercholestérolémie ou « perte de fonction » pour hypocholestérolémie y est indiqué (D'après la revue Costet *et al.*, 2008).

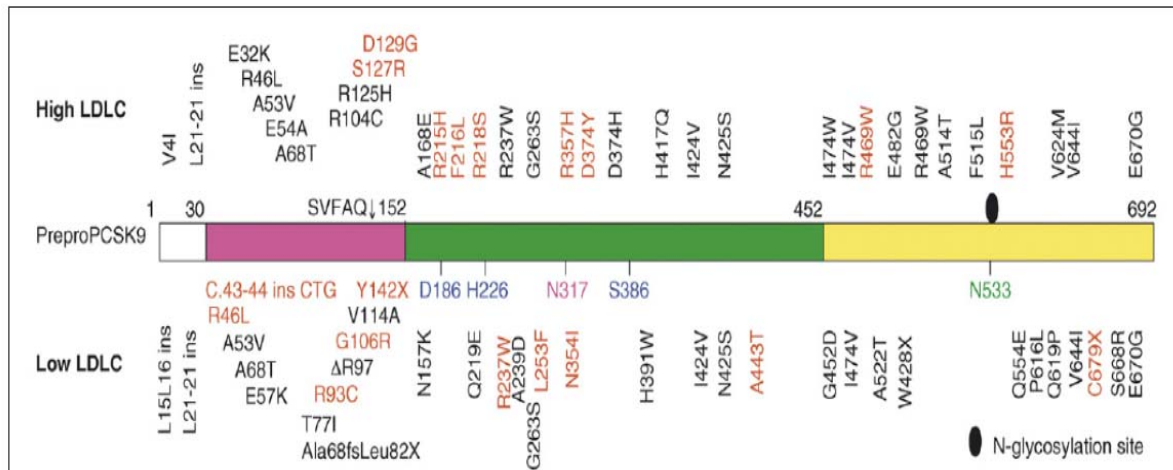


Figure 19 : Mutations de PCSK9 (d'après Costet et al., 2008)

Voici quelques caractéristiques de certaines mutations de PCSK9

III.9.1. Mutations gain de fonction :

En 2003, deux mutations au locus 1p32 ont été identifiées dans deux familles françaises. Ces mutations furent à l'origine de la découverte de *PCSK9* comme troisième locus de l'ADH.

La première mutation touche l'exon numéro 2 du gène *PCSK9*, la thymine en 625 est substitué par une adénosine ce qui résulte en un changement d'acide aminée en position 127, il s'agit de la mutation « S127R ». La deuxième mutation affecte *PCSK9* au niveau de l'exon numéro 4, la cytosine en position 890 est remplacé par une thymine ce qui donne une protéine mutée : « F216L » (Abifadel et al., 2003).

- La mutation S127R touche le prodomaine de PCSK9, elle est associée à une hypercholestérolémie modérée. La proprotéine PCSK9-S127R ne subit pas d'autoclavage et n'est donc pas sécrétée. Cette mutation de PCSK9 résulte cependant en une forte affinité pour le LDLR, 5 fois plus élevée par rapport à la version WT de PCSK9 (Cunningham et al., 2007). Restant théoriquement bloquée dans le réticulum endoplasmique, son mode d'action sur l'augmentation de la dégradation du LDLR reste assez énigmatique aujourd'hui.
- En revanche, la mutation F216L de PCSK9 touchant la boucle du domaine catalytique (Cunningham et al., 2007), est clivée et sécrétée comme la protéine sauvage. Son association avec une hypercholestérolémie serait expliquée par le fait qu'elle soit moins sensible au clivage d'inactivation par la Furine et PC5/6A, ce qui la rend beaucoup plus stable par rapport à la protéine sauvage (Benjannet et al., 2006). Son

accumulation dans la circulation serait à l'origine de l'augmentation de la destruction des LDLR à la surface cellulaire (Cameron *et al.*, 2006).

Une autre mutation PCSK9-D374Y associée à une hypercholestérolémie des plus sévères a été répertoriée. En comparaison avec des patients souffrants de FH porteur d'une mutation hétérozygote du LDLR, les patients porteurs de la mutation PCSK9-D374Y, sont plus atteints par l'hypercholestérolémie puisque leur taux de cholestérol total avant traitement est beaucoup plus élevé. De plus, divers traitements par des statines se révèlent inefficaces chez ces patients. Enfin, le caractère sévère de la mutation D374Y se traduit par une précocité de plus de 10 ans dans l'apparition des maladies cardiovasculaires (Naoumova *et al.*, 2005).

La mutation D374Y fut initialement décrite dans une étude clinique de l'Utah (Timms *et al.*, 2004) puis dans trois familles britanniques (Sun *et al.*, 2005). La protéine qui résulte de cette mutation est clivée et sécrétée de manière comparable à la forme sauvage de PCSK9. Ses propriétés de dégradation envers le LDLR s'expliquent par le fait qu'elle ait une très haute affinité pour ce dernier, 10 fois supérieure à celle de la protéine PCSK9 sauvage.

D'autres mutations de PCSK9, le plus souvent du type « faux sens », ont été mises en évidence, la mutation R218S et R357H (Allard *et al.*, 2005). Des formes très sévères d'hypercholestérolémie observées chez certains patients, se sont avérées être des doubles mutations du LDLR et de PCSK9 : R469W, N425S, R496W, E228K. Il y aurait donc un effet additif des deux mutations du LDLR et de PCSK9 (Pisciotta *et al.*, 2005).

III.9.2. Mutations perte de fonction

Les études cliniques en rapport avec PCSK9 ont montré que des mutations perte de fonction de ce gène étaient associées à des niveaux très bas de LDL-c. Ces résultats ont dès lors fortement contribué à considérer PCSK9 comme une cible thérapeutique très prometteuse.

Une investigation, Dallas Heart Study (DHS), portant sur le séquençage de la région codante de PCSK9, dans une population « échantillon » de 128 individus dont les niveaux de LDL-c étaient bas a été menée aux Etats-Unis. Cette étude a permis d'établir un lien entre des mutations dites « non sens » dans un allèle de PCSK9 et le phénotype « hypocholestérolémie ». Ceci a permis d'introduire la notion de « perte de fonction » pour certaines mutations de PCSK9. En effet, cette étude a révélé qu'une personne sur 50 d'origine noire-américaine porte une mutation « non sens » de PCSK9.

Les cytosines en position 426 ou 2037 sont remplacées par respectivement une guanine ou une alanine, ceci se traduisant par l'introduction d'un codon stop à l'origine de deux protéines tronquées Y142X ou C679X respectivement (Cohen *et al.*, 2005). PCSK9-C679X, est clivée normalement mais reste bloquée dans le réticulum endoplasmique. La mutation Y142X, ne produit pas de protéine PCSK9 détectable, il semblerait que l'ARNm soit dégradé avant la traduction (Zhao *et al.*, 2006).

L'étude prospective de grande envergure Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC), est basée sur la comparaison de l'incidence des maladies coronariennes, (CHD : Coronary Heart Disease) selon la présence ou non de mutations de PCSK9 associées à des taux de LDL-c bas. Cette étude comprenait 3363 individus noire-américains et 9524 d'origine caucasienne suivis durant une période de 15 ans. Les mutations Y142X et C679X ont une fréquence combinée de 2,6% chez les noire-américains, et sont associées à des taux de LDL-c diminués de 28% ainsi qu'à une réduction de 88% du risque d'apparition des CHD. Cependant, les deux mutations Y142X et C679X ont une faible prévalence chez les caucasiens. Par contre l'étude ARIC a révélé la présence chez les caucasiens d'une mutation « faux sens » en position 137 du gène *PCSK9*, où la substitution d'une guanine par une thymine est à l'origine de la forme R46L de PCSK9. Cette mutation apparaît à la fréquence de 3,2 % chez les individus d'origine caucasienne et très faiblement chez les afro-américains (moins de 0,6%). Elle est associée à une réduction du taux de LDL-c de 15% et le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires est diminué de 47% (Cohen *et al.*, 2006). Elle fut également retrouvée dans 4 familles norvégiennes et italiennes (Berge *et al.*, 2006; Fasano *et al.*, 2007).

Dans une étude zimbabwéenne, sur une population de 653 femmes, la mutation C679X a été retrouvée avec une prévalence de 3,7%. Les femmes portant cette mutation avaient des niveaux de LDL-c relativement bas $0,62 \pm 0,14$ g/l par rapport aux personnes ne portant pas de mutation et dont les niveaux de LDL-c étaient de $0,85 \pm 0,28$ g/l. Cependant, une des femmes de cette étude s'est révélée être homozygote pour la mutation C679X, son taux de LDL-c était très bas, 0,15 g/l (Hooper *et al.*, 2007). Enfin, une autre femme issue de l'étude DHS portant la double mutation Y142X et $\Delta R97$ présente un taux de LDL-c extrêmement bas, par rapport aux personnes portant la mutation sur un seul allèle (Zhao *et al.*, 2006).

D'autres mutations comme la L253F ont été répertoriées grâce aux études DHS et Cook County Study. Cette mutation faux sens de PCSK9 est également associée à une hypocholestérolémie, soit une réduction du taux de LDL-c de 30% (Kotowski *et al.*, 2006). L'étude DHS a de plus révélée la présence de la mutation A443T, les homozygotes présentaient une diminution du taux de LDL-c de 29,2%, tandis que les hétérozygotes

avaient des niveaux de LDL-c réduits de seulement 3,5%. Trois autres mutations de PCSK9 : la G106R, la N157K et la R237W ségrégent également avec le phénotype « hypocholestérolémie » dans deux familles norvégiennes (Berge *et al.*, 2006).

Ces données eurent un impact très fort dans l'appréciation de PCSK9 comme nouvelle cible thérapeutique. En effet la réduction de la mortalité associée aux mutations perte de fonction de PCSK9 est beaucoup plus efficace que celle observée lors des essais cliniques de plus courte durée employant des statines (Horton *et al.*, 2007). Donc, ces résultats suggèrent que la prise en charge d'une diminution du cholestérol est d'autant plus efficace dans le retardement de l'apparition des risques cardiovasculaires, qu'elle est mise en place très tôt dans la vie du patient.

De plus, des patients souffrant de HF due à une mutation hétérozygote du LDLR et portant en plus une mutation perte de fonction de PCSK9 répondent aux statines de manière beaucoup plus efficace (Berge *et al.*, 2006).

Au vu de ces données, l'objectif initial de mon projet de thèse a été d'étudier les voies de répression de PCSK9 par les fibrates -agonistes du récepteur nucléaire PPAR α - dans l'espoir de les envisager en traitement combiné avec les statines pour diminuer les niveaux de LDL-c. Avant d'exposer les résultats que j'ai obtenus, voici un chapitre consacré à la régulation transcriptionnel de PCSK9 ainsi qu'aux facteurs de transcription impliqués dans celle-ci.

Chapitre 3 : Régulation de PCSK9

I. Les récepteurs nucléaires

I.1 Principe général de la signalisation par les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RN) sont des récepteurs solubles appartenant à la superfamille des facteurs de transcription contrôlant différentes fonctions physiologiques (métabolisme, reproduction...) (Figure 20).

Les RN sont activés grâce à la fixation d'un ligand spécifique, qui peut être naturel, c'est le cas d'hormone, d'acides gras ou bien des vitamines, ou de synthèse c'est le cas de différentes molécules pharmacologiques agonistes. Cependant de nombreux récepteurs nucléaires, dont le ligand n'est pas connu, sont qualifiés de récepteurs orphelins.

Les dimères de récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes cibles en se liant à l'ADN au niveau de séquences régulatrices appelées RE pour Response Element. Ces éléments de réponse sont constitués de deux copies d'une séquence consensus de nucléotides soit en répétition directe (DR pour Direct repeat), en répétition indirecte (IR pour Inverted Repeat) ou en répétition inversée (ER pour Everted Repeat). Ces deux séquences sont séparées par un nombre variable de nucléotides (Glass et al. 1994).

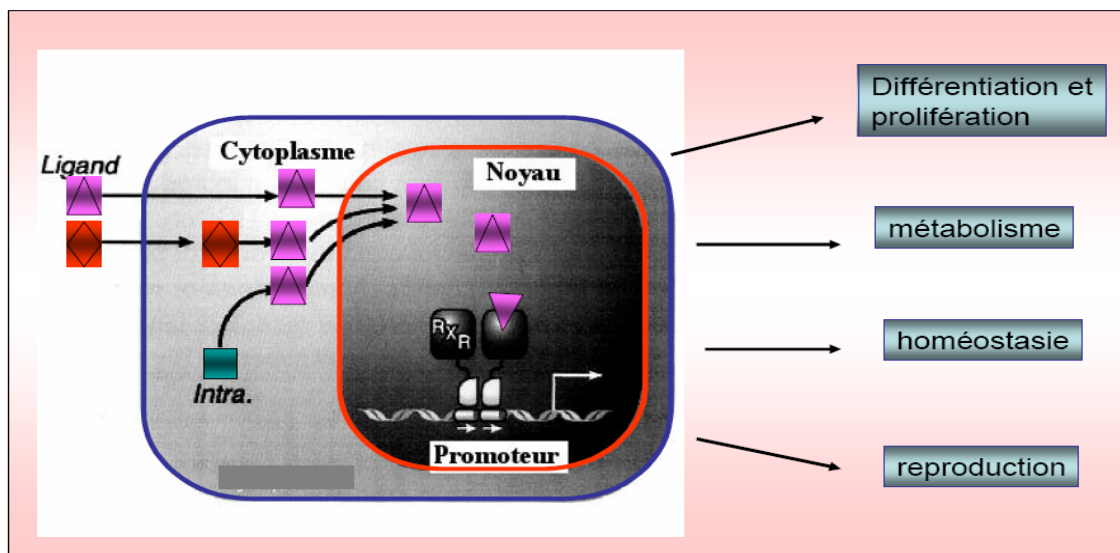


Figure 20 : Principe générale de la signalisation par les récepteurs nucléaires

I.2. Historique de la découverte des récepteurs nucléaires

Bien avant la découverte des gènes codant pour les récepteurs nucléaires, dans les années 1960, l'équipe d'Elwood Jensen, montrèrent que l'oestradiol était spécifiquement retenu dans certaines cellules cibles par des récepteurs décrits comme « ayant une très haute affinité pour cette hormone » (JACOBSON *et al.*, 1960). Ce n'est que vingt années plus tard que le gène codant pour le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes (GR) fut cloné par l'équipe de Ron Evans (Hollenberg *et al.*, 1985) suivi de près par le clonage du récepteur aux oestrogènes (ER) par les équipes de Pierre Chambon et Geoffrey Greene (Govindan *et al.*, 1985)

Des études phylogénétiques des récepteurs nucléaires montrèrent que l'émergence de ces récepteurs coïncide avec l'apparition des métazoaires, bien avant la division « vertébré-invertébré » (Owen and Zelig, 2000) (Figure 21).

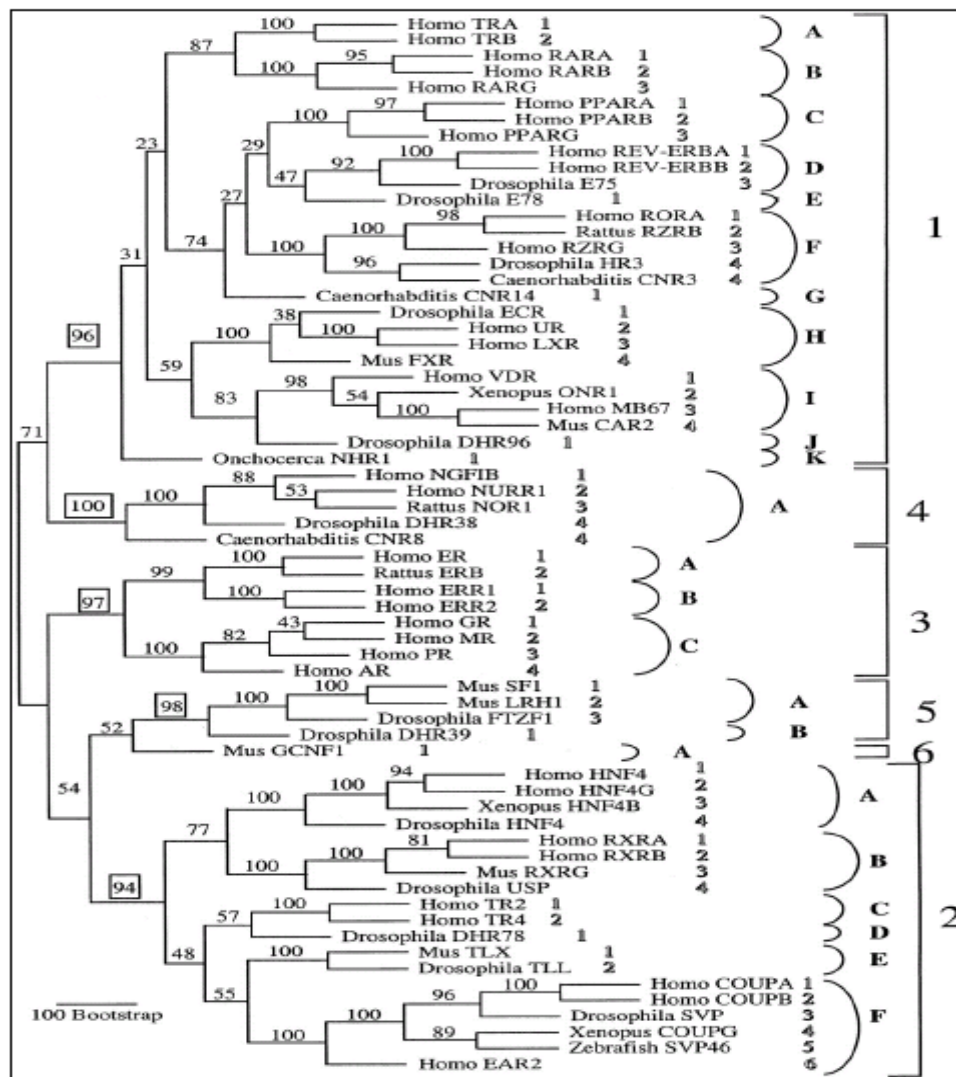


Figure 21 : La superfamille des récepteurs nucléaires

D'après le comité de nomenclature des récepteurs nucléaires, Cell, 1999

I.3. Structure générale des récepteurs nucléaires

Tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires ont une structure peptidique constituée de cinq régions fonctionnelles (Beckett, 2001) : (Figure 22)

- Le domaine A/B dont la séquence est très peu conservée parmi les RN, comprend une fonction activatrice indépendante de la présence du ligand, appelée AF1 (pour Activation Function 1). Elle est spécifique de certains promoteurs.
- Le domaine C, correspondant au domaine de liaison de l'ADN : DBD (DNA Binding Domain) est en revanche très conservé parmi les RN. Il permet la liaison spécifique à deux régions de l'ADN dites en « doigts de zinc », formées chacune par 4 cystéines.
- Le domaine D, faiblement conservé, correspond à une région charnière entre le domaine C et E. Son rôle n'est pas encore connu.
- le domaine E correspond au domaine de liaison du ligand : LBD (Ligand Binding Domain). Il contient de plus :
 - Une fonction activatrice de la transcription dépendante du ligand appelée AF2 (Activation Function 2). Son rôle est de recruter les co-régulateurs des RN après liaison du ligand
 - Une région dite d'interface de dimérisation : DD (Dimerization Domain) ou encore appelée D-box.
- Le Domaine F présent dans certains récepteurs et dont la fonction est mal comprise.

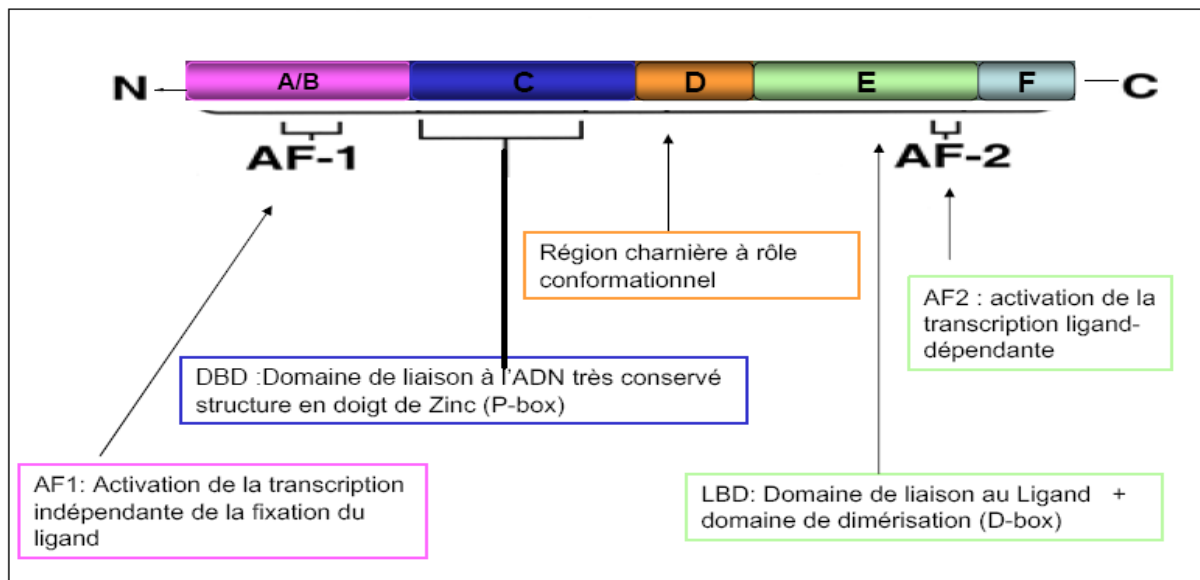


Figure 22 : Structure générale des Récepteurs Nucléaires

(D'après Aranda et al., 2001)

I.4. Mécanisme général de la régulation des gènes par les récepteurs nucléaires

La fixation du ligand entraîne l'activation du RN ce qui signifie un changement de conformation du domaine E, qui permet le remplacement des co-répresseurs par des co-activateurs (pour revue Aranda et al. 2001). Ainsi il y aurait deux situations : (Figure 23)

- Avant la fixation du ligand, les RN recrutent un complexe de co-répresseurs constitués principalement par SMRT et N-CoR, ainsi que différentes protéines ayant une activité histone désacétylase (HDAC), permettant ainsi la compaction de l'ADN et empêchant la machinerie transcriptionnelle de se positionner sur le site d'initiation, il n'y aura pas de transcription possible.
- Suite à la fixation d'un ligand, les RN recrutent des co-activateurs : un premier complexe SWI/SNF, qui permet le déplacement des nucléosomes, tandis qu'un deuxième complexe enzymatique histone acétylase, est chargé du déroulement de la chromatine. Enfin un troisième complexe TRAP/SMCC et ARC/DRIP est chargé de mettre en place la machinerie transcriptionnelle pour l'initiation de la transcription. (Robyr *et al.*, 2000; Aranda and Pascual, 2001).

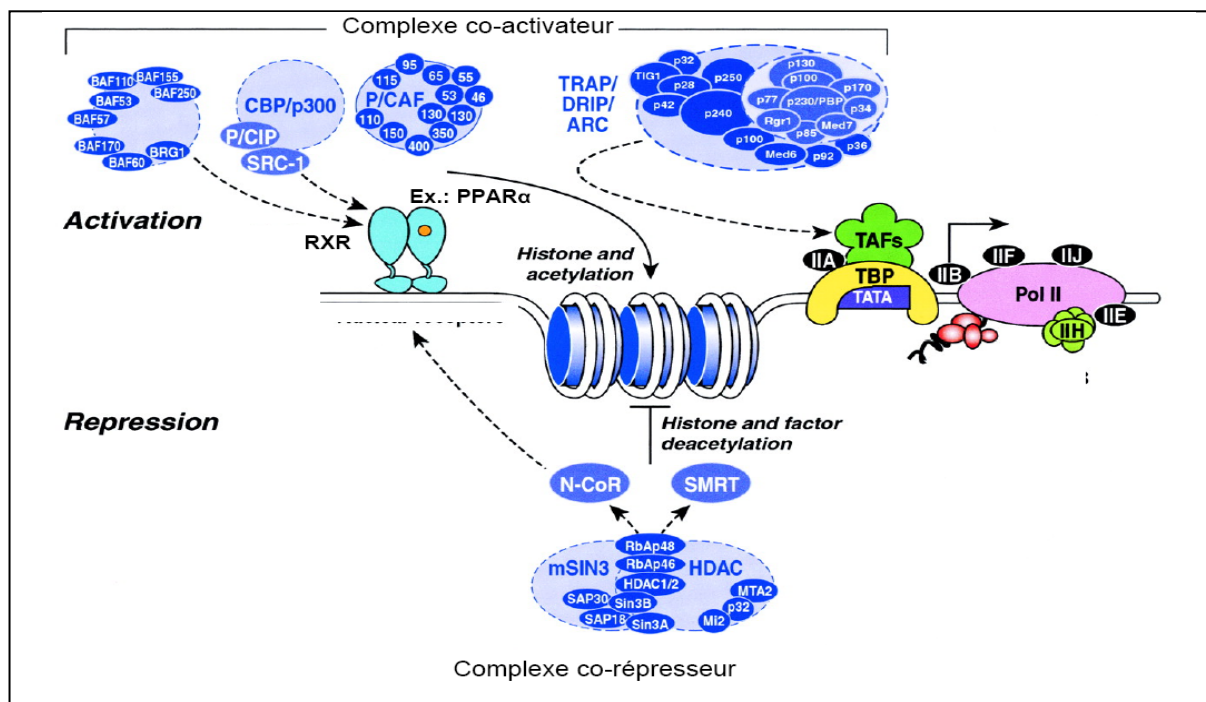


Figure 23 : Formation de complexes co-régulateurs (d'après Robyr et al., 2000)

I.5. Régulation des gènes par les Peroxysome Proliferator Activated Receptors (PPARs)

I.5.1. les PPARs

Les PPARs (Peroxysome Proliferator Activated Receptors) existent en trois isoformes codées par un gène différent : PPAR α (NRC1), PPAR β/δ (NRC2), PPAR γ (NR1C3) (Tableau 2)

	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
<u>Localisation</u>	 Foie Cœur Rein Cellules endothéliales Macrophages Cellules musculaires lisses	 Tissu adipeux Tissu mésentérique Colon T-cells Macrophages	 Divers tissus et cellules
<u>ligands</u>	PUFAs (AGPI) Fibrates	PUFAs Prostaglandines	PUFAs PGJ2 TZD

Tableau 2 : Les PPARs

Les PPARs s'hétérodimérisent avec un autre récepteur nucléaire : RXR (Retinoid X receptor) dont le ligand est l'acide rétinoïque 9-cis, un dérivé de la vitamine A (Desvergne and Wahli, 1999).

L'hétérodimère PPAR-RXR reconnaît un motif de l'ADN appelé PPRE (PPAR Response Element), il est formé de deux répétitions du demi site AGGTCA séparées par un ou deux nucléotides, il s'agit de DR-1 ou DR2 (Gervois *et al.*, 1999).

Les PPARs sont tout les trois activés par les acides gras polyinsaturés (AGPI ou PUFA) (Xu *et al.*, 1999).

- PPAR α est également activé par certains métabolites des acides gras comme les leucotriènes B₄, par exemple. Les agonistes synthétiques de PPAR α sont les Fibrates.

- PPAR β a de plus pour ligand les acides gras saturés et les prostaglandines.
- PPAR γ est activé par certaines prostaglandines notamment la PGJ2, les Thiazolidinediones en constituent un bon activateur d'origine synthétique.

I.5.2. PPAR α

I.5.2.1 Rôles dans le métabolisme des lipides

PPAR α est l'isoforme majoritaire dans le foie, et de manière générale dans tous les tissus dont les acides gras sont une source d'énergie importante. Les gènes régulés par PPAR α codent pour des protéines (transporteurs ou enzymes) impliquées dans le catabolisme des acides gras. Quelques exemples sont : l'acyl-CoA synthase (Schoonjans *et al.*, 1995), la carnithine palmitoyltransferase (CPT1), la Fatty acid Transport Protein (FATP) (Frohnert *et al.*, 1999), les enzymes de la β -oxydation, différents cytochromes notamment Cyp4a. En effet, la surexpression de PPAR α ou un traitement par des agonistes de PPAR α (les fibrates) entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras (Staels *et al.*, 2005).

PPAR α joue un rôle majeur dans la régulation de gènes du métabolisme des lipoprotéines et des triglycérides. (Desvergne *et al.*, 1999). En clinique, les patients hypertriglycéridémiques sont traités par les fibrates, agonistes synthétiques de PPAR α . En effet PPAR α réprime de manière indirecte la transcription de l'apolipoprotéine CIII (apoC-III) par un mécanisme faisant intervenir l'activation préalable de FOXO1 (Qu *et al.*, 2007). L'apo-CIII est connue comme étant un inhibiteur de l'enzyme LPL qui est chargée de dégrader les particules de VLDL en LDL.

PPAR α est également impliqué dans le remodelage des LDL petites et denses en particules plus grosses, ce qui les rend beaucoup plus affines pour le LDLR ((Guerin *et al.*, 1996).

En stimulant l'expression de l'apo-AI et l'apo-AII, PPAR α joue également un rôle dans l'augmentation des HDL.

En accord avec le rôle de PPAR α dans le catabolisme des acides gras, ses souris PPAR α -/- présentent une obésité spontanée et progressive, une stéatose hépatique avec dimorphisme sexuel (Costet *et al.*, 1998).

De plus, de concert avec LXR (autre RN), PPAR α serait impliqué dans l'efflux de cholestérol, observé dans le macrophage, en stimulant l'expression des transporteurs impliqués dans le transport inverse du cholestérol vers le foie : SR-B1 et ABCA1 (Chinetti *et al.*, 2001). PPAR α est pour cela un protagoniste majeur lors du processus d'installation de l'athérosclérose.

I.5.2.2. Rôles dans l'inflammation

Enfin, PPAR α est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (Figure 24). Il agirait en monomère dans l'inhibition de certaines voies impliquées dans l'inflammation : stat-3, P50/P52, Fos/Jun etc.

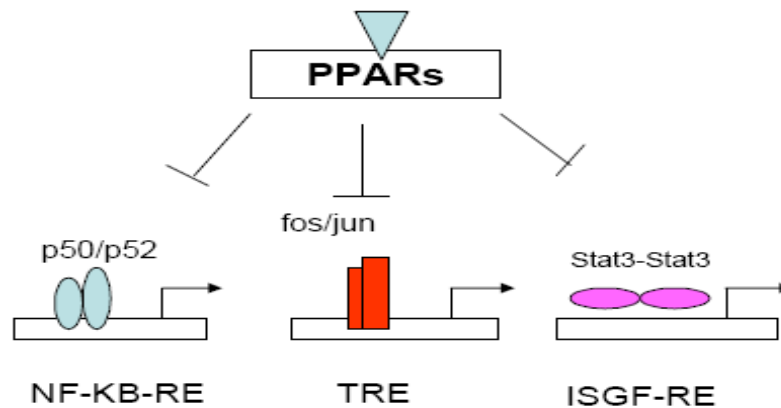


Figure 24 : Propriétés anti-inflammatoires de PPAR α

I.5.3. Les principaux rôles des autres PPARs : PPAR β/δ et PPAR γ

PPAR β a une distribution cellulaire ubiquitaire et joue un rôle dans la différenciation des adipocytes (Holst *et al.*, 2003). Il favorise la formation de petits adipocytes, plus sensibles à l'insuline (Wang *et al.*, 2003). Il est également impliqué dans l'oxydation des acides gras du tissu adipeux (Luquet *et al.*, 2003).

PPAR γ joue un rôle critique dans l'adipogénèse. En effet le traitement de fibroblastes ou myoblastes par les agonistes synthétiques de PPAR γ (TZD) entraîne systématiquement un changement du programme de différenciation de ces cellules en adipocytes. Les Thiazolidinediones sont très utilisées dans le traitement des diabétiques de type 2 pour leurs propriétés « insulinosensibilisatrices ».

I.6. Régulation de gène par les LXRs

I.6.1. Généralités

Les LXRs (Liver X Receptors) sont comme les PPARs des récepteurs nucléaires fonctionnant en hétérodimères avec RXR, et régulant les gènes cibles dont le promoteur contient un élément de réponse : LXRE (LXR Response Element) de type DR-4 (Janowski *et al.*, 1996).

Il existe deux isoformes de LXRs : LXR α (NR1H3) et LXR β (NRH2) (Janowski *et al.*, 1996). LXR α est très fortement exprimé dans le foie, le tissu adipeux, les muscles, les reins, l'intestin, et les macrophages. LXR β est exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus. Les ligands des LXRs sont issus des dérivés oxygénés du cholestérol : les oxystérols. L'un des agonistes synthétiques des LXRs est le TO901317. (Tableau 3).

	LXR α	LXR β
		
<u>Localisation</u>	Foie Macrophages	Expression ubiquitaire
<u>ligands</u>	TO901317 Oxystérols	TO901317 Oxystérols

Tableau 3 : Les LXRs

I.6.2. Rôles des LXRs

I.6.2.1. rôle dans l'homéostasie du cholestérol

Un des rôles principaux de ces récepteurs nucléaires est de réguler les gènes impliqués dans le métabolisme et le transport inverse du cholestérol. A titre d'exemple :

- LXR active la transcription du gène *CYP7a1* qui code pour une enzyme chargée de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol (Peet *et al.*, 1998)
- LXR stimule la transcription de gène codant pour des transporteurs du cholestérol comme ABCA1 (Costet *et al.*, 2000), les ABCG, la CETP, mais aussi pour l'apo-E.

I.6.2.2. Rôle dans l'homéostasie lipidique

LXR est également impliqué dans la régulation des gènes de la lipogenèse. En effet LXR active la transcription de *SREBP-1c* (Yoshikawa *et al.*, 2001), un facteur de transcription jouant un rôle crucial dans l'activation de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras (*voir partie SREBPs*). LXR active directement l'expression d'autres gènes de la lipogenèse comme par exemple la FAS pour (Fatty acid Synthase), la PLTP (Phospholipid Transfert Protein).

I.6.2.3. rôle dans l'homéostasie glucidique

Il semblerait que LXR réprime l'expression d'enzymes impliquées dans la voie de la néoglucogenèse, ce qui entraîne une diminution de la production de glucose dans le foie de souris diabétiques traitées par des agonistes de LXR. De plus, LXR augmente la sensibilité à l'insuline ce qui a pour conséquence une diminution de la glycémie chez ces mêmes animaux (Cao *et al.*, 2003).

II. La famille des SREBPs

II.1. Généralités

Les SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins), au nombre de trois, sont des facteurs de transcription synthétisés sous forme de précurseurs inactifs de 125kDa ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Lorsqu'ils sont sollicités pour l'activation de la transcription d'un gène cible, les SREBPs migrent dans des vésicules golgiennes en formant un complexe avec la protéine chaperonne SCAP (SREBP Clivage Activating Protein). Les SREBPs subissent alors un premier clivage protéolytique par une serine protéase nommée S1P (pour Site 1 protéase). Un deuxième clivage par une metalloprotéase appelée S2P (pour Site 2 protéase) permet la libération des formes actives des SREBPs. Les formes matures de 68kDa migrent ensuite dans le noyau de la cellule où, après dimérisation, ils se fixent sur les éléments de réponse de type SRE (Sterol Respons Element) contenus dans le promoteur des gènes cibles (Horton *et al.*, 2002).

A l'origine des trois protéines SREBPs, il existe deux gènes :

- Le gène *Srebf1* qui code pour SREBP-1a et SREBP1-c obtenues tous deux par épissages alternatifs.
- Le gène *Srebf2* qui code pour SREBP-2

II.2. Rôle des SREBPs

Les différents isoformes des SREBPs interviennent dans la régulation de différentes voies métaboliques. Malgré leur forte homologie de séquences, ils ont chacun un rôle propre (McPherson and Gauthier, 2004).

- L'isoforme SREBP-1a est plus spécifiquement localisé dans l'intestin et dans certains cas dans le tissu adipeux. Il est impliqué dans le métabolisme des lipides et en partie dans la synthèse du cholestérol

- SREBP-1c est majoritairement exprimé dans le foie, le tissu adipeux et les muscles. Son rôle est de réguler le métabolisme des lipides, en augmentant la transcription des gènes FAS et ACC, impliqués dans la synthèse des acides gras.
- SREBP-2 est retrouvé de manière ubiquitaire dans tous les tissus mais à des niveaux faibles. Son rôle est restreint à l'activation de la synthèse du cholestérol.

III. Régulation de PCSK9

III.1. Régulation par le cholestérol : mode d'action des SREBPs

Tout comme le LDLR, PCSK9 est positivement régulé par le facteur de transcription SREBP2 (Maxwell et al., 2003), mais aussi par les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol : les statines (Dubuc et al., 2004) et l'acide zaragozique (Bedi *et al.*, 2008) (Figure 25).

En 2003, les deux équipes d'Horton et de Maxwell ont identifié une activation de *PCSK9* par SREBP1-a et SREBP2, grâce à l'analyse par microarray de souris transgéniques pour *SREBP*, et de souris invalidées pour le gène codant pour SCAP (SREBP Cleavage Activating protein). L'étude de Maxwell et al., montre également une répression de *PCSK9* dans le foie des souris soumis à un régime enrichi en cholestérol (Maxwell *et al.*, 2003).

En 2006, notre équipe a cloné le promoteur de PCSK9 et identifié sur celui-ci un site de liaison à SREBP1c (Costet *et al.*, 2006). De plus, *in vitro*, il a été démontré que l'ARNm de PCSK9 est augmenté dans les cellules traitées par les statines -inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol- ou « déplétées » en cholestérol (Dubuc *et al.*, 2004).

Ces données sont récapitulées dans le schéma ci-dessous :

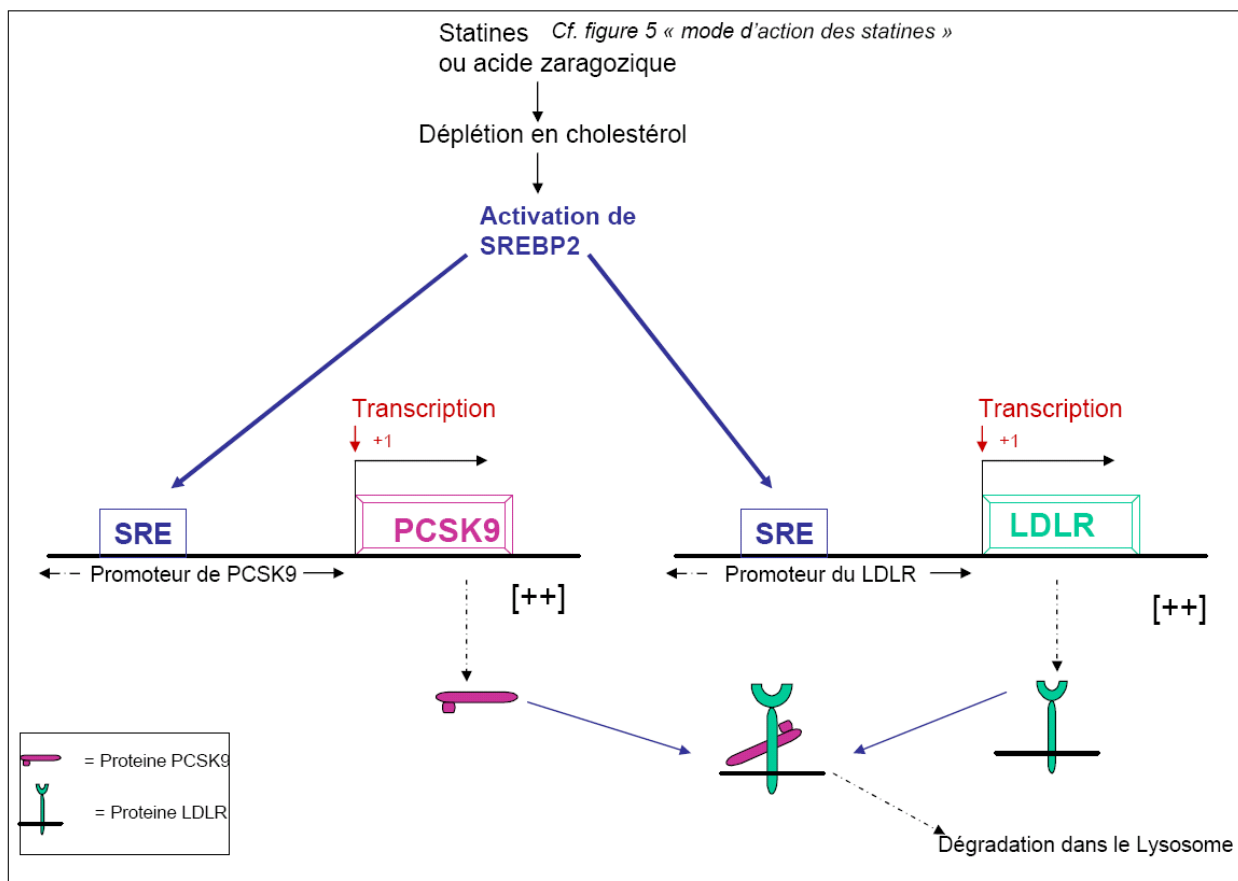


Figure 25 : Co-régulation de PCSK9 et du LDLR par SREBP2

Chez le rat, l'acide zaragozique (ZA), un inhibiteur de la squalène synthase -autre enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol- agit comme les statines en augmentant l'expression du LDLR mais aussi celle de PCSK9 (Bedi *et al.*, 2008).

En 2005, Rashid *et al.* notent une augmentation de la sensibilité au traitement par la lovastatine chez la souris KO-PCSK9. Ceci se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine LDLR ainsi que de la clairance des particules de LDL, résultant en la diminution du taux de cholestérol plasmatique par rapport au souris WT ou KO-PCSK9 non traitées par la lovastatine (Rashid *et al.*, 2005).

De plus, des patients souffrant de FH due à une mutation hétérozygote du LDLR et portant en plus une mutation perte de fonction de PCSK9 répondent aux statines de manière beaucoup plus efficace (Berge *et al.*, 2006)

III.2. Régulation par le statut nutritionnel

Notre laboratoire a démontré que l'expression de PCSK9 dans des hépatocytes de rat est très significativement augmentée par le T0901317 agoniste de LXR via l'activation de SREBP-1c (Costet *et al.*, 2006). Chez la souris, l'expression hépatique de PCSK9 est également régulée par l'insuline via SREBP-1c mais pas par le glucose. En effet, les résultats de cette étude montre une augmentation par deux fois de la transcription de PCSK9 lors d'un traitement par l'insuline. Il a également été mis en évidence in vivo, chez la souris, qu'un jeûne prolongé de 24h diminue de 50% l'expression de PCSK9. Mais de manière réversible, lorsque les souris sont re-nourries, l'expression de PCSK9 est restaurée, ce qui est corrélé à une augmentation concomitante du niveau d'insuline (Costet *et al.*, 2006).

Ces résultats nous ont conduit à nous poser la question d'une éventuelle implication de PCSK9 dans les modèles animaux insulino-résistants (cf. la *partie « Travaux personnels »*).

TRAVAUX PERSONNELS

Présentation du travail

Le premier objectif a été de caractériser la régulation négative de *PCSK9* par le récepteur nucléaire Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (*PPARα*) et ses agonistes synthétiques : les fibrates. Les résultats obtenus *in vitro* sur des lignées d'hépatocytes humains révèlent que l'activation de *PPARα* réprime la transcription de *PCSK9* -via une répression de son promoteur- supprime son activation par les statines, et potentialise l'effet des statines sur l'activité du LDLR. De plus, ces résultats révélèrent que la furine et PC5/6A -deux protéines convertases qui dégradent *PCSK9*- sont également régulées positivement par *PPARα*. Au-delà de *PCSK9*, cette étude a permis d'identifier une nouvelle famille d'enzyme régulée par les fibrates : les proprotéines convertases.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a porté sur la mise au point d'un test fluorométrique de dosage de l'activité autocatalytique de *PCSK9*. La spécificité de notre approche a été de considérer non pas la protéine recombinante purifiée, qui semble dépourvue d'activité pour une raison inconnue, mais la forme endogène des hépatocytes. Après avoir validé ce test sur des hépatocytes primaires de souris *PCSK9*^{-/-}, je l'ai appliqué à l'étude de divers mutants de *PCSK9*.

Enfin, suite aux travaux du laboratoire sur la régulation de *PCSK9* par l'insuline, j'ai également caractérisé l'expression de *PCSK9* dans divers modèles animaux de diabète et d'insulinorésistance.

Voici le plan d'étude suivi :

I. Etude de la régulation de *PCSK9*, de la Furine et PC5/6 par les fibrates :

Premier article publié dans « *J. Biol. Chem* ». cf. Page 71

II. mise au point d'un test d'activité de *PCSK9* in vitro :

Deuxième article en révision dans « *atherosclerosis* ». cf. Page 86

III.. Caractérisation de *PCSK9* dans des modèles animaux de maladies métaboliques

Premiers résultats. cf. page 108

IV. Participation à d'autres travaux :

- Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes

Langhi C, Le May C, **Kourimate S**, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B.

FEBS Lett. 2008 Mar 19;582(6):949-55. Epub 2008 Feb 25

- Mice deficient for Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 display reduced postprandial triglyceridemia

Cédric Le May, **Sanae Kourimate**, Cédric Langhi, Maud Chétiveaux, Anne Jarry, Christine Comera, Xavier Collet, F. Kuipers, Michel Krempf, Bertrand Cariou and Philippe Costet

-PCSK9 loss-of-function double mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia

Bertrand Cariou, Khadija Ouguerram, Yassine Zaïr, Raphael Guerois, **Sanae Kourimate**, Cédric Langhi, Isabelle Benoit, Khaldia Belabbas, Fabienne Dufernez⁵, Mathilde Berthome, Henri Vie, Maud Chétiveaux, Michel Krempf, Pascale Benlian, and Philippe Costet

I. Etude de la régulation de PCSK9, de la furine et de PC5/6A par les fibrates

I.1 Introduction

Des patients porteurs de mutations perte de fonction de *PCSK9* présentent des taux de LDL-c cholestérol étonnamment bas ainsi qu'une protection contre les maladies coronariennes. Ces observations ont des lors mis en avant l'intérêt d'inhiber soit la synthèse de *PCSK9*, ou bien son clivage dans le réticulum endoplasmique ou encore sa liaison au LDLR, chez le patient hypercholestérolémique dont un traitement simple aux statines ne suffit pas à diminuer le taux de cholestérol circulant. Ce manque d'efficacité des statines sur le LDLR s'expliquerait par le fait que *PCSK9* soit également positivement régulés par les statines via l'activation de SREBP2. Cette hypothèse a été vérifiée chez la souris déficiente en *PCSK9* mais aussi chez des patients porteurs de mutations perte de fonction de *PCSK9* et hautement sensible au traitement par les statines.

Différentes voies de régulation de *PCSK9* ont été identifiées ces dernières années. En effet, *PCSK9* est positivement régulé par l'insuline et les agonistes de LXR, via la le facteur de transcription SREBP-1c dont la liaison se fait sur le promoteur de *PCSK9* à 336 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Costet *et al.*, 2006). En outre, in vivo, le fénofibrate, agoniste synthétique de PPAR α diminue radicalement les niveaux en ARNm et protéiques de *PCSK9* dans le foie des souris sauvages mais pas dans celui des souris invalidée pour PPAR α (Lambert *et al.*, 2006).

L'objectif premier de ce travail était de caractériser les mécanismes de répression de *PCSK9* par PPAR α dans des cellules humaines et de vérifier l'efficacité de cette répression sur les voies de régulations positives de *PCSK9*, notamment les voies régies par les statines ou LXR. Nous avons mis en évidence deux voies de répression de *PCSK9* via PPAR α .

**Dual mechanisms for the fibrates-mediated repression of Proprotein
Convertase Subtilisin/Kexin type 9**

Sanae Kourimate^{1,2,5}, Cédric Le May^{1, 2}, Cédric Langhi^{1, 2}, Anne Laure Jarnoux², Khadija Ouguerram^{1,2,4}, Yassine Zair^{1,3}, Patrick Nguyen⁶, Michel Krempf^{1,2,3,4}, Bertrand Cariou^{1,2,3},
Philippe Costet^{1,2,5}

From : ¹ INSERM, U915, Nantes, F-44000 France ; ² INSERM, U539, Nantes, F-44000 France ; ³ CHU de Nantes, l'institut du thorax, Clinique d'Endocrinologie et Nutrition, Nantes, F-44000 France ; ⁴ Université de Nantes, Faculté de médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France ; ⁵ CRNH de Nantes, Nantes, F-44000 France ; ⁶ Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, F-44000 France;

Running title: fibrates repress PCSK9 and increase PC5/6A and furin expressions.

Dual Mechanisms for the Fibrate-mediated Repression of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9^{*S}

Received for publication, July 16, 2007, and in revised form, February 1, 2008. Published, JBC Papers in Press, February 3, 2008, DOI 10.1074/jbc.M705831200

Sanae Kourimate^{†¶1}, Cédric Le May[‡], Cédric Langhi[‡], Anne Laure Jarnoux[§], Khadija Ouguerram^{¶||}, Yassine Zaïr^{‡**}, Patrick Nguyen^{‡‡}, Michel Krempf^{‡||**}, Bertrand Cariou^{‡**}, and Philippe Costet^{‡¶12}

From [†]INSERM, U915, Nantes, F-44000 France, [§]INSERM, U539, Nantes, F-44000 France, the ^{**}Clinique d'Endocrinologie et Nutrition, l'Institut du Thorax, CHU de Nantes, Nantes, F-44000 France, the ^{||}Faculté de Médecine, l'Institut du Thorax, Université de Nantes, Nantes, F-44000 France, the [¶]CRNH de Nantes, Nantes, F-44000 France, and the ^{‡‡}Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, F-44000 France

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is associated with familial autosomal dominant hypercholesterolemia and is a natural inhibitor of the LDL receptor (LDLr). PCSK9 is degraded by other proprotein convertases: PC5/6A and furin. Both PCSK9 and the LDLr are up-regulated by the hypocholesterolemic statins. Thus, inhibitors or repressors of PCSK9 should amplify their beneficial effects. In the present study, we showed that PPAR α activation counteracts PCSK9 induction by statins by repressing PCSK9 promoter activity and by increasing PC5/6A and furin expression. Quantification of mRNA and protein levels showed that various fibrates decreased PCSK9 and increased PC5/6A and furin expression. Fenofibric acid (FA) reduced PCSK9 protein content in immortalized human hepatocytes (IHH) as well as its cellular secretion. FA suppressed PCSK9 induction by statins or by the liver X receptor agonist TO901317. PCSK9 repression is occurring at the promoter level. We showed that PC5/6A and furin fibrate-mediated up-regulation is PPAR α -dependent. As a functional test, we observed that FA increased by 30% the effect of pravastatin on the LDLr activity *in vitro*. In conclusion, fibrates simultaneously decreased PCSK9 expression while increasing PC5/6A and furin expression, indicating a broad action of PPAR α activation in proprotein convertase-mediated lipid homeostasis. Moreover, this study validates the functional relevance of a combined therapy associating PCSK9 repressors and statins.

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)³ is associated with autosomal dominant hypercholesterolemia (1)

and is a natural inhibitor of the LDL receptor (LDLr) (2). Its autocatalytic activity is necessary to its processing and for the mature form to reach the LDLr and induce its degradation (3). This catalytic activity is not involved in LDLr degradation *per se*. Indeed, cellular or secreted mature PCSK9 probably acts as a chaperone and prevents the LDLr from being recycled by binding to its EGFA domain (4–10). Accordingly, hepatic transient overexpression of wild-type PCSK9 in mice (11–14) or elevated circulating levels in parabiotic mice (15) decrease the LDLr expression and lead to hypercholesterolemia. It has been shown that the proprotein convertase furin and to a lesser extent PC5/6A cleave PCSK9 into a secreted, truncated, inactive form (16). Interestingly, some “gain of function” mutations do not necessarily induce a higher affinity of PCSK9 for the LDLr, but decrease PCSK9 sensitivity to this degradation (4). In contrast, PCSK9 deficiency lowers plasmatic cholesterol concentration and confers protection against cardiovascular disease (17–20). Thus, treatments inhibiting PCSK9 synthesis, processing, or binding to the LDLr could be useful for hypercholesterolemic patients who do not reach therapeutic goals. In particular, these inhibitors could be added to statins to amplify their effect on the LDLr activity. Surprisingly, statins also increase PCSK9 expression via SREBP-2, a pathway that exerts a break on their efficiency (21–23). This negative feedback has been shown *in vivo* in mice deficient for PCSK9 and is supported by studies in patients bearing nonsense mutations for PCSK9 and highly responsive to statins (19, 24). Various positive and negative regulatory pathways of the PCSK9 gene have been identified. PCSK9 is up-regulated in mice by the agonist of the liver X receptor (LXR), TO901317 (23). We recently demonstrated that PCSK9 is also up-regulated by insulin as well as the LXR agonist TO901317 via SREBP-1c, which binds a response element located at –336 bp from the ATG in the promoter region (25). However, we showed that fenofibrate, a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), decreases PCSK9 mRNA and protein quantity in the liver of wild-type mice, but not in PPAR α ^{–/–} mice (26). Fenofibrate is commonly used in clinical practice for its hypotriglyceridemic effects.

^{*} This work was supported in part by the Laboratoires Pierre Fabre, the Agence Nationale de la Recherche (Physiopathologies Humaines 2006 R06510NS), the Fondation de France, Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques, Programme National de Recherche-Maladies Cardiovasculaires 2006. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental data and Fig. S1.

¹ Supported by the Centre de Recherche en Nutrition Humaine of Nantes and Région Pays de la Loire.

² A Contrat d'Interface INSERM-CHU de Nantes. To whom correspondence should be addressed: INSERM, U915 CHU Hôtel Dieu, 3ENORD, 9, Quai Moncousu, 44000, Nantes, France. Tel.: 33(0)240087533; Fax: 33(0)240087544; E-mail: philippe.costet@univ-nantes.fr.

³ The abbreviations used are: PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; LXR, liver X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding pro-

tein; PC5/6A, proprotein convertase 5/6A; LDLr, low density lipoprotein receptor; HDL, high density lipoprotein; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; IHH, immortalized human hepatocytes; LPDS, lipoprotein-deficient serum; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; FA, fenofibric acid; PV, pravastatin; wt, wild type; mut, mutant; siRNA, short interfering RNA.

Although the benefit of fenofibrate used as a monotherapy is debated (27), a significant decrease of the LDL-C has been observed in patients treated with an association of fenofibrate and simvastatin (28). Furthermore, the “epidemic” of combined hyperlipidemia related to the insulin-resistant states make the association of statins with other drugs targeting triglycerides and HDL levels, as fenofibrate does, desirable (29).

Here we show that various fibrates repressed PCSK9 expression in immortalized human hepatocytes (IHH). We show for the first time that fibrates also increase the synthesis of PC5/6A and furin in a PPAR α -dependent fashion, suggesting a dual mechanism of action on PCSK9 both at the transcriptional and protein levels. Fenofibric acid (FA), the active form of fenofibrate, reduced the protein content of PCSK9 in IHH as well as its cellular secretion and prevented its accumulation caused by statins or the LXR agonist TO901317. These repressive effects were reproduced at the PCSK9 promoter level. To test the functional relevance of these findings, we verified that FA amplified the effect of pravastatin on LDLr activity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals—Fenofibric acid was purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany); other chemicals and drugs came from Sigma. Drugs were dissolved in Me₂SO, which was also used in controls.

Cell Culture—Human immortalized hepatocytes are described elsewhere (30). They were cultured on collagen-coated flasks in William’s E medium in the presence of a 10% fetal calf serum. The day before the experiment, the cells were plated in 6-well plates at 1×10^6 cells/well. The cells were exposed to various treatments in the presence of a 5% lipoprotein-deficient serum (LPDS) unless notified. Media and drugs were renewed after 24 h of culture. When the secretion was to be analyzed, cells were incubated in 1 ml of medium without serum.

Western Blots—Proteins from 300 μ l of cell culture medium were precipitated with acetone. Cells were scraped and homogenized in $1 \times$ phosphate-buffered saline, 1% Triton X-100. 75 μ g of proteins were analyzed by Western blot as described elsewhere (25), using a polyclonal rabbit IgG directed against the CRSRLAGASQELQ peptide (Neosystem, Strasbourg, France), an epitope of the C-terminal domain of human PCSK9, or with a polyclonal anti-PC5 antibody (Abcam, Cambridge UK), a polyclonal anti-furin (abcam), and with the monoclonal anti- β -actin AC-15 antibody (Sigma).

Real-time PCR—Real-time PCR analysis were performed as described elsewhere (25) with SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Oligonucleotides used for real-time PCR are described under supplemental data. Because primers targeting PC5 detect both PC5/6A and 6B, we refer to these mRNA as PC5.

Promoter Analysis—We previously identified the PCSK9 proximal promoter (25). Briefly, long (–4 bp to –1460 bp) and short (–4 bp to –1027 bp) versions of the proximal promoter (wt) were inserted into the PGL3 basic vector, and versions mutated (mut) for a SREBP response located at –336 bp were generated. We used long or short hPCSK9wt or hPCSK9mut (0.150 μ g per well) together with pRL-CMV-*Renilla* (5 ng/well)

in HepG2 cells and long hPCSK9wt (0.5 μ g per well) with TK-*Renilla* (10 ng/well), in IHH cells.

The day before the experiment, HEPG2 cells were plated at a density of 300,000 cells per well and IHH cells at a density of 350,000 cells per well, out of 12-well plates, in Dulbecco’s modified Eagle’s medium, glucose (1 g/liter) (HepG2) or William’s medium E (IHH), SVF (10%), 10 μ g/ml of streptomycin, 100 units/ml penicillin. The transfection was performed with Lipofectamine-2000, according to the manufacturer’s instruction (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and cells were maintained in the same culture medium without serum for 20 h. The analysis was performed with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Charbonnières, France). TK-*Renilla* was a generous gift from K. E. Berge. IHH cells were a generous gift from H. Moshage and D. Bernuau.

siRNAs—The following predesigned siRNAs were used as duplexes for PCSK9-knockdown experiments: sense sequence: GGUCUGGAAUGCAAAGUCAdTdT and antisense sequence: UGACUUUGCAUCCAGACCdTdT. Nontargeting siRNA or negative siRNA were used as a control (Eurogentec, Liege, Belgium). Transfections were carried out with Lipofectamine-2000 (Invitrogen) over 7 h, with a final concentration of 200 nM siRNA in 6-well-plates according to the manufacturer’s recommended procedures. The cells were then incubated in fresh medium and grown without serum for 48 h to increase the basal activity of the LDLr.

For PPAR α knockdown, a set of duplex siRNA was used (On target plus siRNA smart pool, Dharmacon) under the same conditions as above. After transfection, cells were left in fresh medium with LPDS for 24 h and exposed to vehicle or FA for 8 h.

LDLr Activity—After the incubation period time, cells were washed two times in ice-cold phosphate-buffered saline and then treated with 20 μ g/ml ¹²⁵I-LDL without or with 500 μ g/ml unlabeled LDL in William’s E medium, 5% LPDS, 4% bovine serum albumin, 50 mM HEPES, for 4 h at 4 °C. Cells were washed three times in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and rinsed three times with phosphate-buffered saline. Cells were lysed with NaOH 1 N for 30 min, and the radioactivity counted. ¹²⁵I-LDL was corrected for cellular protein. The specific binding was calculated by subtracting the normalized ¹²⁵I-LDL radioactivity in the presence of excess unlabeled LDL from radioactivity in its absence.

Statistics—Each experiment is representative of at least two independent experiments with a minimum of triplicates per condition. All values are reported as means $\pm$ S.D. The statistical significance was analyzed using a Student’s unpaired *t* test. Values of *p* < 0.05 were considered significant.

RESULTS

PCSK9 Expression Is Repressed by Various PPAR α Ligands in Human Immortalized Hepatocytes—To assess whether PCSK9 repression by fenofibrate could be extended to other PPAR α agonists and to the human gene, we exposed IHH cells for 24 h to Wy14643 (100 μ M) or to 250 μ M FA, clofibrate, and gemfibrozil (Fig. 1A). Cells were cultured with LPDS (5%) to reduce the amount of natural PPAR α ligands associated to lipoproteins. As expected, PPAR α itself responded positively to the

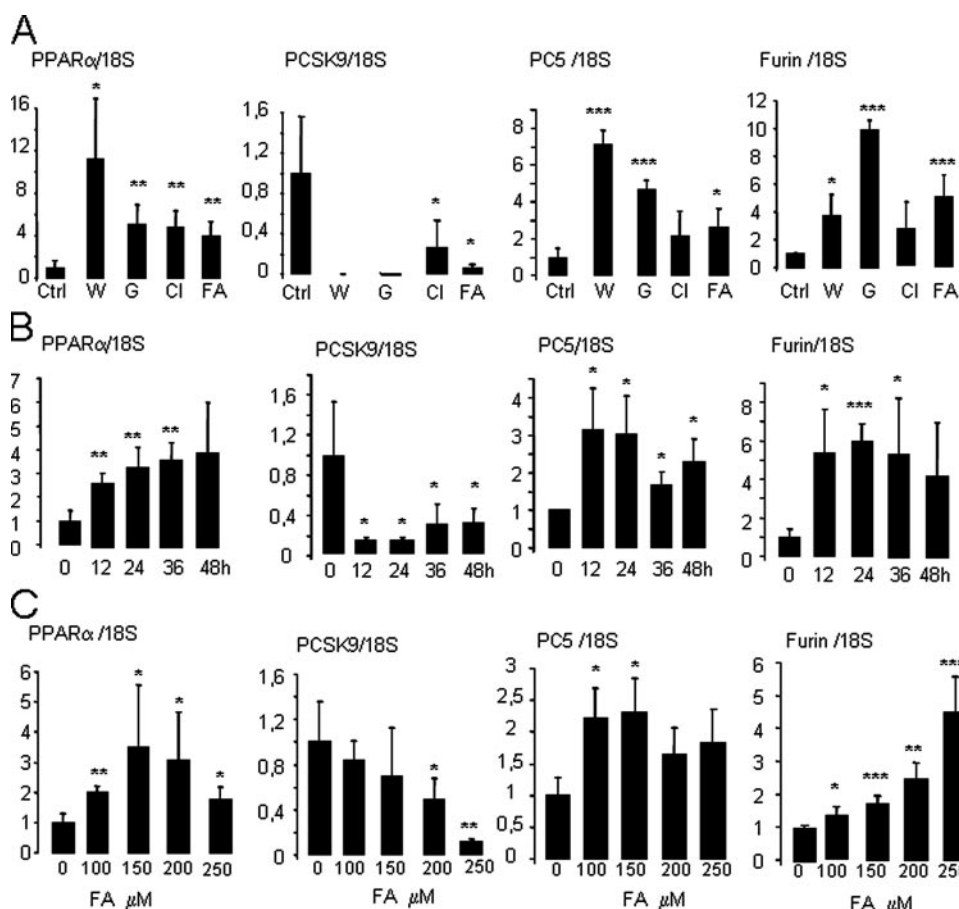


FIGURE 1. Fibrates reduce PCSK9 and increase PC5 and furin mRNA quantity. A, IHH were exposed for 24 h to various agonists of PPARα: Wy14643 (100 μM, W) or 250 μM FA (FA), clofibrate (CI), gemfibrozil (G). B, IHH were exposed from 0 to 48 h to FA (250 μM) in 5% LPDS or C, to increasing doses of FA for 24 h. PPARα, PCSK9, PC5, furin, PPARα, and 18 S mRNA levels were quantified by real-time PCR, and mRNA relative levels are presented. Bars represent the mean ± S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

treatments (respectively, +1000%, $p < 0.05$, +400%, $p < 0.01$, +377%, $p < 0.01$, +300% $p < 0.01$). Each agonist induced a dramatic decrease of PCSK9 mRNA quantity, (−75% for clofibrate and −95% for FA, $p < 0.05$), down to almost undetectable levels for Wy14643 and gemfibrozil.

Next, we characterized FA-dependent PCSK9 repression in IHH. We observed a dramatic decrease of the quantity of PCSK9 mRNA within 12 h of treatment at the dose of 250 μM (86%, $p < 0.05$), with a concomitant 181% ($p < 0.05$) increase of the quantity of PPARα mRNA, as expected. Increasing doses of FA resulted in a dose-dependent decrease of PCSK9 mRNA quantity in IHH exposed to FA for 24 h, with an EC_{50} of 200 μM ($p < 0.05$) (Fig. 1C). PPARα was responsive to 100 μM FA (+100%, $p < 0.01$) and doses above that. FA also repressed PCSK9 in the other human cell line HepG2 (supplemental data, −40% after 24 h of exposure to 250 μM FA, $p < 0.01$).

FA Prevents the Induction of PCSK9 in Response to Statins and the LXR Agonist TO901317—To determine whether PCSK9 up-regulation by statins could be affected by FA, we exposed IHH to pravastatin (10 μM, PV) and/or FA (250 μM) over 24 h (Fig. 2A). As a positive control, FA treatment increased the quantity of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1) mRNA (+219%, $p < 0.001$) (31). Pravastatin did not interfere with this response. Pravastatin increased the quantity

of PCSK9 mRNA, (+96%, $p < 0.01$). Similar results were obtained with lovastatin (10 μM, data not shown). As published, the increase of the quantity of the LDLr mRNA was weaker in response to pravastatin than for PCSK9 (21) (+26%, $p < 0.05$). FA decreased the quantity of PCSK9 mRNA (−90%, $p < 0.001$). Interestingly, FA counteracted the statin-induced expression of PCSK9 (−90% for PV + FA versus control, $p < 0.001$). FA increased the quantity of LDLr mRNA (+44% $p < 0.05$ and +59%) but did not impair its response to pravastatin (+44%, $p < 0.05$).

We recently showed that PCSK9 is up-regulated by the LXR agonist TO901317 via SREBP-1c, in murine cells (25). We verified these results in IHH cells and investigated the effect of FA on this pathway (Fig. 2B). After 48 h of exposure, the quantity of CPT-1 mRNA augmented by 163% in the presence of FA ($p < 0.05$), showing the integrity of the PPARα-related pathway. The effect of FA on PCSK9 mRNA was still important (−76% compared with control, $p < 0.01$). TO901317 (1 μM) also increased PCSK9 mRNA (+151%, $p < 0.05$) in these human cells. Interestingly, FA

suppressed the LXR agonist-dependent induction of PCSK9. However, FA did not suppress SREBP-1c induction in response to TO901317 (Fig. 2B). The LDLr responded positively to FA and TO901317 (+116% and +149%, respectively, $p < 0.01$), and when both compounds were added together, an amplification of their effect was observed (+308% compared with control, $p < 0.01$, and +89%, $p < 0.05$ when compared with FA alone).

FA Impairs the Stimulation of PCSK9 Secretion and Activity by Pravastatin—Next, we verified whether FA impairs PCSK9 protein accumulation in response to pravastatin treatment (Fig. 3B). A Western blot was performed with proteins from cells or the culture medium after they were exposed to FA (250 μM) or pravastatin (10 μM) for 48 h in the absence of serum. Within the cells, pravastatin increased pro-PCSK9 and PCSK9 total content by 47% ($p < 0.05$). FA decreased PCSK9 expression by 65% ($p < 0.05$), and no change was observed compared with control when both drugs were added together. In the medium, pravastatin increased the PCSK9 content by 45% (versus control, $p < 0.05$). FA diminished PCSK9 quantities by 68% (versus control, $p < 0.01$). Interestingly, the repressing effect of FA on PCSK9 protein content was maintained when both drugs were added (−63%, $p < 0.01$).

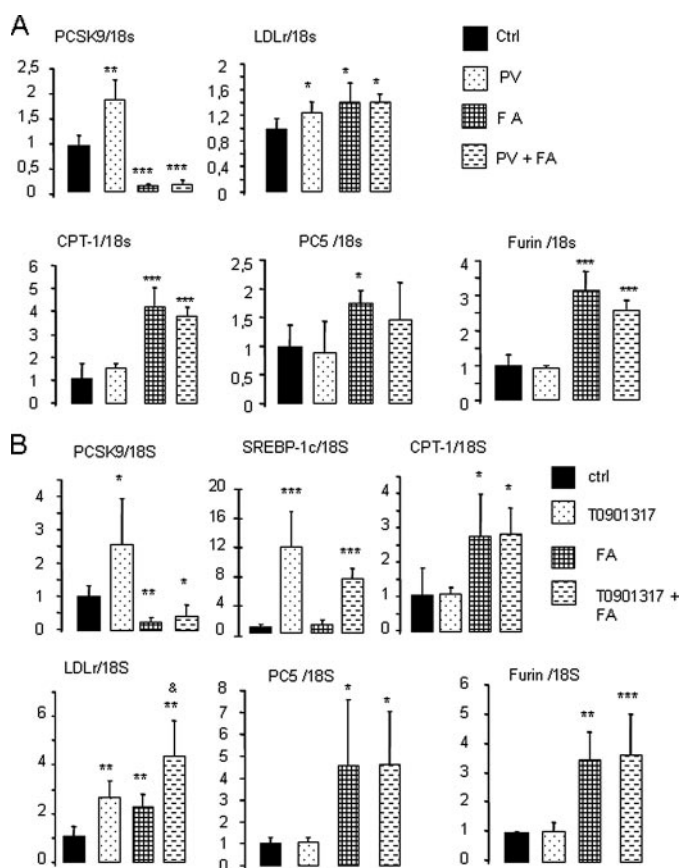


FIGURE 2. FA impairs PCSK9 mRNA accumulation in the presence of statins or T0901317. A, IHH cells were exposed for 24 h to FA (250 μM), and/or pravastatin (10 μM) in the presence of 5% LPDS. Gene-specific expression was measured by real-time PCR analysis. B, similar experiment was run for 48 h using the liver X receptor agonist T0901317 (1 μM). Bars represent the mean ± S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ when compared with FA alone.

PC5 and Furin Expression Are Increased by Fibrates in a PPARα-dependent Fashion—Because PC5/6A and furin degrades PCSK9 (16), we decided to test whether PPARα agonists would increase their expression in IHH, concomitantly with the analysis described above. A 24-h-long treatment with Wy14643 (100 μM), gemfibrozil (250 μM), and fenofibric acid (250 μM) increased PC5 mRNA quantity by 600% ($p < 0.001$), 370% ($p < 0.001$), 116% ($p < 0.05$), respectively, and furin expression was raised by 275% ($p < 0.05$), 990% ($p < 0.001$), 160% ($p < 0.001$), respectively (Fig. 1A). The same tendency was observed with clofibrate although not statistically significant. At a dose of 250 μM, the kinetics of induction showed a maximal effect of FA after 12 h of exposure for both genes (+200% for PC5 and +400% for furin, $p < 0.05$, Fig. 1B). In a 24-h-long treatment and dose-dependent study, a plateau was observed for PC5/6A starting with the lowest dose of FA tested, 100 μM (+120%, $p < 0.05$) (Fig. 1C). Interestingly, a dose-dependent effect was observed for furin.

Similar results were observed in HepG2 cells (supplemental data). After 24 h of exposure to 250 μM, furin mRNA levels were increased by 340% ($p < 0.001$) and PC5 by 100% ($p < 0.001$).

We verified that these changes in PC5 and furin expression were also present at the protein level (Fig. 3A). Western blot analysis showed that upon FA treatment (250 μM for 48 h), both the mature PC5/6A isoform and furin protein quantities were

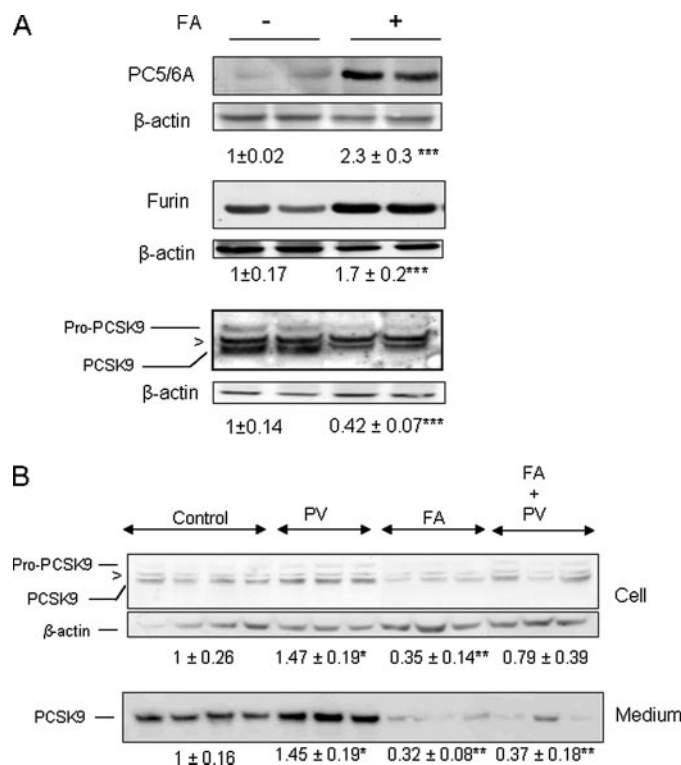


FIGURE 3. FA impairs pravastatin-mediated increases of PCSK9 content in cells and medium. A, IHH cells were exposed for 48 h to FA (250 μM) in William's E medium. Cell lysates were collected, and their protein content analyzed by Western blot using antibodies raised against PC5, furin, or PCSK9. The bands detected correspond to the mature form of PC5/6A (65 kDa) and furin (95 kDa) or to both proPCSK9 and PCSK9. B, IHH cells were exposed for 48 h to FA (250 μM) and/or pravastatin (10 μM, PV) in the absence of serum. Results represent the mean ± S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. < indicates a nonspecific band.

increased by 130 and 70%, respectively ($p < 0.001$). The PCSK9 content was reduced by 60% ($p < 0.001$).

Next, we verified the effect of statins and the LXR agonist on furin and PC5 expression. No effect of pravastatin or T0901317 was detected on PC5 or furin expression or FA-dependent repression at the mRNA level (Fig. 2, A and B).

We checked whether PPARα is involved in the response of PC5 and furin to fibrate (Fig. 4A). Cells were transfected with nontargeting siRNA or a pool of PPARα-targeting siRNAs and cultured for 24 h in medium containing 5% LPDS and then exposed to FA for 12 h. This resulted in the knockdown of 80% PPARα mRNA ($p < 0.001$). FA alone increased by 100% the PPARα mRNA quantity, but, as desired, this short treatment was unable to overcome the effect of the siRNAs on the PPARα target gene *CPT-1*. Indeed FA alone increased the mRNA quantity by 81% ($p < 0.05$) although the up-regulation was lost in the presence of the siRNAs. A very similar profile was observed for PC5 and furin strongly suggesting that they constitute genuine PPARα target genes. We observed an important and reproducible decrease of PCSK9 expression in cells depleted in PPARα (−70%, $p < 0.001$) and no additional effect of FA with this knockdown. Because SREBPs are major regulators of PCSK9, we checked their expression under these conditions. Both SREBP-1c and SREBP-2 were significantly down-regulated in PPARα knockdown cells (respectively, −75%, $p < 0.001$ and −30%, $p < 0.05$, $p = 0.06$ for SREBP1a), suggesting that this

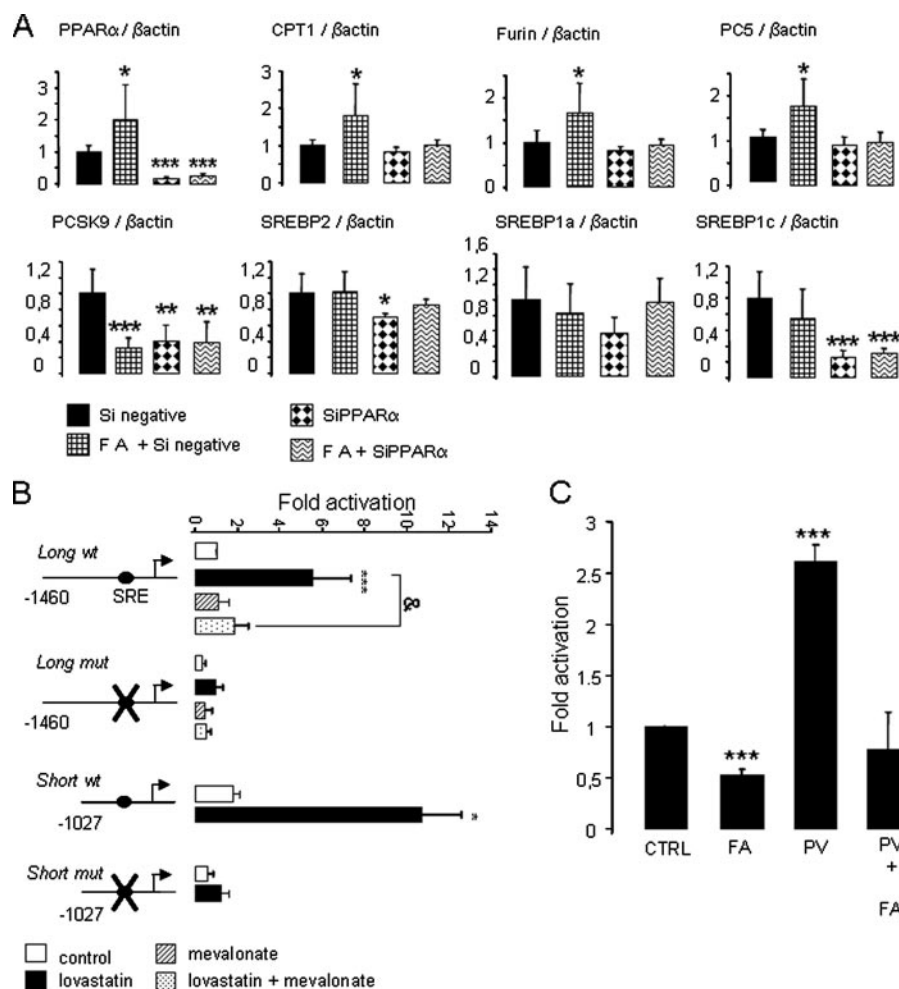


FIGURE 4. Fenofibric acid transcriptionally regulates PCSK9, PC5, and furin. A, IHH cells were transfected with nontargeting siRNA (*Si negative*) or siRNA directed against PPARα (*SiPPARα*) and cultured as described under "Materials and Methods." Gene-specific expression was measured by real-time PCR analysis. Results represent the mean $\pm$ S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. B, HepG2 cells were transfected with a construct containing a long or short version of the human PCSK9 proximal promoter, wild type or mutated for the SREBP response element located at -336 bp from the ATG (*wt*, *mut*) ("Materials and Methods"). A, cells were exposed to lovastatin ($10 \mu\text{M}$) and/or mevalonolactone (2.5 mM). B, IHH cells were transfected with the long version of the PCSK9 wild-type promoter and immediately exposed to PV ($10 \mu\text{M}$) and/or fenofibric acid ($250 \mu\text{M}$). Results represent the mean $\pm$ S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

might be the cause of PCSK9 mRNA fall-down. Their expression levels were not affected by FA alone with or without SiPPARα.

FA Abolishes PCSK9 Proximal Promoter Response to Statins—We showed that the PCSK9 proximal promoter contains a response element for SREBP-1c located at -336 bp from the ATG (25), and it is known that *in vivo* and in HepG2 cells, PCSK9 is regulated by statins and SREBP-2 (21–23). First, we verified whether PCSK9 response to statins was mediated by the proximal promoter. To reproduce the experimental conditions of the literature quoted above, we chose lovastatin and HepG2 cells as a model (Fig. 4B). We transfected the cells with either a long version or a short version of PCSK9 proximal promoter (long wt, short wt), or with the equivalent constructs mutated for the SREBP response element (long mut, short mut). After transfections, cells were cultivated in the presence of lovastatin ($10 \mu\text{M}$), in the presence or not of the cholesterol precursor mevalonolactone (2.5 mM mevalonate). As we previ-

ously showed (25), the short version of the promoter reproducibly exhibited a higher activity than the long version ($p = 0.07$, *ns*), suggesting that a repressor element might exist between -1460 bp and -1027 bp. Lovastatin increased the wild-type promoter activity by 450% ($p < 0.001$) for the long version and by 512% ($p = 0.012$) for the short version, showing that there is probably no response element involved in this pathway between -1460 bp and -1027 bp. The activation by lovastatin was significantly reduced by 66% with the concomitant addition of mevalonate (long wt "lovastatin" versus "lovastatin + mevalonate," $p < 0.001$), confirming that the pathway involved is indeed cholesterol-related. Mutating the SREBP response element impaired severely the activity of the promoter itself, suggesting that it is a critical element for PCSK9 expression (long wt versus long mut: -65% , $p < 0.001$, short wt versus short mut: -68% , $p < 0.05$). The mutated versions of the promoter were still responsive to statins but to a lesser extent than for the wild-type version (183% increase for long mut versus long wt, $p < 0.01$, and $+118\%$ fold increase for short mut versus short wt), suggesting that this element is the major site accountable for the effect of lovastatin.

Next, we verified whether FA would repress the activation of PCSK9 promoter by statins (Fig.

4C). To parallel the data of the present article, we extended our results to IHH and showed that the activity of the long version of the promoter is increased by 260% in response to pravastatin ($10 \mu\text{M}$, $p < 0.001$) and reduced by 47% by FA alone ($p < 0.001$). Interestingly, the concomitant addition of FA ($250 \mu\text{M}$) to pravastatin suppressed the activation of the promoter, suggesting that this is the mechanism underlying PCSK9 repression by PPARα ligands.

FA Amplifies the Effect of Pravastatins on LDLr Activity—PCSK9 down-regulation by FA should result in a better efficacy of statins on LDLr activity. First, we validated that our cellular model was appropriate to evaluate interactions between the LDLr pathway and PCSK9. Indeed, we observed that PCSK9 knockdown (-40 to -60% cellular and secreted protein content depending on experiment) by siRNA resulted in a 200% increase in LDLr activity (Fig. 5A). Next, we verified our hypothesis by incubating IHH cells in the presence of FA ($250 \mu\text{M}$) for 24 h followed by a 24-h treatment with pravastatin

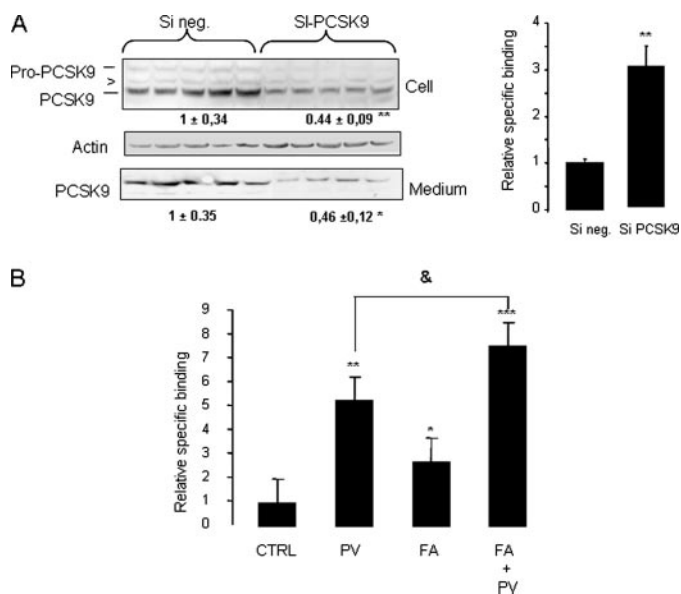


FIGURE 5. FA represses LDLr activity and potentiates statin-mediated binding of LDL. A, to validate IHH cells as an appropriate model, we first decreased PCSK9 expression using siRNA targeting PCSK9 mRNA (Si-PCSK9), compared with cells exposed to "negative" nontargeting siRNA (Si neg.). IHH were cultured for 48 h without serum after transfection, and the binding of 125 I-LDL was measured at 4 °C as described under "Materials and Methods." A Western blot analysis shows PCSK9 expression levels within cells and in medium. B, similar conditions of cultures were used to study the effect of FA (250 μ M) and PV (5 μ M). When used, FA was added to the cells for a pretreatment of 24 h to decrease PCSK9 expression, and statins were added or not for another 24 h. Results represent the mean $\pm$ S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

alone or in combination (5 μ M) (Fig. 5B). Cells were washed and exposed to 125 I-LDL as described under "Materials and Methods" at 4 °C. As expected, pravastatin increased the amount of specifically bound 125 I-LDL by 500% ($p < 0.01$). FA increased the binding by 170% ($p < 0.05$). In agreement with our hypothesis, when both drugs were added together, an additional 30% increase in LDLr activity was observed compared with pravastatin alone (varying from 18 to 46% in a total of five independent experiments, data not shown).

DISCUSSION

PCSK9 is a natural post-transcriptional inhibitor of the LDLr pathway, and its deficiency results in very low LDL-C levels and a protection against cardiovascular disease (2). Here we show that various fibrates, ligands for PPAR α , repressed PCSK9 expression in IHH. Fibrates also increased the expression of PC5/6A and furin in a PPAR α -dependent fashion. These pro-protein convertases degrade PCSK9, suggesting the existence of a dual mechanism of repression of PCSK9 targeting both the mRNA synthesis and the protein degradation. Fenofibrate acid, the active form of fenofibrate, prevented PCSK9 accumulation within the cell or in the medium due to statins or the LXR agonist TO901317. These repressive effects were reproduced at the promoter level. As a functional test of the relevance of our findings, we showed that FA amplified the effect of pravastatin on LDLr activity.

PPAR α is an essential participant in lipoprotein metabolism. It displays normolipidemic properties by governing the expression of many genes involved in fatty acid catabolism and trans-

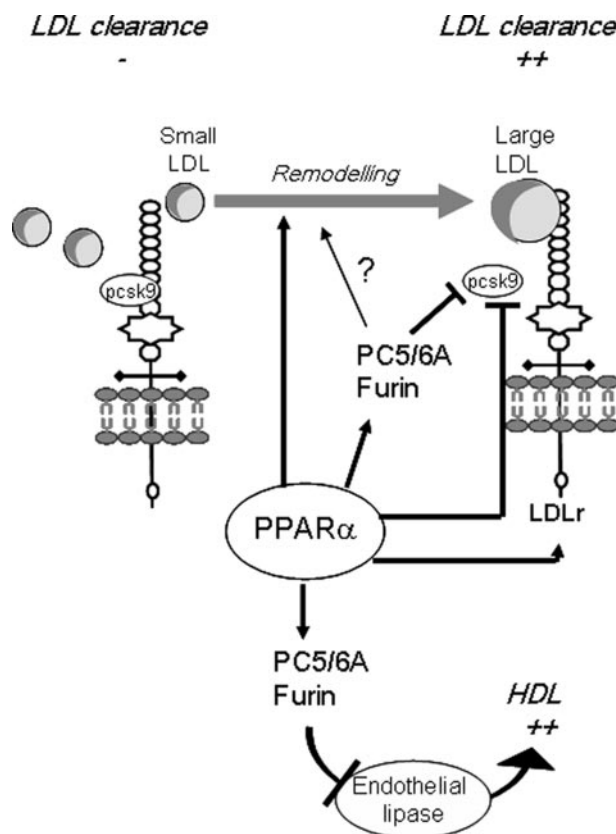


FIGURE 6. PPAR α activation acts on proprotein convertases PCSK9, PC5, and furin to promote LDL clearance and increase HDL-C concentrations. PPAR α activation promotes PCSK9 repression by inhibiting its transcription and increasing PC5 and furin expression. Fibrates also directly increase the synthesis of the LDLr and promote a remodelling of LDLs, reducing the number of dense proatherogenic particles and increasing the number of large LDLs with optimal binding capacities for the LDLr. Interestingly, PC5 and furin cleave the lipoprotein lipase (triglyceride lipase) and degrade the phospholipase endothelial lipase (43), an enzyme known for hydrolyzing phospholipids from HDLs but that also converts large LDL into smaller LDL with less affinity for the LDLr. This promotes higher plasma concentrations of HDL-C (44) and lower LDL-C. In humans, the relative low efficiency of PPAR α on LDL clearance compared with statins suggests the existence of a negative feedback pathway.

port, reverse cholesterol transport via HDL, as well as enzymes involved in the remodelling of lipoproteins (32). Its activity in peripheral tissues has also been involved in the pleiotropic effects of statins (33, 34). Our data support a broader role for PPAR α in LDL metabolism (Fig. 6). However, it is striking that one would expect a more potent effect of fibrates on LDL-C in humans, considering the intensity of the repression on PCSK9 we observed and the relative 28% decrease of LDL-C observed in patients heterozygote for nonsense mutations (18). Furthermore, we observed that FA alone also increases LDLr activity and it is mRNA cellular quantity, a trait that was previously found for gemfibrozil (35).

Fenofibrate activates lipases and promotes LDL remodelling into particles with optimal binding capacities for the LDLr (36). The overall limited effect of fibrates on LDL-C suggests the existence of a negative feedback pathway similar to PCSK9 up-regulation by statins. If this hypothesis is true, identifying this pathway could help with improving PPAR α agonists and making them more efficient toward the LDL-C. This is supported by the observation that significant reductions of LDL-C, following

fibrate administration, were still reported in clinical trials. This was the case for gemfibrozil in the Helsinki Heart study (37). Although less efficient than statins (38), the decrease of plasma LDL-C levels observed with fenofibrate in short term studies reached up to 30% (39). In the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes study (FIELD), the decrease compared with the control group was 12% after 4 months of treatment and was only 5.8% after 5 years. But the results are questionable because of a strong drop in treatment with statins that contributed to the decrease of LDL-C concentrations in both placebo and fenofibrate groups (27). However, our data suggest that fenofibrate could be the most useful in combination with statins. In patients with combined dyslipidemia, co-administration of fenofibrate with fluvastatin or simvastatin resulted in an additional decrease of 10% of LDL-C compared with the monotherapy (28, 40, 41). A large cardiovascular end point trial, ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes), is currently in progress and will evaluate the beneficial effect of such a combined therapy. Large differences in lipid profiles were observed in patient carriers of PCSK9 nonsense mutations, suggesting a complex pathway of regulations (18, 42). It is unknown whether variations of the individual responses to the combined treatment correspond to PCSK9 mutations or polymorphisms, and whether the repression of PCSK9 is sustainable. Evaluating the amount of circulating PCSK9 in patients before and after treatment by fibrates would be needed to test these hypotheses and verify our results *in vivo* in humans.

Here we show for the first time that PC5/6A and furin are positively regulated by fibrates in a PPAR α -dependent way. Although it would be very informative to show the relative contribution from each pathway to the fibrate-mediated inhibition of PCSK9 (transcriptional or enzymatic), we have not been able to successfully knockdown PC5 and furin at the same time.

PC5/6A and furin are known for cleaving lipoprotein lipase and endothelial lipase (43). Interestingly, while this manuscript was under review, Jin *et al.* (44) showed that hepatic cleavage and inhibition of the endothelial synthase by furin and PC5/6A modulate HDL metabolism. In particular, their inhibition resulted in an increase of HDL-C levels. We propose that the regulation of both these genes by fibrates and PPAR α contributes to the beneficial effect of these drugs on HDL-C (Fig. 6) (37, 38).

Although our findings were confirmed in the human HepG2 cells (supplemental data), we found no regulation of PC5 or furin *in vivo* in mice (data not shown) after a treatment by fenofibrate, suggesting strong species specificity. We designed oligonucleotides annealing to the junction of human exons 7 and 8, thus targeting both PC5/6A and PC5/6B transcripts. Both transcripts are present in the liver (45, 46). PC5/6B encodes a larger protein with a transmembrane domain and is unable to cleave PCSK9, contrary to the shorter, soluble PC5/6A (16). Our Western blots confirm that the PC5/6A isoform is up-regulated by fenofibric acid.

We were surprised to observe that PCSK9 expression fell in response to the knockdown of PPAR α because we expected the opposite. No additional decrease was observed in the presence of fenofibric acid, in agreement with a role for PPAR α . It is also reminiscent of what we observed *in vivo* in mice at the mRNA

level, but it does illustrate the complexity of the regulatory pathways at play, in particular when they result in a repressive effect (26). We propose that at least *in vitro*, the down-regulation of SREBPs is responsible for these effects, although more work is needed to investigate the abundance of their nuclear forms under these conditions.

LXR is a very promising therapeutic target because of its anti-atherogenic properties. However, *in vivo*, LXR agonists also exhibit hypertriglyceridemic and lipogenic properties (47). Whether PCSK9, which acts on VLDL production and triglyceridemia under specific pathophysiological conditions, is involved in this process is unknown (26, 48). Here we showed that the LXR agonist TO901317 is an activator of PCSK9 in human cells. As published recently, it also induced LDLr transcription (49). Interestingly, we found an additive effect of both drugs on LDLr regulation. This suggests that LXR agonists might potentiate the effect of PCSK9 inhibitors on LDLr activity.

To our knowledge, this study is the first formal demonstration that PCSK9 promoter activity is activated by statins, although it was already known that statins and SREBP-2 increase PCSK9 expression (21–23). The decrease of activity and the lower sensitivity to statins consequent to the mutation within the SRE located at –336 bp strongly suggest that this sequence mediates the promoter response to statins, as it does with insulin and SREBP-1c (25). It would be interesting to genotype individuals with abnormal LDL-C levels for this region of the gene. Although our experiments suggest that PCSK9, fibrate-dependent repression is occurring transcriptionally via the inhibition of the promoter activity, the exact mechanism is still to be determined. It has been shown in rat hepatocytes that clofibrate and Wy14682 decrease the amount of nuclear active SREBP-2 (50). The hypothesis that this down-regulation is responsible for PCSK9 repression would be difficult to reconcile with the concomitant induction of the LDLr we observe.

It has recently been shown that PCSK9 probably acts as a molecular chaperone on the LDLr by binding to its extracellular domain(4,5,10). Several strategies have been proposed or discussed in the literature to inhibit PCSK9, including inhibitors of its catalytic activity or peptides preventing its binding to the LDLr as well as antisense oligonucleotides to shut down its synthesis (2, 51). Our results suggest that PCSK9 expression could be successfully repressed at the mRNA level, a strategy that may be useful for patients suffering from mutations that considerably enhance the affinity of PCSK9 for the LDLr and therefore makes patients less responsive to statins, like the D374Y (52).

In conclusion, various fibrates repressed human PCSK9 expression in a transcriptional fashion and increased PC5/6A and furin expression in a PPAR α -dependent fashion. By defining PPAR α as being a simultaneous regulator of three proprotein convertases, this study identifies a new class of targets for this nuclear receptor and reinforces their role in lipid homeostasis. Based on the recent findings of Jin *et al.*, we also propose that part of the beneficial effects of fibrates on HDL-C is mediated by this regulatory pathway. Moreover, this study supports the functional relevance of a combined therapy associating PCSK9 repressors and statins.

Acknowledgments—We thank Joshua Musgrave for careful correction of this manuscript. We thank Lucie Arnaud for excellent technical help. We thank H. Moshage and D. Bernuau for giving us IHH.

REFERENCES

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villegier, L., Farnier, M., Beucier, L., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) *Nat. Genet.* **34**, 154–156
- Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *Trends Biochem. Sci.* **32**, 71–77
- Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2069–2074
- Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 413–419
- Fisher, T. S., Lo, S. P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C., Wisniewski, D., Cummings, R. T., Calzetta, A., Cubbon, R. M., Fischer, P. A., Tarachandani, A., De, F. R., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Carfi, A., and Sitlani, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20502–20512
- McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20799–20803
- Nassoury, N., Blasiole, D. A., Tebon, O. A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) *Traffic* **8**, 718–732
- Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B., and Walker, N. P. (2007) *Structure* **15**, 545–552
- Qian, Y. W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T. P., Bensch, W. R., Li, W., Ehsani, M. E., Lu, D., Konrad, R. J., Eacho, P. L., Moller, D. E., Karathanasis, S. K., and Cao, G. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 1488–1498
- Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–18612
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48865–48875
- Lalanne, F., Lambert, G., Amar, M. J., Chetiveaux, M., Zair, Y., Jarnoux, A. L., Ouguerram, K., Friburg, J., Seidah, N. G., Brewer, H. B., Jr., Krempf, M., and Costet, P. (2005) *J. Lipid Res.* **46**, 1312–1319
- Maxwell, K. N., and Breslow, J. L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7100–7105
- Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50630–50638
- Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 2995–3005
- Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30561–30572
- Cohen, J., Pertsemidis, A., Kotowski, I. K., Graham, R., Garcia, C. K., and Hobbs, H. H. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 161–165
- Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., Jr., and Hobbs, H. H. (2006) *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272
- Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5374–5379
- Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T. A., Kinch, L., Grishin, N. V., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 514–523
- Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., and Prat, A. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454–1459
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12027–12032
- Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., and Breslow, J. L. (2003) *J. Lipid Res.* **44**, 2109–2119
- Berge, K. E., Ose, L., and Leren, T. P. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1094–1100
- Costet, P., Cariou, B., Lambert, G., Lalanne, F., Lardeux, B., Jarnoux, A. L., Grefhorst, A., Staels, B., and Krempf, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6211–6218
- Lambert, G., Jarnoux, A. L., Pineau, T., Pape, O., Chetiveaux, M., Laboisie, C., Krempf, M., and Costet, P. (2006) *Endocrinology* **147**, 4985–4995
- Keech, A., Simes, R. J., Barter, P., Best, J., Scott, R., Taskinen, M. R., Forder, P., Pillai, A., Davis, T., Glasziou, P., Drury, P., Kesaniemi, Y. A., Sullivan, D., Hunt, D., Colman, P., d'Emden, M., Whiting, M., Ehnholm, C., and Laakso, M. (2005) *Lancet* **366**, 1849–1861
- Grundy, S. M., Vega, G. L., Yuan, Z., Battisti, W. P., Brady, W. E., and Palmisano, J. (2005) *Am. J. Cardiol.* **95**, 462–468
- Ballantyne, C. M. (2005) *Am. J. Cardiol.* **96**, 14K–19K
- Schippers, I. J., Moshage, H., Roelofsen, H., Muller, M., Heymans, H. S., Ruiters, M., and Kuipers, F. (1997) *Cell Biol. Toxicol.* **13**, 375–386
- Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J. A., Marrero, P. F., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8560–8563
- Brown, J. D., and Plutzky, J. (2007) *Circulation* **115**, 518–533
- Yano, M., Matsumura, T., Senokuchi, T., Ishii, N., Murata, Y., Taketa, K., Motoshima, H., Taguchi, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Takuwa, Y., Kawada, T., Brownlee, M., Nishikawa, T., and Araki, E. (2007) *Circ. Res.* **100**, 1442–1451
- Paumelle, R., and Staels, B. (2007) *Circ. Res.* **100**, 1394–1395
- Goto, D., Okimoto, T., Ono, M., Shimotsu, H., Abe, K., Tsujita, Y., and Kuwano, M. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2707–2712
- Guerin, M., Bruckert, E., Dolphin, P. J., Turpin, G., and Chapman, M. J. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 763–772
- Frick, M. H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O. P., Heinsalmi, P., Helo, P., Huttunen, J. K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., and Manninen, V. (1987) *N. Engl. J. Med.* **317**, 1237–1245
- Steinmetz, A., Schwartz, T., Hehnke, U., and Kaffarnik, H. (1996) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**, 563–570
- Krempf, M., Rohmer, V., Farnier, M., Issa-Sayegh, M., Corda, C., Sirugue, I., Gerlinger, C., and Masseyeff-Elbaz, M. F. (2000) *Diabetes Metab.* **26**, 184–191
- Derosa, G., Cicero, A. E., Bertone, G., Piccinni, M. N., Ciccarelli, L., and Roggeri, D. E. (2004) *Clin. Ther.* **26**, 1599–1607
- Farnier, M., and Dejager, S. (2000) *Am. J. Cardiol.* **85**, 53–57
- Fasano, T., Cefalu, A. B., Di, L. E., Noto, D., Pollaccia, D., Bocchi, L., Valenti, V., Bonardi, R., Guardamagna, O., Aversa, M., and Tarugi, P. (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 677–681
- Seidah, N. G., and Prat, A. (2007) *J. Mol. Med.* **85**, 685–696
- Jin, W., Wang, X., Millar, J. S., Quertermous, T., Rothblat, G. H., Glick, J. M., and Rader, D. J. (2007) *Cell Metab.* **6**, 129–136
- Essalmani, R., Hamelin, J., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Mbikay, M., Chretien, M., Seidah, N. G., and Prat, A. (2006) *Mol. Cell Biol.* **26**, 354–361
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 928–933
- Geyerregger, R., Zeyda, M., and Stulnig, T. M. (2006) *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 524–539
- Lambert, G., Krempf, M., and Costet, P. (2006) *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 79–81
- Ishimoto, K., Tachibana, K., Sumitomo, M., Omote, S., Hanano, I., Yamasaki, D., Watanabe, Y., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., and Doi, T. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 4929–4933
- Konig, B., Koch, A., Spielmann, J., Hilgenfeld, C., Stangl, G. I., and Eder, K. (2007) *Biochem. Pharmacol.* **73**, 574–585
- Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Whipple, C. P., Subramaniam, A., Monia, B. P., Crooke, S. T., and Crooke, R. M. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 763–767
- Naoumova, R. P., Tosi, I., Patel, D., Neuwirth, C., Horswell, S. D., Marais, A. D., van Heyningen, C., and Soutar, A. K. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2654–2660

I.3. Discussion et conclusion

Nous avons montré ici, *in vitro* dans des lignées d'hépatocytes humains (IHH, HepG2, HUH7), qu'un traitement par différents fibrates dont l'acide fénofibrique -la forme métabolisée du fénofibrate- diminue de manière drastique l'expression de *PCSK9*, via la répression de son promoteur, et supprime son activation par les statines ou l'agoniste de LXR : le T0901317. Ceci résulte finalement par une potentialisation de l'activité du LDLR. Nous avons également démontré que les fibrates régulent l'expression des gènes codant pour la furine et PC5/6A -deux autres PCs clivant *PCSK9* pour la rendre inactive- via *PPARα*.

Ces données suggèrent qu'il existe deux mécanismes de régulation de *PCSK9* par *PPARα*. La première voie serait transcriptionnelle et passerait donc par une répression du promoteur de *PCSK9*, la seconde serait en revanche post-transcriptionnelle via l'inactivation de *PCSK9* par deux autres PCs dont la transcription est activée par *PPARα*.

Ces résultats viennent compléter le schéma de la régulation de *PCSK9* (Figure 26).

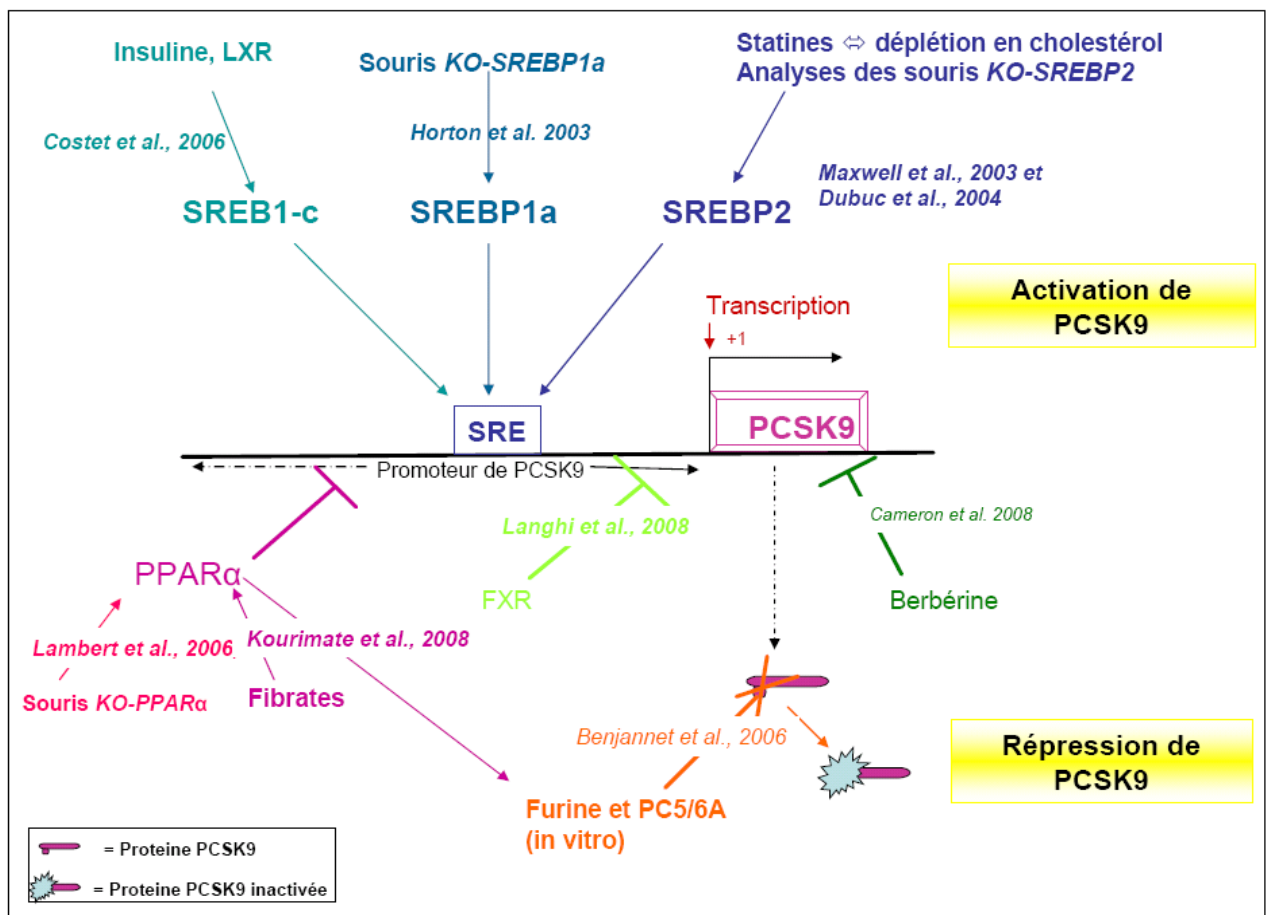


Figure 26 Schéma général de la régulation de *PCSK9*

Au vu de ces résultats, nous pourrions nous attendre à un effet beaucoup plus efficace des fibrates sur les niveaux de LDL-c chez les patients. D'autant plus que nous pouvons voir également un effet transcriptionnel de l'acide fénofibrique sur l'ARNm du LDLR (Figure 2). Ce résultat a également été observé avec le gemfibrozil dans une autre étude (Goto *et al.*, 1997) et récemment la régulation transcriptionnelle du LDLR par PPAR α a clairement été mise en évidence chez la souris (Huang *et al.*, 2008). Or chez le patient l'efficacité des fibrates est bien plus connue pour le traitement des hypertriglycéridémies que pour celui des hypercholestérolémies.

Voici un bref récapitulatif des effets des fibrates connus à ce jour :

Les fibrates ont été initialement mis sur le marché aux Etats-Unis par l'introduction du clofibrate en 1967, puis en Europe sous la forme du fénofibrate dans les années 1970 suivi par le gemfibrozil en 1980. Ces deux dernières molécules sont aujourd'hui les fibrates les plus prescrits. Leur mode d'action sur le métabolisme des lipoprotéines passe par l'activation de PPAR α . L'activation pharmacologique de PPAR α entraîne une répression indirecte de l'apolipoprotéine-CIII qui est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL). Le rôle de la LPL est d'hydrolyser les TG, des CM et VLDL (Grundy and Vega, 1987; Barbier *et al.*, 2002). Ainsi, les fibrates sont utilisés en cliniques pour le traitement des hypertriglycéridémies. Les fibrates semblent également avoir des effets bénéfiques sur les HDL. En effet, l'expression des apolipoprotéines A-I et A-II -apolipoprotéines majeures des HDL- est augmentée lors d'un traitement par les fibrates (Staels *et al.*, 1998; Barbier *et al.*, 2002). L'utilisation des fibrates permet une diminution de la concentration plasmatique en TG de 10 à 50 % accompagné d'une augmentation de 10 à 35 % des concentrations en HDL. L'effet des fibrates sur les concentrations plasmatiques en LDL reste très variable, puisque selon les études nous pouvons voir une réduction de ce paramètre allant de 5 à 20% (Troisième rapport du NCEP, 2002; Keech *et al.*, 2005). Cependant, l'étude clinique SAFARI portant sur l'effet d'un co-traitement simvastatine et fénofibrate a révélé une diminution significative du LDL-c (Grundy *et al.*, 2005). Le fénofibrate est également connu pour son action sur le remodelage des particules de LDL petites et denses en LDL plus grosses pouvant plus facilement se lier au LDLR (Guerin *et al.*, 1996).

Cependant, nos résultats suggèrent une augmentation de l'efficacité du fénofibrate sur la cholestérolémie en combinaison avec les statines.

Un nouvel essai clinique cardiovasculaire de grande envergure -puisqu'il comprend plus de 10.000 patients- portant sur l'étude d'une thérapie combinant des statines et du fénofibrate est en cours aux Etats-Unis. Il s'agit de l'étude ACCORD (Action to Control

Cardiovascular Risk in Diabetes) dont les résultats, prévus pour 2010, permettront d'évaluer l'efficacité réelle d'une telle thérapeutique.

Toutefois, la question que nous nous posons maintenant, est : Comment pouvons-nous expliquer la divergence entre l'efficacité prouvée *in vitro* des fibrates sur les niveaux de LDL-c et la réalité en clinique chez le patient?

Une hypothèse serait basée sur les niveaux circulants de PCSK9. A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas la concentration exacte de PCSK9 dans le plasma sanguin. Celle-ci varie d'un facteur 10 selon les techniques utilisées. Pour cette raison, il est difficile de prévoir chez l'homme, la dose en fibrates nécessaire pour être efficace sur PCSK9. Il se pourrait que pour certaines personnes la dose de 150 à 200 mg/jour de fibrates - normalement prescrite- ne soit pas suffisante pour diminuer une concentration en PCSK9 bien trop élevée mais qu'à l'inverse cette dose soit suffisante chez d'autres patients dont le taux de PCSK9 circulant est moins important. Une des pistes qui nous a mené à cette hypothèse, est que les patients souffrant d'hypercholestérolémie et porteurs de double mutation hétérozygote pour le LDLR et perte de fonction pour PCSK9, sont beaucoup plus sensible à un traitement par les statines (Berge *et al.*, 2006). De plus, cette hypothèse a en partie été vérifiée par une étude récemment publiée, où les auteurs -en plus de confirmer nos résultats obtenus *in vitro*- ont clairement mis en évidence par dosage de PCSK9 par ELISA sur les patients de l'étude clinique FIELD (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes), une corrélation entre la concentration plasmatique en PCSK9 et les niveaux de cholestérol totaux ou associés aux LDL. Il s'agissait de regarder l'effet d'un traitement de 6 semaines par le fénofibrate (200mg/jour) sur 115 diabétiques. Les résultats montrent une réduction de 8,5 % de la concentration en PCSK9 après traitement au fénofibrate en parallèle d'une diminution significative des concentrations plasmatiques en triglycérides et en LDL-c (Lambert *et al.*, 2008).

Une autre explication -à cette divergence de résultats *in vitro/in vivo*- serait l'existence d'un mécanisme de répression faisant intervenir un partenaire inconnu à l'heure actuelle et qui diminuerait l'efficacité des agonistes de PPAR α sur le LDL-c. Ce mécanisme serait équivalent au frein exercé par PCSK9 sur l'efficacité des statines vis-à-vis du LDLR et qui est longtemps resté sans explication chez certains patients insensibles aux statines. Identifier ce mécanisme de répression pourrait ouvrir de nouvelles perspectives quand au mode d'action de PPAR α .

Enfin, outre la compréhension du mécanisme de régulation de PCSK9 par PPAR α , nous avons également mis en évidence l'activation transcriptionnelle de la furine et PC5/6 par PPAR α . Ces deux PCs sont connues pour leurs propriétés de clivage des lipoprotéines

lipases ainsi que les lipases endothéliales (EL) (Seidah and Prat, 2007). Récemment une nouvelle étude a mis en évidence qu'une inhibition de l'EL par ces deux PCs augmentait les niveaux en HDL-C (Jin *et al.*, 2007). D'après nos résultats, nous proposons -comme le résume la figure 6 de l'article numéro 1- un nouveau mécanisme de régulation des HDL par PPAR α .

II. Mise au point d'un test de mesure de l'activité autocatalytique de PCSK9 par méthode fluorométrique

II.1 Introduction

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) est un inhibiteur naturel du récepteur au Low Density Lipoprotein (LDLR) (Costet *et al.*, 2008). Les mutations gain de fonction de *PCSK9* sont associées à l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose (Abifadel *et al.*, 2003). En revanche, les mutations perte de fonction de *PCSK9* se traduisent par la diminution des concentrations de LDL-cholestérol (LDL-c) plasmatique avec une réduction des risques de maladies coronariennes (Cohen *et al.*, 2006). Pour pouvoir dégrader le LDLR, PCSK9 doit sortir du réticulum endoplasmique, et pour cela son activité autocatalytique est nécessaire (Maxwell *et al.*, 2005). L'autoclavage de PCSK9 est intramoléculaire, il a lieu au site FAQ₁₅₂↓SIPK, au niveau de la terminaison C-terminale du prodomaine de PCSK9 (Naureckiene *et al.*, 2003). Contrairement aux autres proprotéines convertases, ce clivage a lieu après un acide aminé non basique, cette caractéristique est spécifique de PCSK9 ainsi que de S1P. PCSK9 circulante reste associée à son prodomaine de manière non covalente, ce qui empêche l'accès au site catalytique par d'éventuels substrats (Piper *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2007). PCSK9 agit donc comme une protéine chaperonne, se liant au domaine extracellulaire du LDLR et empêchant le recyclage de celui-ci à la surface cellulaire induisant ainsi une diminution de la clairance des particules de LDL-c (Zhang *et al.*, 2007). Bien qu'il ait été clairement démontré que l'activité de PCSK9 n'était pas nécessaire pour dégrader le LDLR (McNutt *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007), son site catalytique reste cependant actif (Cunningham *et al.*, 2007).

En utilisant un peptide fluorogénique (DnP-FAQSIPK-AMC) correspondant au site naturel de clivage autocatalytique de PCSK9 nous avons pu suivre l'activité enzymatique de PCSK9 endogène.

Il s'agit de l'adaptation d'un test auparavant développé par Naureckiene et al. Ce test était basé sur l'utilisation de la protéine PCSK9 purifiée après transfection dans des cellules COS-7. Voici un bref rappel de leur expérience : PCSK9 est incubé à 37°C pendant 375 minutes avec différents peptides fluorogéniques court appelés SN-1, SN-2 et SN-3. Le peptide SN-1 contient le site de clivage de PCSK9, tandis que les autres ont un ou plusieurs acides aminés mutés. Les auteurs ont également testé un peptide fluorogénique contenant le site d'autoclavage de la furine afin de prouver la spécificité de leur test.

Ainsi, lorsque le peptide fluorogénique est clivé la séparation du « quencher » (Dnp) de son fluorophore (AMC) lui permet d'émettre de la fluorescence qui détectée par

spectrophotomètre (λ d'excitation : 350 nm, λ d'émission 450 nm). Les valeurs de fluorescence permettent directement d'apprécier l'activité relative de PCSK9 (Tableau 4.)

En considérant que le peptide spécifique du site d'autoclivage de PCSK9 SN-1 est à 100% d'activité, les auteurs ont comparé l'activité des autres peptides. Il en résulte une forte spécificité de ce test pour PCSK9 puisque le site de clivage de la furine n'est clivé qu'à 20%. Le fait de remplacer un acide aminé non basique par un acide aminé basique en 152 (peptide SN-2) rend ce peptide quasiment pas clivable par PCSK9, en effet l'activité détectée est de seulement 1,2%. Par contre la substitution de l'acide aminé en 152 (Q) par un autre acide aminé non basique (N) diminue l'activité de PCSK9 mais seulement de 18%.

Voici le tableau regroupant les résultats obtenus pour chaque type de peptide :

Narc 1 activity on fluorogenic substrates ^a		
Substrate	Sequence	Relative activity (%)
Subtilisin substrate	Z-GGL-AMC	4.5
Furin substrate	Boc-RVRR-AMC	20
TPP II substrate	H-AAF-AMC	1.4
Processing site substrates		
SN-1	Dnp-FAQSIPK-AMC	100
SN-2	Dnp-DSL VFAK-AMC	1.2
SN-3	Dnp-FANAIPK-AMC	82

Tableau 4 : Activité de PCSK9 d'après les résultats de Naureckiene et al.

Ce test n'a cependant pas pu être reproduit par d'autres équipes, la raison de leurs échecs n'étant pas très claire puisque les conditions expérimentales utilisées ne sont pas bien définies (Piper *et al.*, 2007). Nous avons néanmoins réussi à reproduire, adapter et valider le test de Naureckiene et al. par divers méthodes. En effet la spécificité de ce test a été validée dans les hépatocytes primaires des souris déficiente en PCSK9 puis in-vitro sur des cellules humaines immortalisées traitées par des si-RNA dirigés contre PCSK9, et enfin grâce à l'analyse du site de clivage par MALDI TOF, nous avons pu vérifier que le clivage a bien lieu au niveau du site attendu soit : FAQ152↓SIP.

Nous avons ensuite appliqué ce test pour caractériser l'activité de divers mutants de PCSK9 transfectés dans des hépatocytes primaires de souris *PCSK9*^{-/-}. Enfin nous avons utilisé les données publiées dans l'article précédent (Kourimate *et al.*, 2008) concernant la répression de PCSK9 par les agonistes de PPAR α et avons mesuré l'activité de PCSK9 intracellulaire et sécrétée.

Les résultats que nous avons obtenus sont en cours de révision, ils sont exposés ci-dessous.

II.2 Article Numéro 2 :

Cellular and secreted pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 catalytic activity in hepatocytes

Sanae Kourimate¹, Maud Chétiveaux¹, Anne Laure Jarnoux², Florent Lalanne²
and Philippe Costet^{1, 3}.

From: ¹INSERM, U915, Nantes, F-44000 France ; ² INSERM, U539, Nantes, F-44000 France ; ³CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

Running: PCSK9 catalytic activity

Cellular and secreted pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 catalytic activity in hepatocytes

Sanae Kourimate¹, Maud Chétiveaux¹, Anne Laure Jarnoux², Florent Lalanne² and Philippe Costet^{1,3}.

From: ¹INSERM, U915, Nantes, F-44000 France ; ² INSERM, U539, Nantes, F-44000 France ; ³CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

Address correspondance to : Philippe Costet, INSERM, U539 CHU Hôtel Dieu, 3ENORD, 9, Quai Moncousu, 44000, Nantes, France. Fax: 01133(0)240287544, phone: 1133(0)240287533
Philippe.costet@univ-nantes.fr.

Running: PCSK9 catalytic activity

ABSTRACT

Objectives: Pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) impairs the low density lipoprotein receptor (LDLr) recycling. To reach the LDLr, the proprotein must cleave itself in the endoplasmic reticulum. Using a fluorogenic peptide corresponding to the cleavage site, we directly monitored for the first time the endogenous cleavage activity of wild-type PCSK9 and naturally occurring variants in hepatocytes.

Methods: Validation of the assay was performed with wild type or PCSK9 deficient primary mouse hepatocytes and immortalized human hepatocytes transfected with antiPCSK9 siRNA. An analysis of the cleaved peptide was performed using mass spectrometry. The Pharmacological regulation of the enzyme was studied in human hepatocytes. Expression vectors coding for the variants S127R, D374Y, F216L, S386A were transfected in primary hepatocytes from PCSK9 deficient mice.

Results: First, we showed that the assay is highly specific for PCSK9 and that PCSK9 decreased catalytic activity was associated with increased LDLr activity. In cell culture media, the catalytic site of the secreted protein remains active toward the peptide. Pharmacological up- or down-regulation of PCSK9 expression produced paralleled effects on the activity. The catalytic activity of gain-of-function variants S127R, D374Y recapitulated roughly the maturation efficiency estimated by western blots, in contrast with the F216L variant that presented with a 54% lower catalytic activity than the wild-type protein, despite similar proPCSK9 to PCSK9 ratios. Thus, other factors might be involved in the maturation of PCSK9.

Conclusion: All together, these results shed a new light on PCSK9 enzymatic activity and could help identifying proPCSK9 inhibitors.

Keywords: PCSK9, LDLr, hepatocyte, enzyme, mutation

INTRODUCTION

Pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a natural inhibitor of the low density lipoprotein receptor (LDLr) (1) and the hepatic form plays a major role in controlling cholesterolemia (2). *PCSK9* gain-of-function (GOF) mutations are associated to hypercholesterolemia and premature atherosclerosis (3). In contrast, *PCSK9* loss-of-function (LOF) mutations result in lower plasma LDL-cholesterol (LDLC) concentrations and a reduced risk for coronary heart disease (4). Unless the pro-protein has been cleaved in the endoplasmic reticulum (ER), PCSK9 doesn't degrade the LDLr (5). The self-cleavage is intramolecular and occurs at the C-terminal end of the prodomain at the FAQ₁₅₂↓SIPK site (6). This cleavage occurs after non basic residues, a trait that PCSK9 shares only with S1P, out of the 8 other members of the family of subtilisin proprotein convertases. It is believed that the secreted PCSK9 is linked to its prodomain in a non covalent fashion, a situation that would prevent any access to the substrate groove (7;8). Therefore, exogenous PCSK9 acts as a chaperone, binding to the extracellular domain of the LDLr and preventing its recycling to the cell surface, thereby diminishing LDL clearance (9). However, the catalytic site of purified PCSK9 remains active (7). Results from GOF mutations studies illustrate the complexity of PCSK9-mediated LDLr degradation. Indeed the gain of function mutant PCSK9 S127R presents with an increased affinity with the LDLr but is very poorly secreted, suggesting an intracellular interaction (10). The PCSK9-D374Y processing is moderately impaired, but its affinity for the LDLr is 25-fold that of the wild-type protein (7). F216L amino acid substitution doesn't seem to affect neither PCSK9 processing nor its affinity for the LDLr (7;11), but is still associated to hypercholesterolemia (3).

There is a lack for a test that would help monitoring PCSK9 autocatalytic activity and identify modulators of this activity. Naureckiene *et al.* published such an assay using in vitro purified PCSK9 and a fluorogenic substrate corresponding to the cleavage site (6). Other teams (7;10) failed to reproduce these findings, although the exact conditions used were not described. Therefore up today, PCSK9 autocatalytic activity is indirectly estimated by western blot analysis using antibodies recognizing both the pro- and the mature form, or indirectly by measuring the LDLr activity. We adapted Naureckiene *et al.* assay (6) in order to measure for the first time cellular endogenous PCSK9 autocatalytic activity and study how it is affected by naturally occurring variants.

We showed that our approach is highly specific for PCSK9 using cell lysates corresponding to primary hepatocytes from knockout mice or to human immortalized hepatocytes treated with anti-PCSK9 siRNA. Using Maldi-Toff, we showed that the peptide is cleaved at the expected site. Repressing or decreasing PCSK9 expression using drugs led to parallel effects on the peptide cleavage. As expected overexpression of wild-type PCSK9 in primary hepatocytes from knockout mice increased the cleavage of the peptide, while overexpression of the catalytically inactive mutant S386A did not. Overexpression of the GOF variants S127R, D374Y and F216L in primary hepatocytes of knockout mice resulted in a lower catalytic activity toward the substrate than with the wild type protein while the catalytically inactive mutant had no fluorogenic activity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Fenofibric acid was purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany), other chemicals from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Drugs were dissolved in DMSO, also used in controls.

Cell culture

Immortalized human hepatocytes (IHH) were described elsewhere (12). They were cultured on collagen-coated flasks in William's E medium in the presence of a 10% FCS. The day before the experiment, the cells were plated in 6-wells plates at a density of 1.10^6 cells/well. The cells were exposed to various treatments in the presence of a 5% lipoprotein deficient serum (LPDS) unless notified. Media and drugs were renewed after 24hrs of culture. When the secretion was to be analysed, cells were cultivated in 1ml of medium.

Mouse primary hepatocytes

PCSK9 +/- mice were purchased from Jackson Laboratories (Maine, USA), interbred to produce PCSK9 -/- and PCSK9 +/+ (wild type, wt) littermates and genotyped as described elsewhere (13). Animal studies were approved by the Unité de Thérapeutique Expérimentale (Agreement N° BP44015) and performed according to the Public Health Service (PHS) Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals. Primary hepatocytes from female PCSK9+/+ or -/- littermates were isolated using collagenase as previously described (14). Hepatocytes

were washed with serum-free DMEM supplemented with Dexamethazone 100nM, insulin 10nM, and 1% penicillin-streptomycin, and left for 24hrs before cells were scrapped and lysed. When required, after plating and adhesion of the cells, transfection was performed with 0.5µg/ cm² of each plasmids, in presence of culture medium and with lipofectamine-2000® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's recommended procedures.

SiRNA and plasmids

The following predesigned siRNAs were used as duplexes for PCSK9-knockdown experiments: sense sequence: GGUCUGGAAUGCAAAGUCAdTdT and antisense sequence UGACUUUGCAUCCAGACCdTdT. Non-targeting siRNA were used as a control (Dharmacon # D-001210-01-20). Transfections were carried out with lipofectamine-2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) over 7 hrs, with a final concentration of 200 nM SiRNA in 6 well-plates according to the manufacturer's recommended procedures. The cells were then incubated in fresh medium and grown without serum for 48 hrs.

Wild-type human PCSK9 (genebank AX207686) with a V5 epitope flag was inserted into pcDNA3.1 and used as a backbone in order to produce various mutants (Genscript, Piscataway, NJ, USA). Transfection was performed in the same medium with lipofectamine-2000® (Invitrogen) for 24hrs, according to the manufacturer's recommended procedures with 0.5µg/ cm² of each plasmid constructions.

Western blots

Proteins from 300µl of cell culture media were precipitated with acetone. Cell were scrapped and homogenized in 1X PBS, 1% Triton X-100. 75µg proteins were analysed by western blot as described elsewhere (14), using a polyclonal rabbit IgG directed against the CRSRHLGASQELQ peptide (Neosystem, Strasbourg, France), an epitope of the C-terminal domain of human and mouse PCSK9 or with the monoclonal anti β-actin AC-15 antibody (Sigma) or with an anti-V5 antibody (Invitrogen).

PCSK9 catalytic activity

We adapted the method developed by Naureckiene *et al.* (6). Proteins from 500 µl cell culture media were concentrated with Microcons filters (30kDa cut-off, Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). The cells were washed with cold PBS1X and scrapped on ice.

After centrifugation, the pellet was diluted in 30 μ l of cell lysis buffer (0.05M tris base, 0.15M NaCl 1% Triton X-100) and homogenized for 45mn at 4°C (1800rpm). The lysate was pelleted for 10mn at 10 000rpm at 4°C. Supernatant was collected and stored at -80°C or manipulated on ice. On ice, 20 μ g (10 μ L) of protein lysate were added to 40 μ l of reaction buffer (pH 7.4, made fresh, 50 mM Tris pH 7.4, 2.5mM CaCl₂, 0.5% Triton X-100) and immediately used in the assay. A fluorogenic peptide corresponding to the PCSK9 cleavage site labeled with 2,4 dinitrophenyl and 7-amino-4-methyl coumarin (Dnp-FAQSIPK-AMC) was synthesized by Neosystem (Strasbourg, France) and diluted in DMSO to a final concentration of 10mM (the long-term stability of the peptide diluted in DMSO was checked by HPLC). 2 μ l of the peptide stock solution was added to 148 μ l of the reaction buffer (final [peptide] = 100 μ M) and 50 μ l of the protein sample. Incubation was immediately performed on a 96-well plate (black bottom) in a WALLAC VICTOR 1420 (Perkin Elmer Life Sciences). Measurement of the fluorescence was done as follows: repeat: 40x900s, λ_{ex} =340nm, λ_{em} = 460nm, counting over: 1 s, might energy: 1066, temperature: 30°C.

Mass spectrometry

The control sample corresponded to the native peptide (Dnp-FAQSIPK-AMC) incubated in the reaction buffer alone. The sample corresponding to the peptide incubated with cell lysates was submitted to the experimental conditions of the test, as described above. Peptide mass mapping was performed on a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (M@LDI LR, Waters/Micromass, Milford, Maryland, USA). A detailed protocol is available as supplementary methods.

LDLr activity

Cell ¹²⁵I-LDL binding was determined as previously described (15). Cells were washed two times in ice-cold PBS and then treated with 20 μ g/ml I¹²⁵-LDL without or with 500 μ g/ml unlabeled LDL in William's E medium, 5% LPDS, 4% BSA, 50mM HEPES, for 4hrs at 4°C. Cells were washed three times in PBS containing 1% BSA and rinsed three times with PBS. Cells were lysed with NaOH 1N during 30min. and radioactivity counted. I¹²⁵-LDL was corrected for cellular protein. Specific binding was calculated by subtracting the normalized ¹²⁵I-LDL radioactivity in the presence of excess unlabeled LDL from radioactivity in its absence.

Statistics

Each experiment is representative of at least two independent experiments with a minimum of triplicates per condition. All values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical significance was analyzed using a Student's unpaired *t* test. Statistical tests concerning the activity tests were performed with the end point data. The values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The fluorogenic assay is highly specific to PCSK9.

To test whether other proprotein convertases could be responsible for the fluorogenic peptide cleavage, we incubated this peptide with cell lysates from primary hepatocytes isolated from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (figure 1). A high level of activity was detected in wild-type hepatocytes. At $t = 585$ min. PCSK9^{-/-} hepatocytes exhibited 90% less fluorogenic activity than wild-type. There was seemingly no saturation of the enzyme in wild-type mice after 585 min. of reaction, as no plateau was observed. Because primary hepatocytes are susceptible to more cell death than cell lines, we chose not to consider cell media from these cultures.

Next we attenuated PCSK9 expression in IHH cells using specific siRNA (figure 2). Control cells were transfected with non targeting siRNA (NT). 48hrs after transfection and at $t=585$ min. PCSK9 knockdown resulted in a 38% ($p < 0.001$) and 53% ($p < 0.01$) decrease of PCSK9 protein quantity respectively in cell lysates and culture media compared with controls (figure 2A). A parallel decrease in the peptide cleavage activity was observed in cellular lysates (-66% compared with NT siRNA condition, at 585 min., $p < 0.001$) (figure 2B). We also verified the fluorogenic activity of media (figure 2B). A 58% decrease was observed at 585 min. ($p < 0.01$). Since PCSK9 expression and activity are lowered upon siRNA exposure, we expected to see an increase of the capacity to bind ¹²⁵I-LDL(16). Indeed, cells with lower PCSK9 expression and secretion had a LDL binding activity augmented by 200% ($p < 0.01$) (Figure 2C). Overall these results recapitulate the cascade of events that link PCSK9 mRNA knockdown to increased LDLr activity: a decrease of PCSK9 protein accumulation reflected by a decrease of PCSK9 autocatalytic activity that results in an increase of LDL binding capacities.

The peptide is cleaved at the predicted FAQ₁₅₂↓SIPK site.

To verify the specificity of our assay, we verified by mass spectrometry that the peptide was cleaved at the expected site (Dnp-FAQ₁₅₂↓SIPK-AMC) (figure 3). No cleavage was observed in the control sample and a peak corresponding to the native peptide was detected (MH⁺ 1113 Da). However, incubation with cell lysates (IHH) generated a peptide of 601 Da (MH⁺) corresponding to the SIPK-AMC fragment. No fragment of MH⁺531 Da corresponding to the Dnp-FAQ was observed but a peak at MH⁺514 Da appeared, suggesting the loss of a OH group, during the MALDI analysis, as reported elsewhere (17).

PCSK9 autocatalytic activity recapitulates the transcriptional regulation of PCSK9.

We previously published that fenofibric acid (F.A.) prevents the Liver X Receptor agonist T0901317 (T0) or pravastatin-mediated upregulation of PCSK9 (15;18). In order to verify whether the fluorogenic activity of these cell lysates recapitulate the regulation of *PCSK9*, IHH cells were exposed to T0 1μM, with or without F.A. 250μM for 48hrs and the protein lysates were analysed by western blot (figure 4A). T0 increased by 60% (p<0.05) proPCSK9 and PCSK9 protein content. F.A. decreased by 70% the protein content (p<0.01). When both drugs were added concomitantly, a non significant 30% decrease compared with control was observed. The same protein extracts were incubated with the fluorogenic peptide. A similar profile of response was observed. At t = 585 min. the fluorescence was 41% (p<0.01) higher in the T0901317-treated group compared with control, while FA decreased the activity by 59% (p<0.01). Interestingly FA overcame the effect of the LXR agonist.

Next we verified in cell media whether the fluorogenic activity also parallels *PCSK9* regulation by F.A. and/or pravastatin (figure 4B). Cells were exposed for 48 hrs to F.A. 250μM or pravastatin 10μM (prava.) or to both drugs added simultaneously at the same doses and media were concentrated. As expected (15), pravastatin increased the amount of cleavage activity by 70% (p=0,058) and did not compensate for the decrease observed in the presence of F.A. (-80% for F.A. vs. control, p<0.05 and -84% for F.A. + pravastatin vs. control, p<0.05).

PCSK9 variants affect PCSK9 activity.

In a step further we verified whether PCSK9 autocatalytic activity differs among variants of human PCSK9 (figure 5). We expressed PCSK9 variants in primary hepatocytes

derived from PCSK9^{-/-} mice, in order to avoid any interaction with the endogenous protein. Cells were transfected with a vector coding for the human wild-type PCSK9 (WTPCSK9) or PCSK9 variants S386A (catalytically inactive) and the naturally occurring GOF variants F216L(3), S127R(3) and D374Y(19). Densitometry analysis of the bands corresponding to proPCSK9 and PCSK9 revealed that the maximum variation of expression between the constructs was in the range of $\pm 10\%$. The percentage of maturation was estimated by densitometry, considering the contribution of the signal corresponding to PCSK9 (lower band) to the sum of the signals of both proPCSK9 and PCSK9 (sum of the upper and lower band). Western blot analysis showed that 67% of WTPCSK9 was matured and that PCSK9 catalytic activity is considerably diminished by the S386A amino acid substitution (8% maturation). As expected the amino acid substitution S127R strongly diminished the processing (21% maturation), the D374Y had less effect (49% maturation) and F216L variant was matured to the same extent than WTPCSK9. When the fluorogenic peptide was incubated with these cell lysates (figure 5, lower panel), a high level of activity was detected in presence of the WTPCSK9 protein. The fluorogenic activity of cell lysates transfected with the empty vector (null) was 12.4% ($p < 0.01$) that of WTPCSK9. The S386 variant exhibited less than 5% of WTPCSK9 activity ($p < 0.01$). Compared with the activity of WTPCSK9, GOF mutation-associated activities can be summarized as follow: S127R: 24.6% ($p < 0.01$), D374Y: 37.2% ($p < 0.01$) and F216L: 54%, ($p < 0.05$). Therefore the fluorogenic activities of the variants reflect roughly the maturation efficiency estimated by western blot, except for the F216L which was expected to have a similar fluorogenic activity than the wild type protein. The activities of the D374Y and F216L variants -but not of the S127R -were significantly higher than that observed in the null condition.

DISCUSSIONS

This study shows for the first time that PCSK9 autocatalytic activity can be measured in cell lysates and in cell culture media. The activity can be modulated by inducers or repressors of PCSK9 expression, reflecting the quantity of the protein.

Several results strongly suggested that the fluorogenic activity we observed is highly specific to PCSK9: *i*) it is 90% absent from PCSK9 deficient primary hepatocytes and present when the wild type protein is re-introduced using transfection but virtually not if the catalytically inactive variant PCSK9-S386A is used *ii*) PCSK9 processing site is SSVFAQ↓SIPWNL, where Q indicates the P1 cleavage position (6;11). In IHH cell lysates,

the cleavage of the fluorogenic peptide occurred at this predicted site. *iii*) The intensity of the peptide cleavage followed the variations of expression of PCSK9 induced by specific siRNAs or drugs (fenofibric acid, statins, TO901317).

Various approaches, including PCSK9 purification and the determination of its crystal structure, strongly suggest that secreted PCSK9 is non covalently bound to its prodomain (7;8;20). The C-terminal end of the prosegment seemingly blocks the access to the catalytic site (7;8). Several teams reported that they failed to reproduce Naureckiene *et al.*'s work who developed an enzymatic assay and validated a fluorogenic peptide (DnP-FAQSIPK-AMC) as a correct substrate for purified PCSK9 protein (6). Interestingly, we also detected PCSK9 activity in the cell culture medium suggesting that the prodomain of endogenously produced PCSK9 might leave some access to the substrate groove. The physiological relevance of these *in vitro* findings is difficult to extrapolate. Indeed, whether this means that plasma PCSK9 could have an activity toward any substrate is still to be determined. When we incubated the substrate with plasma from PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} littermates, the signal obtained was very high independently of the genotype, and obviously reflected the activity of other enzymes (data not shown). Thus assessment of PCSK9 activity in the plasma would require additional steps of purifications. These results indirectly showed that the amount of cleavage obtained *in vitro* and due to PCSK9 is low.

It is believed that enzymatic inhibitors targeting the circulating form of PCSK9 would not be efficient in preventing the LDLr degradation because there is accumulating data showing that PCSK9 acts as a chaperon. Although PCSK9 is secreted together with its prodomain that seemingly blocks any access to the substrate groove, it has been showed that the catalytic site is still active (7). We observed some substantial fluorogenic activity in the media from hepatocyte cultures suggesting that the prodomain can be displaced. Nevertheless, we cannot exclude that the activity we detected is linked to another protease which activity would be dependent on PCSK9 presence. It remains that inhibitors that would reach ProPCSK9 in the ER should prevent its interaction with the LDLr (5). Our approach might be helpful for identifying such molecules.

We believe this assay could help discover modulators of PCSK9 activity like nutrients, drugs or cellular signals. The activity of all the variants tested reflected roughly their autocatalytic activity estimated by western blotting, although we noted that the F216L activities were lower than expected. This suggests that other factors than the catalytic site activity might be involved in the maturation of PCSK9- and are modulated by this variation.

This reinforces the interest for our approach in studying the effects of sequence variations, in addition to western blots.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by INSERM, Agence nationale de la Recherche (« Physiopathologies humaines 2006 R0651ONS »), Laboratoires Pierre Fabre, Fondation de France, ALFEDIAM, PNR-Maladies Cardiovasculaires 2006. Sanae Kourimate is sponsored by Régions Pays de La Loire and Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes. Philippe Costet has a “Contrat d’Interface” INSERM –CHU de Nantes.

We thank Hélène Rogniaux and the INRA Plateform of Mass spectrometry at Nantes (INRA Research Unit 1268, BIA-BIBS).

RELEVANCE TO THE FIELD OF ATHEROSCLEROSIS

PCSK9 is a highly promising therapeutic target to lower LDLC and therefore prevent or reduce atherosclerosis (1). The patients harbouring the mutants S127R or F216L studied in the present manuscript suffer from premature atherosclerosis (3). Recent reports in mice established that the hepatic protein plays a major role in the control of cholesterolemia (2). The present manuscript measures directly for the first time how mutations affecting PCSK9 result in lower or higher catalytic activity and provides scientists with a new approach to study this enzyme.

Reference List

1. Costet P, Krempf M, and Cariou B. 2008. PCSK9 and LDL cholesterol: Unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem. Sci.*
2. Zaid,A., Roubtsova,A., Essalmani,R., Marcinkiewicz,J., Chamberland,A., Hamelin,J., Tremblay,M., Jacques,H., Jin,W., Davignon,J., Seidah,N.G., and Prat,A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*. 2008.**48**:646-654.
3. Abifadel,M., Varret,M., Rabes,J.P., Allard,D., Ouguerram,K., Devillers,M., Cruaud,C., Benjannet,S., Wickham,L., Erlich,D., Derre,A., Villeger,L., Farnier,M., Beucier,I., Bruckert,E., Chambaz,J., Chanu,B., Lecerf,J.M., Luc,G., Moulin,P., Weissenbach,J., Prat,A., Krempf,M., Junien,C., Seidah,N.G., and Boileau,C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 2003. **34**:154-156.
4. Cohen,J.C., Boerwinkle,E., Mosley,T.H., Jr., and Hobbs,H.H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 2006. **354**:1264-1272.
5. Maxwell,K.N., Fisher,E.A., and Breslow,J.L. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2005. **102**:2069-2074.
6. Naureckiene,S., Ma,L., Sreekumar,K., Purandare,U., Lo,C.F., Huang,Y., Chiang,L.W., Grenier,J.M., Ozenberger,B.A., Jacobsen,J.S., Kennedy,J.D., DiStefano,P.S., Wood,A., and Bingham,B. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. **420**:55-67.
7. Cunningham,D., Danley,D.E., Geoghegan,K.F., Griffor,M.C., Hawkins,J.L., Subashi,T.A., Varghese,A.H., Ammirati,M.J., Culp,J.S., Hoth,L.R., Mansour,M.N., McGrath,K.M., Seddon,A.P., Shenolikar,S., Stutzman-Engwall,K.J., Warren,L.C., Xia,D., and Qiu,X. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. **14**:413-419.
8. Piper,D.E., Jackson,S., Liu,Q., Romanow,W.G., Shetterly,S., Thibault,S.T., Shan,B., and Walker,N.P. The Crystal Structure of PCSK9: A Regulator of Plasma LDL-Cholesterol. *Structure*. 2007. **15**:545-552.
9. Zhang,D.W., Lagace,T.A., Garuti,R., Zhao,Z., McDonald,M., Horton,J.D., Cohen,J.C., and Hobbs,H.H. Binding of PCSK9 to EGF-A repeat of LDL receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* 2007. **282**:18602-18612.
10. Pandit,S., Wisniewski,D., Santoro,J.C., Ha,S., Ramakrishnan,V., Cubbon,R.M., Cummings,R.T., Wright,S.D., Sparrow,C.P., Sitlani,A., and Fisher,T.S. Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 2008. **49**:1333-1343.

11. Benjannet,S., Rhainds,D., Essalmani,R., Mayne,J., Wickham,L., Jin,W., Asselin,M.C., Hamelin,J., Varret,M., Allard,D., Trillard,M., Abifadel,M., Tebon,A., Attie,A.D., Rader,D.J., Boileau,C., Brissette,L., Chretien,M., Prat,A., and Seidah,N.G. NARC-1/PCSK9 and Its natural mutants: Zymogen cleavage and effects on the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* **279**:48865-48875. 2004.
12. Schippers,I.J., Moshage,H., Roelofsen,H., Muller,M., Heymans,H.S., Ruiters,M., and Kuipers,F. 1997. Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* **13**:375-386.
13. Rashid,S., Curtis,D.E., Garuti,R., Anderson,N.N., Bashmakov,Y., Ho,Y.K., Hammer,R.E., Moon,Y.A., and Horton,J.D. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2005. **102**:5374-5379.
14. Costet,P., Cariou,B., Lambert,G., Lalanne,F., Lardeux,B., Jarnoux,A.L., Grefhorst,A., Staels,B., and Krempf,M. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory-element binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* 2006. **281**:6211-6218.
15. Kourimate,S., Le,M.C., Langhi,C., Jarnoux,A.L., Ouguerram,K., Zair,Y., Nguyen,P., Krempf,M., Cariou,B., and Costet,P. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Biol. Chem.* 2008. **283**:9666-9673.
16. Lalanne,F., Lambert,G., Amar,M.J., Chetiveaux,M., Zair,Y., Jarnoux,A.L., Ouguerram,K., Friberg,J., Seidah,N.G., Brewer,H.B., Jr., Krempf,M., and Costet,P. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J. Lipid Res.* 2005. **46**:1312-1319.
17. Guillerme,G., Guillerme,D., Vandenplas-Witkowski,C., Rogniaux,H., Carte,N., Leize,E., Van,D.A., De,C.E., and Lambert,C. Synthesis, mechanism of action, and antiviral activity of a new series of covalent mechanism-based inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *J. Med. Chem.* 2001. **44**:2743-2752.
18. Langhi,C., Le,M.C., Kourimate,S., Caron,S., Staels,B., Krempf,M., Costet,P., and Cariou,B. Activation of the farnesoid X receptor represses pcsk9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008. **19**:949-955.
19. Naoumova,R.P., Tosi,I., Patel,D., Neuwirth,C., Horswell,S.D., Marais,A.D., Van Heyningen,C., and Soutar,A.K. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005.**25**:2654-2660.
20. Hampton,E.N., Knuth,M.W., Li,J., Harris,J.L., Lesley,S.A., and Spraggon,G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2007.**104**:14604-14609.

Figure legends

Figure 1: Fluorogenic activity in PCSK9-deficient mouse primary hepatocytes

Mice PCSK9^{-/-} (squares) and PCSK9^{+/+} (rhomb) primary hepatocytes were isolated and proteins extracted 24hrs after plating. The fluorogenic activity of the cell lysates was determined over 585 min. as described in Experimental Procedures. Bars represent the mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$.

Figure 2: Fluorogenic activity in PCSK9-knockdowned human hepatocytes

IHH cells were transfected with non targeting siRNA (NT) or siRNA targeting PCSK9. 48hrs after transfection, cells were scrapped and A) lysed for western blot analysis. Proteins were extracted from culture media with acetone for western blot analysis or B) concentrated for determination of the fluorogenic activity. C) Part of the cell cultures were also used to determine the ^{125}I -LDL binding activity under these conditions. Bars represent the mean $\pm$ SD, *** $p < 0.01$.

Figure 3: Analysis of the peptide's cleavage site.

MALDI-TOF mass spectra of (a) native fluorogenic peptide (DNP-FAQSIPK-AMC ; MH^+ 1113 Da) and (b) the peptide incubated with IHH cell lysate for 600mn. 1 μl corresponding to approximately 3 pmol of the peptide was mixed with 1 μl matrix solution, and applied onto a MALDI plate. Arrows indicate the peaks corresponding to the native and cleaved peptide (SIPK-AMC ; MH^+ 601 Da).

Figure 4: PCSK9 catalytic activity is modulated by fibrates, pravastatin and T0901317

A) IHH cells were exposed for 48hrs to fenofibric acid 250 μM (F.A.), and/or the Liver X Receptor T0901317 1 μM or both compounds at the same doses **in 5% lipoprotein deficient serum**. Cellular protein contents were analysed by western blot (upper panel) or used in a fluorogenic assay (lower panel, independent experiment. B) IHH cells were exposed for 48hrs

to fenofibric acid 250 μ M (F.A.), and/or pravastatin 10 μ M (Prava.). Media were collected, protein concentrated and used in a catalytic assay. Bars represent the mean $\pm$ SD, * p <0.05, ** p <0.01.

Figure 5: Mutations affecting PCSK9 catalytic activity.

Mouse PCSK9 $-/-$ primary hepatocytes were transfected with an empty vector (Null) or a vector coding for the human V5-flagged wild type protein (WT) or the catalytically inactive variant PCSK9-S386A (S386A), the GOF variants PCSK9-S127R (S127R), PCSK9-D374Y (D374Y) and PCSK9-F216L (F216L). Proteins were extracted from cell lysates and analysed with western blots using an anti-V5 antibody (upper panel) or used in a catalytic activity assay (lower panel). The intensity of each band was determined by densitometry and the percentage of maturation was calculated for each variant independently of each other, reflecting the contribution of the lower band to the sum of the signals obtained for both bands (proPCSK9 and PCSK9). For the catalytic activity assay, the columns represent the fluorogenic activity at $t = 585$ mn relative to that of WT PCSK9, arbitrarily set at 100%. Bars represent the mean $\pm$ SD, * p <0.05, ** p <0.01.

Figure 1

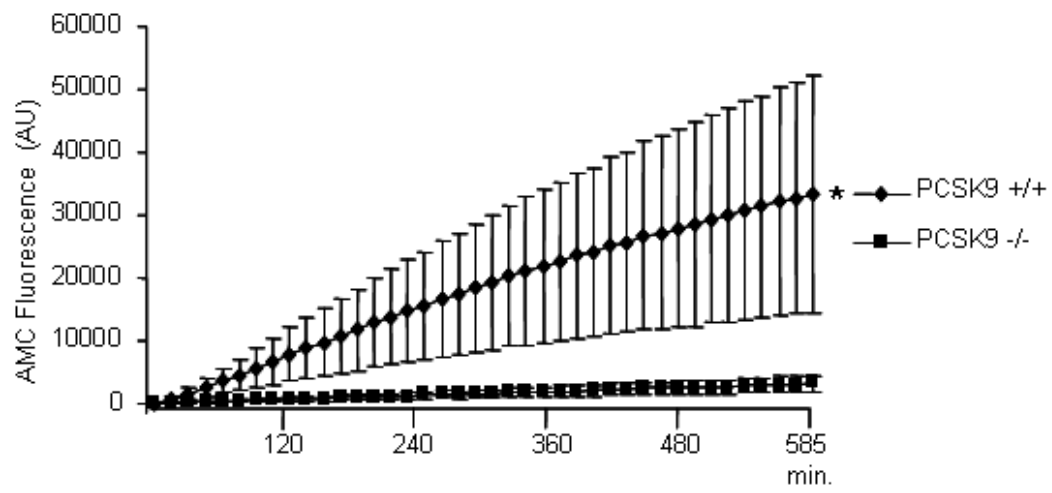


Figure 2

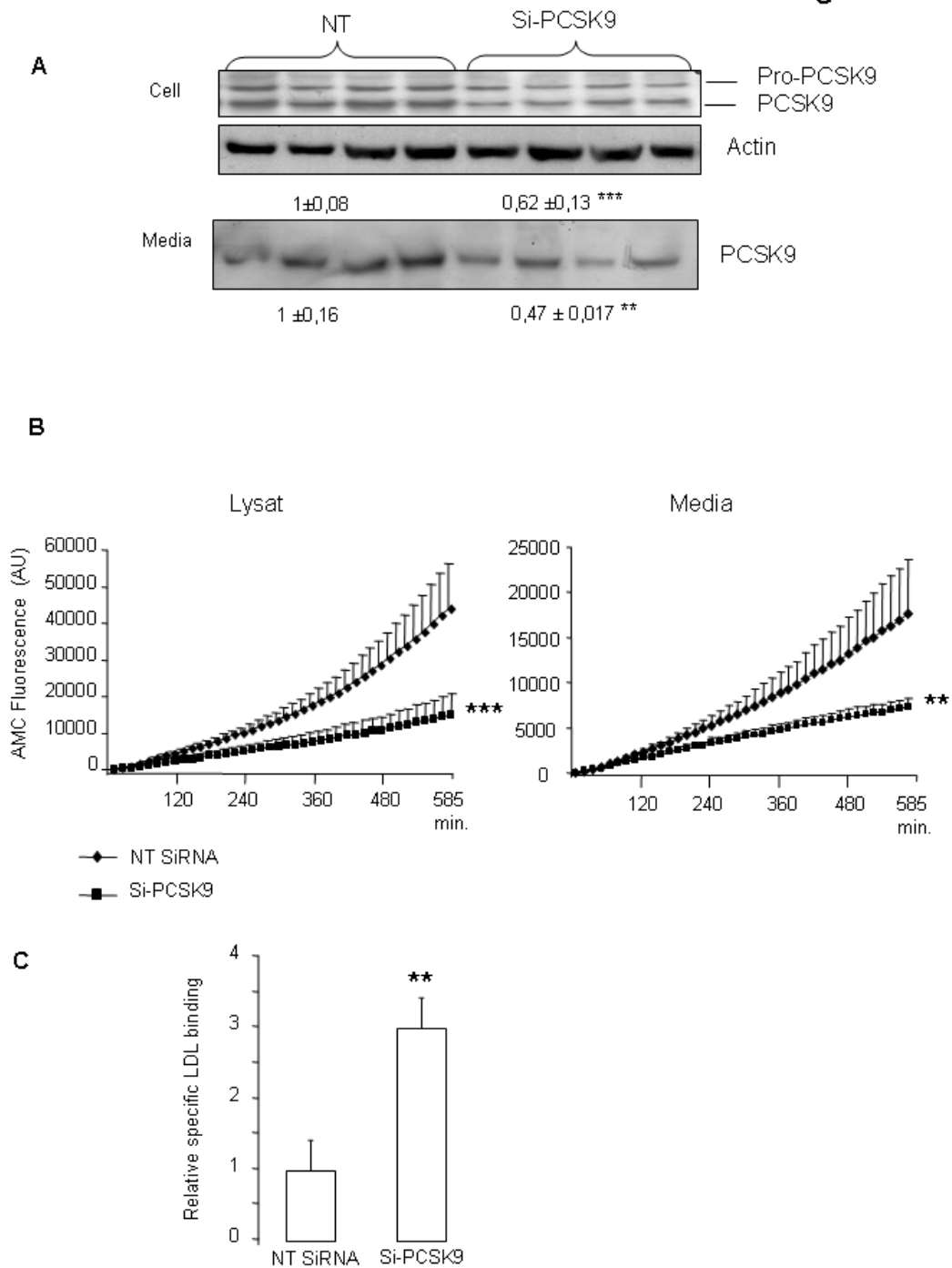


Figure 3

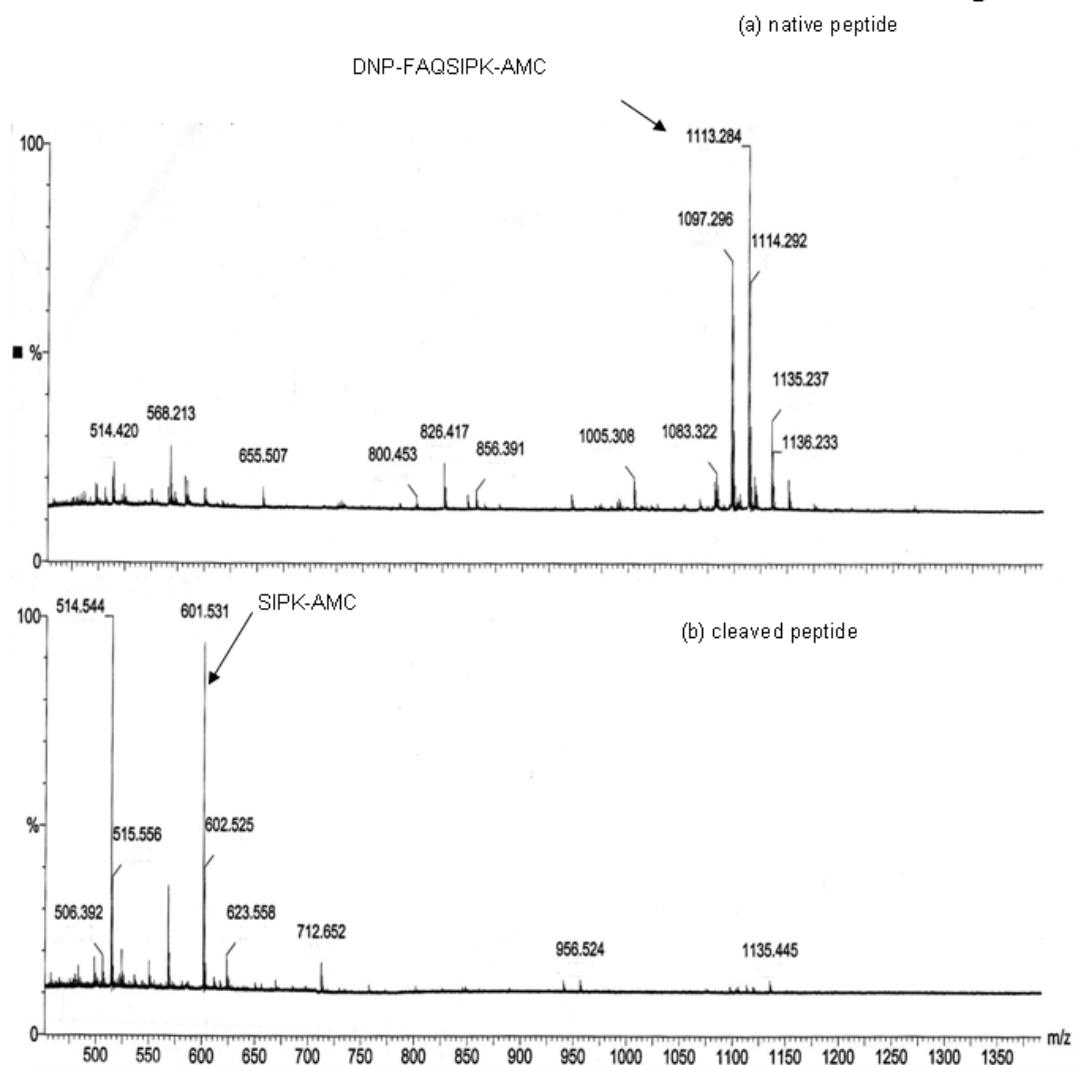


Figure 4

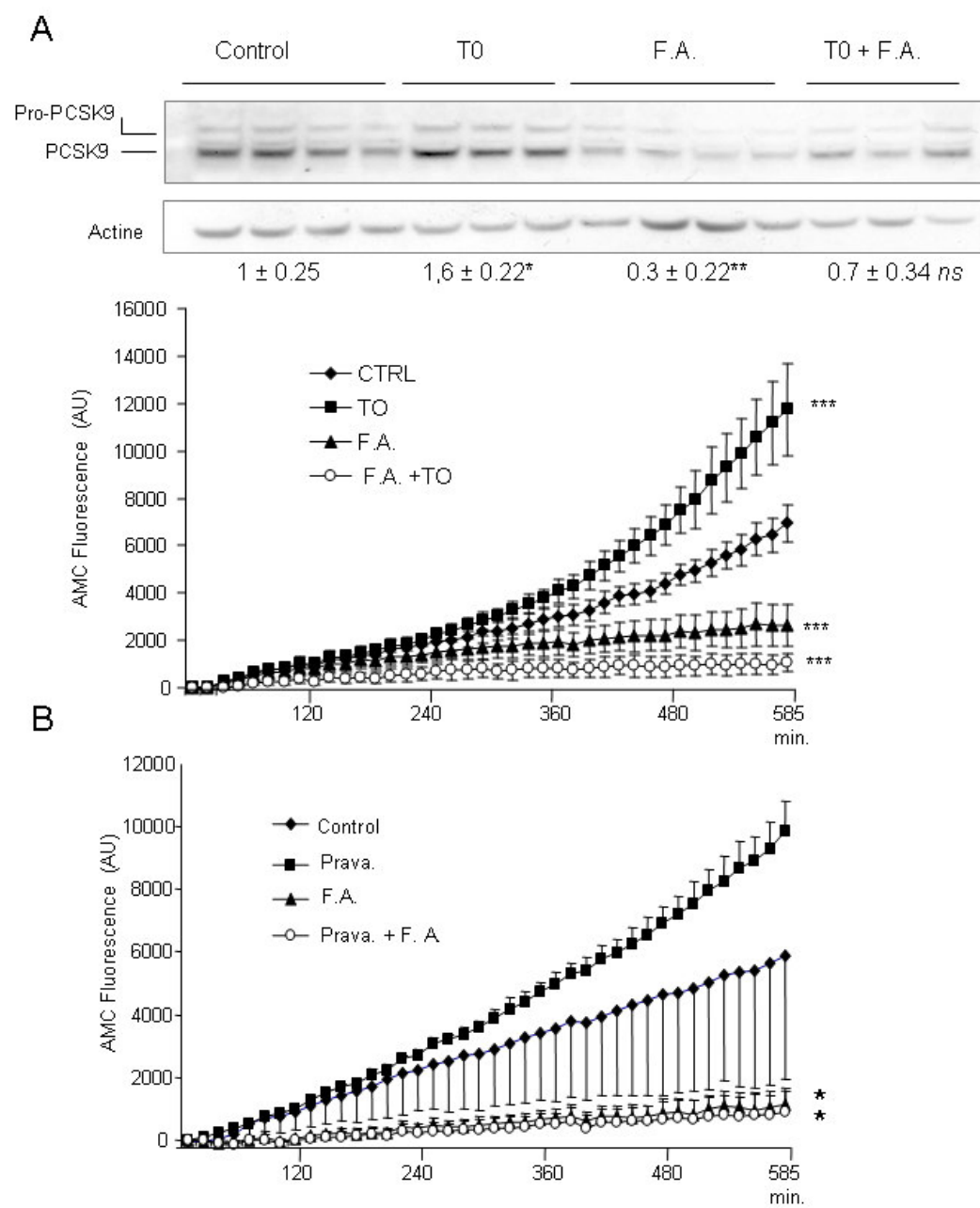
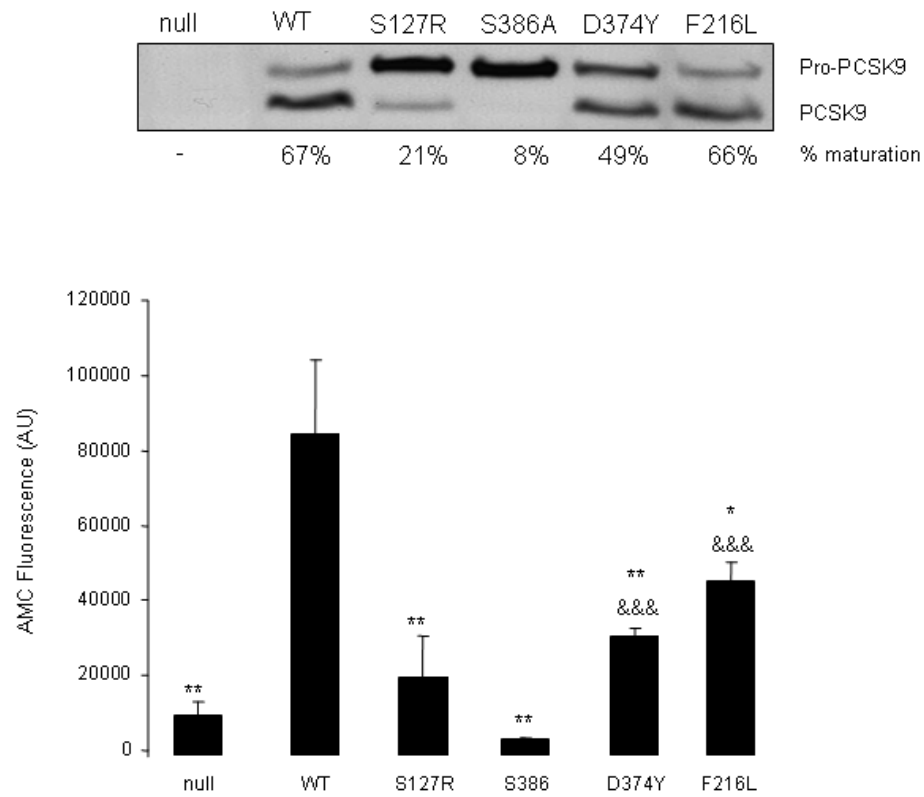


Figure 5



II.3 Discussion et conclusion

Dans cette étude nous avons donc démontré que l'activité autocatalytique de PCSK9 intracellulaire et sécrétée dans le milieu pouvait être mesurée in-vitro. L'activité de PCSK9 reflète clairement l'expression de la protéine PCSK9, que nous avons modulée par des traitements pharmacologiques (agoniste de LXR : T0901317, agoniste de PPAR α : acide fénofibrique seuls ou avec des statines).

Nous avons prouvé que notre test était spécifique de PCSK9, comme en atteste la quasi absence d'activité dans les hépatocytes primaires de souris PCSK9^{-/-} ainsi que la transfection de cellules immortalisées d'origine humaine par des si-RNA dirigés contre PCSK9. De plus l'activité de PCSK9 est réhabilitée dans les hépatocytes primaires des souris PCSK9^{-/-} transfectées par la forme humaine WT de PCSK9, mais, comme attendu, pas par le variant S386A de PCSK9 qui est catalytiquement inactif.

Puis nous avons également prouvé par MALDI TOF qu'il s'agissait bien du site de clivage correspondant à PCSK9.

Enfin, lorsque nous avons appliqué ce test pour étudier l'activité catalytique de variant de type gain de fonction de PCSK9 : S127R, D374Y. Nous avons observé une concordance entre le rapport de détection de la forme pro de PCSK9 et la forme mature que nous avons détecté par western blot. Cependant, pour le cas du variant F216L, l'activité que nous avons détecté était plus faible que celle de la forme WT, mais le ratio pro-PCSK9/PCSK9 estimé par western blot était identique à celui de la forme WT. Ce résultat suggère qu'il existerait un autre mécanisme impliquant d'autres facteurs intervenants dans le processus de maturation de PCSK9.

PCSK9 est aujourd'hui considérée comme une protéine chaperonne du LDLR, son activité catalytique ne semble pas être nécessaire pour dégrader le LDLR. Cependant, si PCSK9 ne subit pas d'autoclivage dans le RE, elle ne pourra pas quitter celui-ci et ne pourra -a fortiori- pas dégrader le LDLR. Cette étude permettrait d'identifier de nouveaux modulateurs de l'activité autocatalytique de pro-PCSK9 -en ciblant le RE- et de les envisager pour diminuer le LDL-c.

III. PCSK9 : un nouveau lien moléculaire dans l'insulinorésistance et les dyslipidémies ?

III.1. Introduction

Notre laboratoire a participé au recrutement de patients porteurs de mutations gains de fonction du gène *PCSK9*, -notamment la mutation S127R- (Abifadel *et al.*, 2003), celles-ci sont associées à l'ADH. En revanche des patients porteurs de mutations perte de fonction de *PCSK9* présentent en moyenne une diminution du taux de LDL-c de 28% -par rapport aux patients non porteurs de ces mutations- ainsi qu'une diminution du risque d'apparition de maladies coronariennes de 88% (Cohen *et al.*, 2006).

PCSK9 est une proprotéine convertase subissant un autoclivage dans le réticulum endoplasmique indispensable pour son départ vers la sécrétion.

Notre laboratoire a caractérisé le métabolisme des lipoprotéines riches en apoB de patients porteurs de la mutation faux sens S127R (*PCSK9*-S127R). L'apoB est présente majoritairement dans les lipoparticules athérogènes (chylomicrons intestinaux ou VLDL hépatiques transformées en IDL puis LDL et épurées par le foie). L'analyse cinétique du métabolisme de ces lipoprotéines chez deux patients *PCSK9*-S127R montre une diminution du catabolisme des lipoparticules riches en apoB. Ces résultats suggèrent une augmentation importante des concentrations plasmatiques de VLDL, IDL et LDL, liée à une synthèse accrue en apoB100. Les résultats obtenus sur les patients *PCSK9*-S127R ont été confortés par l'étude *in vitro* d'autres mutations (Sun *et al.*, 2005).

Le profil des cinétiques des patients *PCSK9*-S127R est caricatural de ce que l'on observe chez le patient diabétique. Notre laboratoire a donc ensuite entrepris d'explorer l'impact du jeûne et de l'insuline sur l'expression et la fonction de *PCSK9*. Les résultats montrent que l'expression de *PCSK9* diminue lors du jeûne et est restaurée dès 12h de réalimentation. De plus l'expression de *PCSK9* est stimulée par l'insuline via SREBP-1C (Costet *et al.*, 2006). Enfin, une autre étude menée par notre laboratoire, a montré chez la souris à jeun surexprimant *PCSK9*, une surproduction hépatique de lipoparticules riches en triglycérides (+150%) (VLDL et IDL) ainsi que d'apoB48 et 100 (Lambert *et al.*, 2006).

L'objectif de ce projet était de déterminer l'implication de *PCSK9* dans la surproduction d'apoB observée chez le patient diabétique ou insulinorésistant sur des modèles animaux de diabètes ou d'insulinorésistance.

Cependant, les résultats exposés ici, ne concerne que la caractérisation de l'expression de *PCSK9* dans ces modèles animaux. D'autres investigations actuellement en cours au laboratoire pourront mieux éclairer sur une éventuelle implication de *PCSK9* dans les maladies métaboliques liées à l'insuline.

III.2. Résultats

III.2.1. le modèle d'insulinorésistance d'origine nutritionnelle

Nous avons choisi le modèle du Hamster doré de Syrie soumis à un régime enrichi en fructose (60%) (Que nous appellerons ici « FF » pour « Fructose Fed »). Ce modèle a la particularité de développer une hyperinsulinémie chronique accompagnée d'une hypertriglycémie puis d'une insulinorésistance dès deux semaines de régime (Taghibiglou *et al.*, 2000). En outre, le métabolisme des lipoprotéines du Hamster est très proche de celui de l'homme. En effet, tout comme pour l'homme, le LDL est le transporteur majoritaire du cholestérol chez le Hamster (Sullivan *et al.*, 1993), ce qui n'est pas le cas de la souris par exemple, dont le transporteur majeur du cholestérol est le HDL. De plus, la répartition en apoB48 (intestin) et apoB100 (foie) chez le hamster est identique à celle observée chez l'homme. Cette répartition est inversée dans d'autres modèles, comme le rat par exemple.

Afin de vérifier l'impact du régime sur les hamsters, nous avons regardé les différents paramètres dont les résultats sont récapitulés dans la figure 27. Comme attendu, les hamsters FF présentent une augmentation significative ($p < 0.005$) de leur taux de triglycérides par rapport aux hamsters témoins (CTRL) (respectivement 1.3 g/l versus 0.8 g/l). Ceci s'est accompagné d'une augmentation significative ($p < 0.05$) du niveau d'insuline plasmatique chez les hamsters FF (0.25 ng/ml) par rapport au CTRL (0.55 ng/ml) -caractéristique de l'insulinorésistance- en revanche nous n'avons pas observé de variation significative du taux de cholestérol. Enfin, les hamsters FF ont également une augmentation significative de leur poids de 60% ainsi qu'une augmentation de 16 % de leur niveau de glycémie.

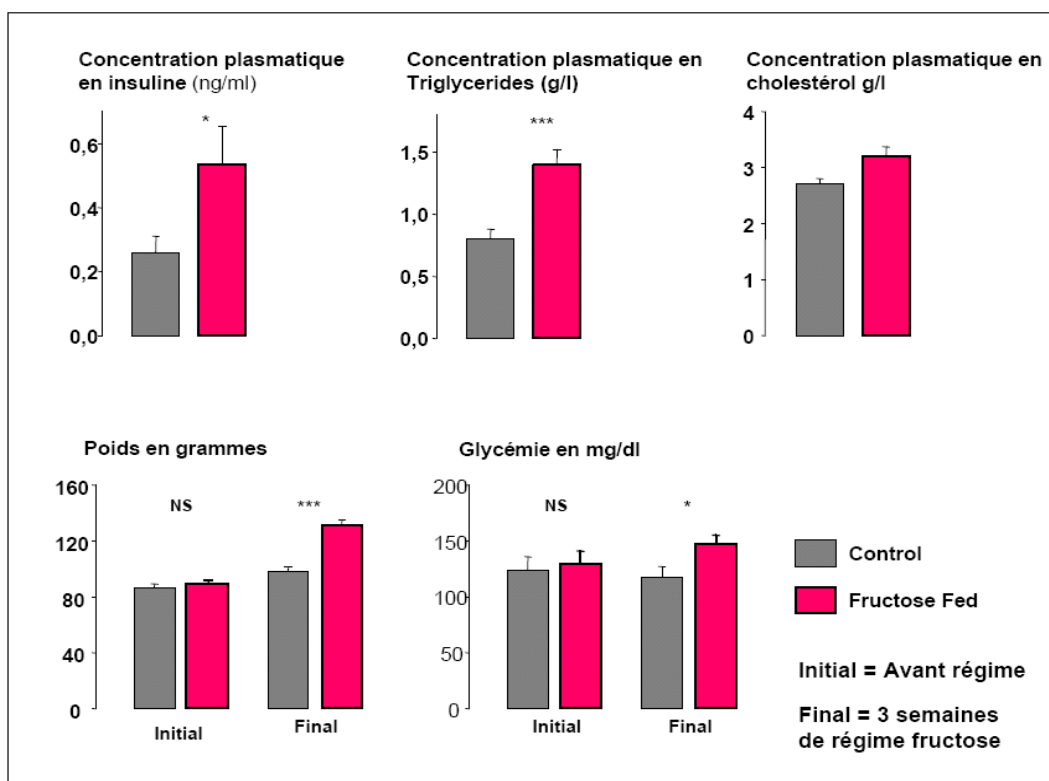


Figure 27 : Impact du régime « 60% fructose » sur les paramètres insulinémique, lipidiques glycémique et poids chez le Hamster (*p<0.05, *p<0.001)**

Nous avons ensuite regardé l'impact d'un tel régime sur les niveaux d'ARNm de PCSK9 hépatique par PCR quantitative rapporter au gène de ménage : la cyclophiline, le résultat obtenu est en figure 28. Nous pouvons noter une diminution significative de 50% de l'expression de PCSK9 chez les animaux FF par rapport au CTRL (*p<0.05).

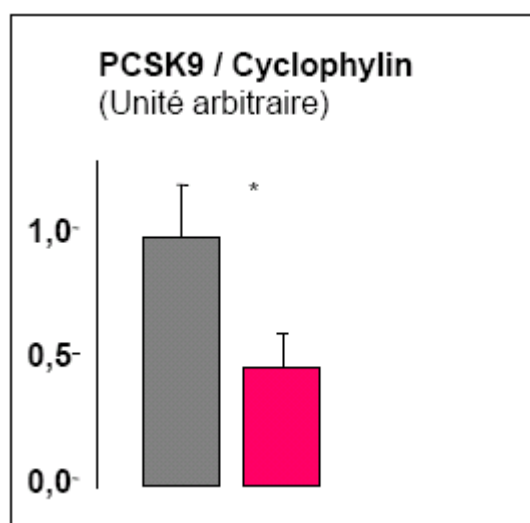


Figure 28 : Expression de l'ARNm de PCSK9 dans le foie des Hamsters FF (en rose, n=12) vs CTRL (en gris n=12) mesurée par PCRq en temps réel (*p<0.05)

III.2.2. Le modèle de diabète de type 1

Nous avons ici utilisé un modèle animal de diabète de type 1 modéré (les souris ont été sacrifiées 4 jours après injection intrapéritonéale de STZ à 150 mg/kg) ou sévère (le sacrifice des souris a eu lieu 2 semaines après injection de STZ à 175 mg/kg).

Afin de vérifier l'état diabétique des souris nous avons mesuré leur glycémie avant et après traitement. Pour les souris modérément diabétiques, la glycémie était en moyenne de 363 comparé à 233 mg/dl pour les souris ayant été injectées par du citrate de sodium -tampon de dissolution de la STZ- (Figure 29). Ceci s'accompagnait par en moyenne une diminution de 36% du taux plasmatique d'insuline (0,75 ng/ml pour les contrôles et 0,48 ng/ml pour les STZ) (Figure 30). Les paramètres lipidiques : cholestérol et triglycérides ne variaient pas.

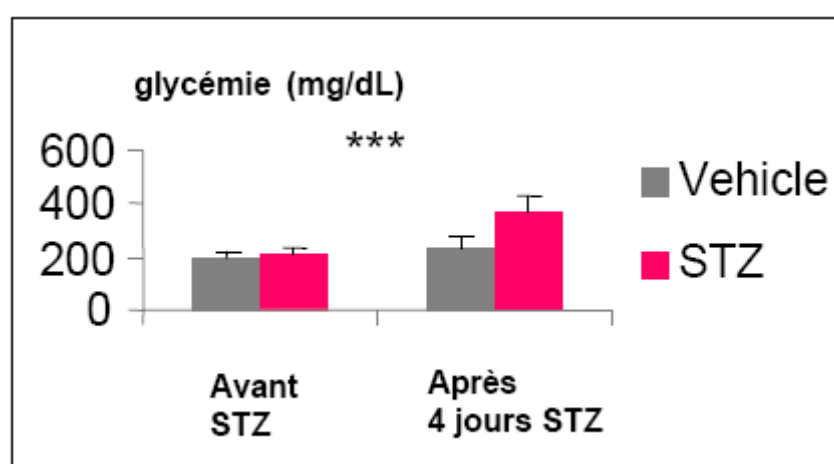


Figure 29 : Glycémie des souris contrôles (« vehicle » n= 7) vs injectées par la streptozotocine (STZ n=7) à 150 mg/ kg (**p<0.001)

Pour les souris ayant développé un diabète sévère, on a observé une hyperglycémie supérieure à 500 mg/dl, dépassant le seuil de détection du glucomètre que nous avons utilisé.

Le taux plasmatique d'insuline était diminué en moyenne de 81% chez les souris STZ (0.12 ng/ml pour STZ vs 0.65 ng/ml pour les souris contrôles) -il s'agit de l'insulinopénie, caractéristique de ce type de diabète-. Nous n'avons cependant pas détecté de modification des paramètres lipidiques cholestérol et triglycérides.

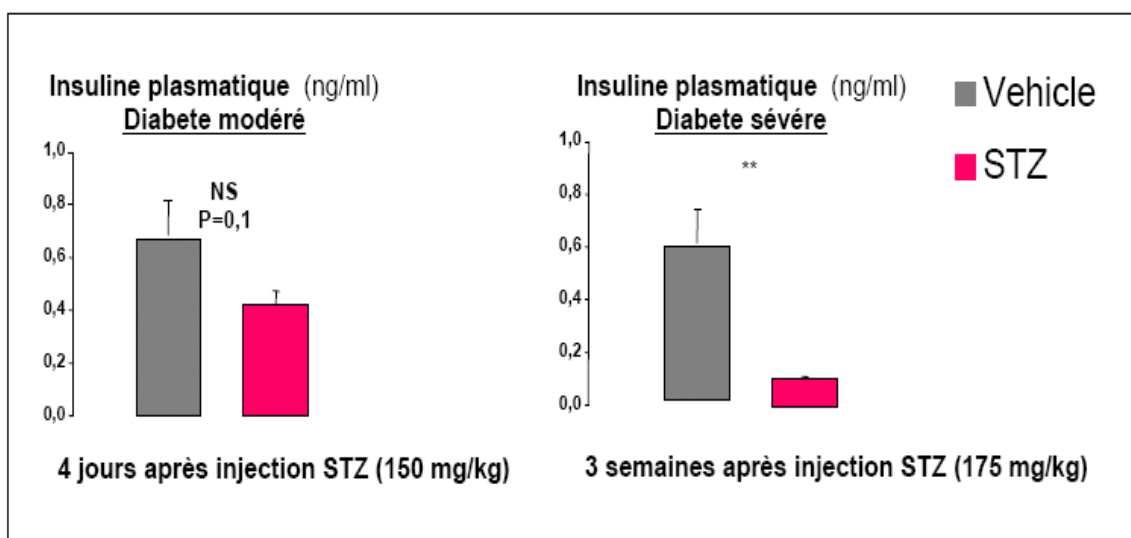


Figure 30 : Insulinémie des souris contrôles (« vehicle ») vs injectées par la streptozotocine (STZ) dans un modèle de diabète modéré ou sévère

Nous avons par la suite regardé les niveaux d'ARNm de PCSK9 dans le foie de ces souris (rapportés au gène de ménage cyclophiline) par PCR quantitative en temps réel, les résultats sont représentés dans la figure 31. Nous pouvons noter une augmentation significative ($p<0.05$) de l'expression de PCSK9 dans le modèle de diabète de type 1 sévère -soit une augmentation de 62%- cette diminution n'était pas significative dans le modèle de diabète modéré. Nous avons aussi regardé l'expression de la glucokinase, qui est une enzyme dont la transcription est activée par l'insuline. Comme attendu l'ARNm de la glucokinase était diminué de 75% dans le modèle de diabète sévère. En revanche cette diminution n'était pas significative dans le modèle de diabète modéré.

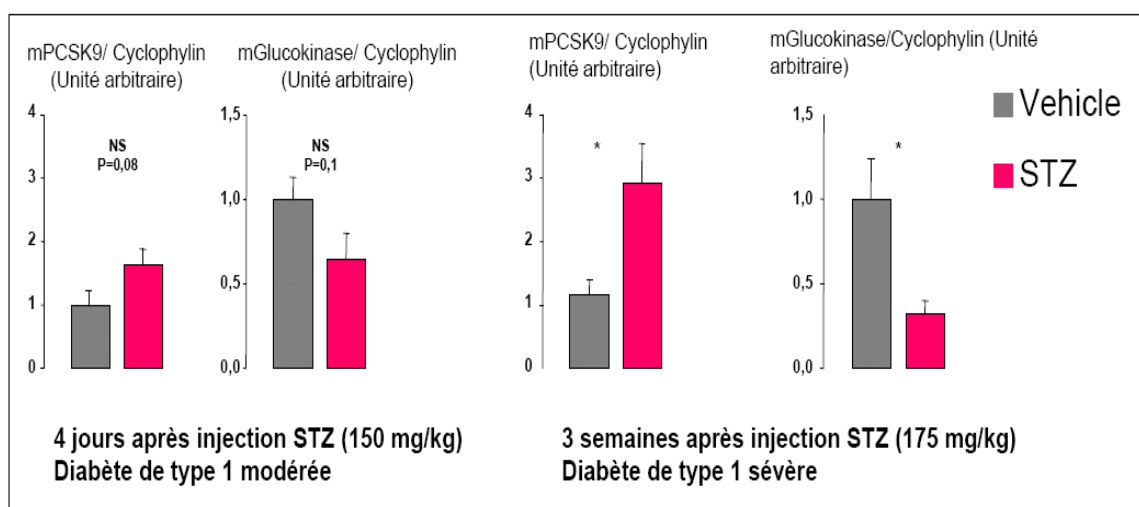


Figure 31 : Expression de l'ARNm de PCSK9 dans le foie des souris STZ vs « vehicle » selon un diabète de type 1 modéré (à gauche) ou sévère (à droite)

Nous avons enfin regardé par western blot les niveaux protéiques de l'expression de PCSK9 dans le foie des souris ayant développées un diabète sévère par rapport au souris contrôles. En concordance avec l'ARNm de PCSK9, nous observons une augmentation de l'expression de PCSK9 de 35% (Figure 32).

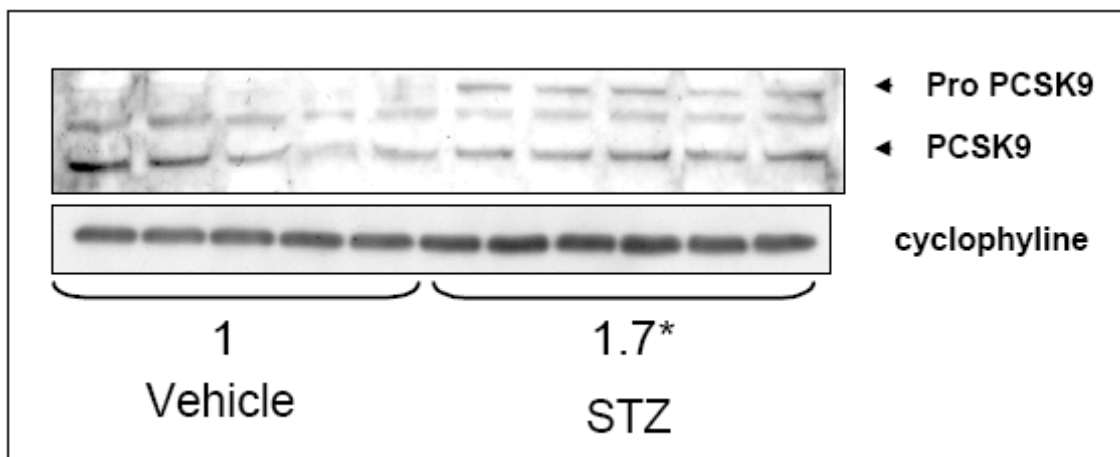


Figure 32 : Expression de la protéine PCSK9 détectée par Western Blot (50µg de protéine par puits) dans le foie des souris STZ diabète sévère vs « vehicle », densitométrie par rapport à la cyclophiline *p<0.05)

III.3. Conclusion

Nous avons montré ici une variation de l'expression de PCSK9 selon le modèle de diabète choisi.

Dans le modèle nutritionnel d'insulinorésistance, qui est plus particulièrement un modèle de pré-diabète de type 2, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'expression hépatique de PCSK9. Nous avons également obtenu les mêmes résultats dans un modèle de diabète de type 2 db/db, où une mutation du gène codant pour le récepteur à la leptine est à l'origine du développement de ce diabète (ces données ne sont pas présentées ici).

En revanche, dans le modèle de diabète de type 1, c'est-à-dire insulinopénique, nous avons pu voir une augmentation de l'expression hépatique de PCSK9.

Au cours de ma thèse, je n'ai caractérisé que les niveaux d'expression de PCSK9 dans le foie de ces modèles animaux, et montré qu'il y avait effectivement une influence de l'état diabétique -très probablement liée à l'insuline- sur l'expression de PCSK9. D'autres investigations concernant un éventuel mécanisme impliquant PCSK9 dans le développement des maladies métaboliques liées à l'insuline seront nécessaires pour compléter cette étude préliminaire.

IV. Articles Annexes - participation à d'autres travaux

IV.1. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes

Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B.

FEBS Lett. 2008 Mar 19;582(6):949-55. Epub 2008 Feb 25

Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes

Cédric Langhi^{a,b}, Cédric Le May^{a,b}, Sanae Kourimate^{a,b}, Sandrine Caron^{d,e,f}, Bart Staels^{d,e,f},
Michel Krempf^{a,b,c}, Philippe Costet^{a,b}, Bertrand Cariou^{a,b,c,*}

^a INSERM, U915, CHU Hôtel Dieu, 3^{ème} NORD, Nantes F-44000, France

^b Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'Institut du Thorax, Nantes F-44000, France

^c CHU Nantes, Clinique d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, l'Institut du Thorax, Nantes F-44000, France

^d Institut Pasteur de Lille, Département d'Athérosclérose, Lille F-59019, France

^e INSERM, U545, Lille F-59019, France

^f Université de Lille 2, Faculté de Pharmacie, Faculté de Médecine, Lille F-59006, France

Received 22 December 2007; revised 12 February 2008; accepted 17 February 2008

Available online 25 February 2008

Edited by Robert Barouki

Abstract The purpose of this study was to determine whether bile acids (BAs) modulate hepatic pro-protein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) gene expression. Immortalized human hepatocytes were treated with various BAs. Chenodeoxycholic acid (CDCA) treatment specifically decreased both PCSK9 mRNA and protein contents. Moreover, activation of the BA-activated farnesoid X receptor (FXR) by its synthetic specific agonist GW4064 also decreased PCSK9 expression. Of functional relevance, coadministration of CDCA counteracted the statin-induced PCSK9 expression, leading to a potentiation of LDL receptor activity. This study suggests that a transcriptional repression of PCSK9 by CDCA or FXR agonists may potentiate the hypolipidemic effect of statins.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: PCSK9; Bile acid; FXR; Statin; LDL-cholesterol

1. Introduction

Pro-protein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) has recently emerged as a central player in the regulation of cholesterol homeostasis [1]. In addition to mutations affecting the LDL-receptor (LDLr) and apolipoprotein B, “gain-of-function” PCSK9 mutations lead to an increase of plasma LDL-cholesterol (LDL-c) levels and premature atherosclerosis [1,2]. In contrast, “loss-of-function” mutations are associated with low levels of LDL-c and confer protection against cardiovascular disease [3]. PCSK9 is primarily expressed in the liver and the intestine. PCSK9 inhibits the LDLr activity in a post-transcriptional manner [1]. Recent data suggest that, once

cleaved, secreted PCSK9 acts as a chaperone and promotes the intracellular degradation of the LDLr by interfering with its recycling to the plasma membrane [4,5].

Various positive and negative regulatory pathways of PCSK9 have been identified. The hypocholesterolemic drugs statins were shown to increase PCSK9 expression, a pathway which exerts a break on their efficiency [6,7]. In accordance with this negative feedback pathway, PCSK9-deficient mice [8] and patients bearing non sense mutations for PCSK9 [9] are more responsive to statins. Our laboratory characterized the PCSK9 promoter and showed that PCSK9 is also up-regulated by insulin as well as by the Liver X Receptor agonist T0901317 via SREBP-1c [10]. In an opposite way, fenofibrate decreases hepatic PCSK9 expression in a PPAR α -dependent manner [11].

Bile acids (BAs) are liver-synthesized cholesterol-derivatives that represent the major route for removal of excess cholesterol from the body. Besides their role as detergents, it has now been clearly demonstrated that BAs also exert signalling activities and regulate gene expression in a variety of tissues, including liver and intestine, at least partly through the activation of the farnesoid X receptor (FXR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors [12,13]. In addition to FXR, BAs can also activate other nuclear receptors such as PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor) and vitamin D receptor [14,15].

Here, we investigated whether BAs can modulate the expression of PCSK9. We found that chenodeoxycholic acid (CDCA) specifically represses PCSK9 expression in immortalized human hepatocytes, thereby potentiating the activity of the LDLr in response to statins.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

BAs (CDCA, UDCA, DCA, CA, LA), pravastatin, rifampicin and actinomycin D were purchased from Sigma (France). GW4064 was kindly provided by Genfit (Loos, France).

2.2. Cell culture

Immortalized human hepatocytes were cultured on collagen-coated flasks in William's E medium in the presence of a 10% fetal calf serum (FCS). HepG2 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS and 1% glutamine. The cells were exposed to various treatments in the

*Corresponding author. Address: INSERM, U915, CHU Hôtel Dieu, 3^{ème} NORD, Nantes F-44000, France. Fax: +33 (0) 2 40 28 75 44.
E-mail address: bertrand.cariou@univ-nantes.fr (B. Cariou).

Abbreviations: BA, bile acid; CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; FXR, farnesoid X receptor; IHH, immortalized human hepatocytes; LA, lithocholic acid; LDL-c, low density lipoprotein cholesterol; LDLr, low density lipoprotein receptor; PCSK9, pro-protein convertase subtilisin/kexin 9; PXR, pregnane X receptor; UDCA, ursodeoxycholic acid

presence of a 5% lipoprotein deficient serum (LPDS) unless notified. For PCSK9 secretion analysis, cells were incubated in 1 ml of medium without FCS and LPDS. Treatment toxicity was assessed by quantification of lactate dehydrogenase activity in cell medium using the Roche cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA).

2.3. Western blots

Proteins were analysed by Western blot as described elsewhere [10], using a polyclonal rabbit IgG directed against the CRSRLAGAS-QELQ peptide (Neosystem, Strasbourg, France), an epitope of the C-terminal domain of human and mouse PCSK9, or with the monoclonal anti β -actin AC-15 antibody (Sigma). For secretion analysis, proteins from 400 μ l of cell culture media were precipitated with acetone.

2.4. RNA extraction and real time PCR

RNA extraction and real time quantitative PCR (Q-PCR) was performed as previously described [10], using the following primers:

LDLR: AAGGCTGTCCCCCAAGA forward, CGAACTGCCGAGAGATGCA reverse; **PCSK9**: ACGTGGCTGGCATTGCA forward, AAGTGGATCAGTCTGCCTCAA reverse; **18S**: AAG-

TCCCTGCCCTTTGTACACA forward, CGATCCGAGGGGCTC-ACTA reverse; **UGT2B4**: CAACCAGTGAAGCCCCTTGA forward, GAAGGTGCTTGGCTCCTTTATG reverse; **SHP**: CTCTTCCT-GCTTGGGTGGC forward, GCACATCGGGGTGAAGAGG reverse; **CYP3A4**: CTCTTCACCGTGACCCAAAGTACT forward, AGCAAACCTCATGCCAATGC reverse.

2.5. Isolation and radiolabelling of LDL

Human LDL (d 1.019–1.063 g/ml) was isolated from plasma of healthy normolipemic fasting donors by isopycnic preparative ultracentrifugation using a discontinuous KBr density gradient [16]. Isolated LDL was dialysed at least 36 h at 4 °C against PBS pH 7.4. Radiolabelling procedure was performed according to the iodogen[®] method modified by Fraker et al. [17].

2.6. Binding of ¹²⁵I-labelled LDL

IHH cells were incubated for 4 h at 4 °C with 10 μ g/ml of ¹²⁵I-labelled LDL in 250 μ l of William's LPDS 5% containing 4% fatty acid-free BSA and 50 mM Hepes, pH 7.4. Non-specific binding was determined by the addition of 0.5 mg/ml unlabelled LDL. At the end of the incubation period, the cells were washed three times with 1 ml of D-PBS containing 1% BSA then three times with 1 ml of D-PBS.

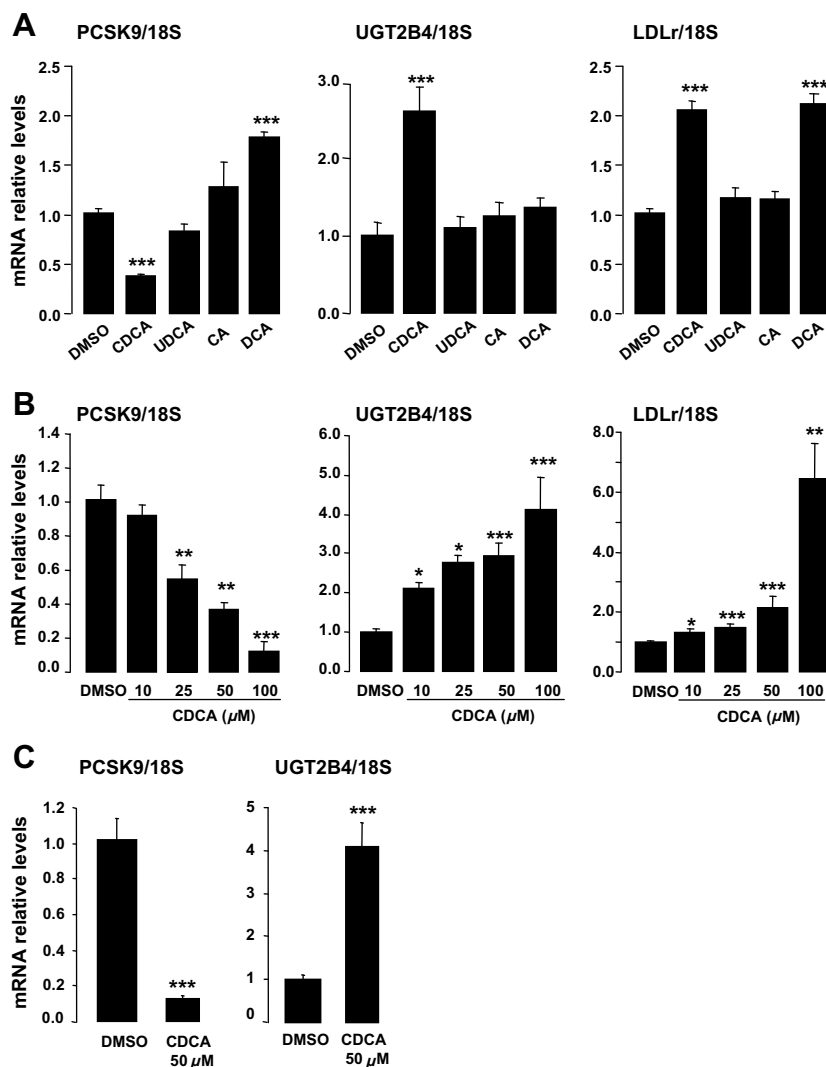


Fig. 1. CDCA reduces PCSK9 mRNA levels in human hepatocytes cell lines. PCSK9, UGT2B4 and LDLr mRNA contents were measured by Q-PCR. (A) IHH, cells were incubated for 48 h with 50 μ M CDCA, CA, UDCA, DCA or vehicle (DMSO). (B) IHH cells were treated with increasing concentrations (as indicated) of CDCA for 48 h. (C) HepG2 cells were treated with 50 μ M CDCA for 48 h. Values are normalized relative to 18S mRNA and are expressed (means $\pm$ S.E.M.; $n = 5$) relative to those of vehicle-treated cells, which are arbitrarily set at 1. Statistically significant differences compared to vehicle-treated cells are indicated (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; and * $P < 0.05$).

The cells were solubilized in 1 ml of 1 M NaOH, the protein content was determined using BSA as a standard, and the radioactivity was measured (1480 Wizard 3" Automatic Gamma Counter, Wallac, Waltham, Massachusetts, USA). The measured radioactivity was normalized per milligram of cell protein, the specific binding was calculated by subtracting the non-specific binding of 125 I-labelled LDL from the total binding.

2.7. Statistics

Results are representative of at least two independent experiments, with at least triplicates in each experiment. Statistical significance was analyzed using an unpaired Student's *t*-test. The values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Repression of PCSK9 by chenodeoxycholic acid in human hepatocytes

To investigate the effects of BAs on PCSK9 gene expression, IHH cells were treated for 48 h with a variety of primary (CDCA, CA, UDCA) and secondary (LA, DCA) BAs at the concentration of 50 μ M (Fig. 1A). Excepted for the LA, these treatments did not affect the cell toxicity assessed by the level of the lactate dehydrogenase activity in cell medium (*data not shown*). CDCA was found to decrease PCSK9 mRNA

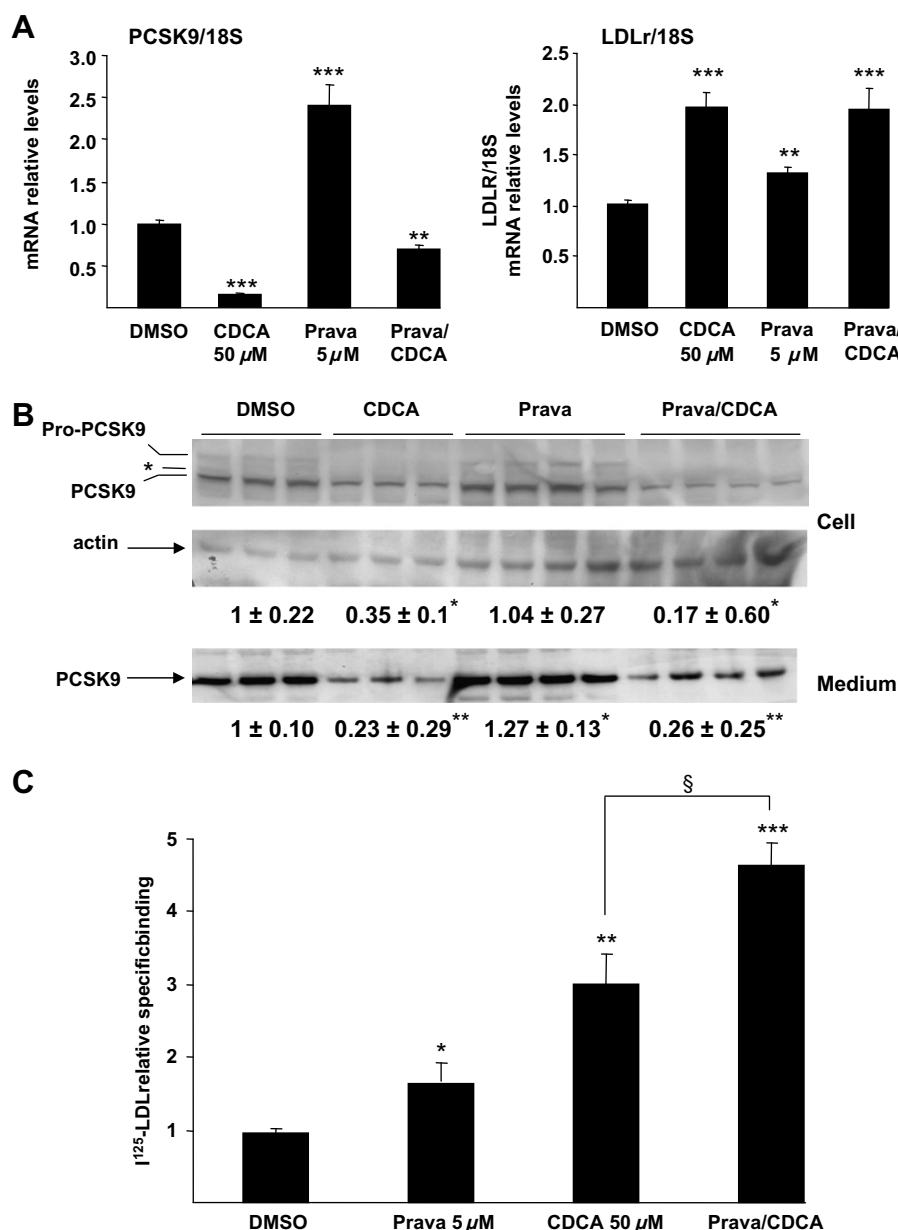


Fig. 2. CDCA amplifies the effect of pravastatin on LDLr activity. IHH cells were pre-treated with 50 μ M CDCA or vehicle (DMSO) for 24 h. Then, 5 μ M pravastatin was added, or not, to each condition for additional 24 h (DMSO, Prava, CDCA, CDCA+Prava). (A) PCSK9 and LDLr mRNA contents were measured by Q-PCR, as described in Fig. 1. Values are means $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (B) Cell lysates and media were collected and their protein content analyzed by Western blot and quantified using Image J 1.37v (Wayne Rasband, N.I.H., USA). Values represent the means $\pm$ S.E.M. ($n = 3-4$). This blot is representative of two independent experiments. * indicates a non-specific band. (C) LDLr activity was quantified by measuring the specific binding of 125 I-labelled LDL for 4 h at 4 $^{\circ}$ C. Statistically significant differences compared to DMSO (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; and * $P < 0.05$) or between combined treatment CDCA/pravastatin with CDCA (§ $P < 0.05$) are indicated.

levels (-59% , $P < 0.001$). In contrast, DCA increased PCSK9 gene expression ($+76\%$, $P < 0.001$), whereas CA and UDCA had no effect. Since CDCA is the more potent natural agonist of FXR [18], the expression of the FXR target-gene UGT2B4 [19] was measured under the same conditions. As expected, CDCA was the sole BA which significantly increased UGT2B4 mRNA levels (Fig. 1A). The effect of BAs treatment on LDLr expression was also investigated in IHH cells. In accordance with previous results in HepG2 cells [20], both CDCA and DCA increased LDLr mRNA levels ($+104\%$, $P < 0.001$ and $+109\%$, $P < 0.001$, respectively) (Fig. 1A). Notably, a strong induction of LDLr mRNA levels was observed for the higher dose of CDCA ($+544\%$ with $100 \mu\text{M}$, $P < 0.001$) (Fig. 1B). Conversely, a significant and dose-dependent repression of PCSK9 mRNA levels was observed in IHH cells treated with various doses of CDCA for 48 h (Fig. 1B). Moreover, this repression of PCSK9 also occurred in HepG2 cells treated with $50 \mu\text{M}$ CDCA (-87% , $P < 0.001$) (Fig. 1C). Taken together, these results demonstrate that CDCA is a new repressor of PCSK9 gene expression in human hepatocytes.

3.2. CDCA amplifies the effect of pravastatin on LDLr activity

To assess whether PCSK9 upregulation by statins could be affected by CDCA, we first exposed IHH cells to $50 \mu\text{M}$ CDCA or DMSO during 24 h before adding or not $5 \mu\text{M}$ pravastatin for an additional 24 h. As expected [6], 24 h treatment with pravastatin alone increased PCSK9 mRNA levels ($+141\%$, $P < 0.001$). Interestingly, pretreatment with CDCA abolished the induction of PCSK9 gene expression in response to pravastatin. The statin only slightly increased LDLr gene expression ($+32\%$, $P < 0.01$), as described elsewhere [6]. The combination of both drugs did not further increase LDLr mRNA levels compared to CDCA treatment alone (Fig. 2A). In accordance to the mRNA variations, CDCA strongly reduced the quantity of both intracellular and secreted PCSK9 protein content, even in the presence of pravastatin (Fig. 2B). To further investigate whether CDCA functionally influences LDLr activity, IHH cells were treated for 48 h with $50 \mu\text{M}$ CDCA and the surface binding of ^{125}I -labelled human LDL was assayed (Fig. 2C). Both pravastatin and CDCA increased the LDLr activity ($+72\%$, $P < 0.05$ and $+204\%$, $P < 0.001$ vs. DMSO, respectively). Interestingly, when a combined treatment with CDCA and pravastatin was performed, a

significant 55% ($P < 0.05$) additional increase in LDLr activity was observed compared with CDCA alone. Altogether these data suggest that CDCA potentiates the effect of pravastatin on LDLr activity by preventing the concomitant induction of PCSK9 expression.

3.3. CDCA-mediated repression of PCSK9 gene expression occurs at the transcriptional level

In order to verify the possibility that CDCA reduced PCSK9 mRNA quantity by a process involving mRNA stabilization, IHH cells were treated for 24 h with either vehicle or $50 \mu\text{M}$ CDCA before the transcriptional inhibitor actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$) was added to the medium during the indicated times. As observed in Fig. 1, CDCA treatment for 24 h decreased PCSK9 mRNA levels while it concomitantly increased the expression of SHP, a direct FXR target gene [21]. PCSK9 mRNA half-life was greater than 9 h and was not altered by CDCA. Under the same experimental conditions, the half-life of SHP mRNA was less than 3 h and seemed unaltered by CDCA pre-treatment (Fig. 3). These results suggest that CDCA acts at the transcriptional level to modulate PCSK9 gene expression.

3.4. Activation of FXR by the synthetic FXR ligand GW4064 represses PCSK9 expression and increases LDLr activity

In order to test whether the regulation of PCSK9 expression by CDCA depends on FXR activation, IHH cells were treated by the synthetic FXR agonist GW4064 (Fig. 4A). A dose-dependent down-regulation of PCSK9 mRNA levels was observed with GW4064 compared to vehicle-treated cells. Moreover, treatment with high doses of GW4064 ($\geq 2.5 \mu\text{M}$) also led to a significant increase of LDLr mRNA levels. Importantly, a similar repression of PCSK9 in response to $5 \mu\text{M}$ GW4064 was observed in HepG2 cells (-88% , $P < 0.001$) (Fig. 4B). In accordance with mRNA variations, treatment with $1 \mu\text{M}$ GW4064 for 48 h decreased both intracellular and secreted PCSK9 protein content (Fig. 4C).

Next, we assessed whether the repression of PCSK9 by BAs can be mediated by the activation of PXR. IHH cells were treated with rifampicin, a potent PXR ligand [22] (Fig. 4D), PXR activation led to a dose-dependent increase of PCSK9 gene expression, thus excluding its participation in the CDCA-mediated repression of PCSK9. While rifampicin

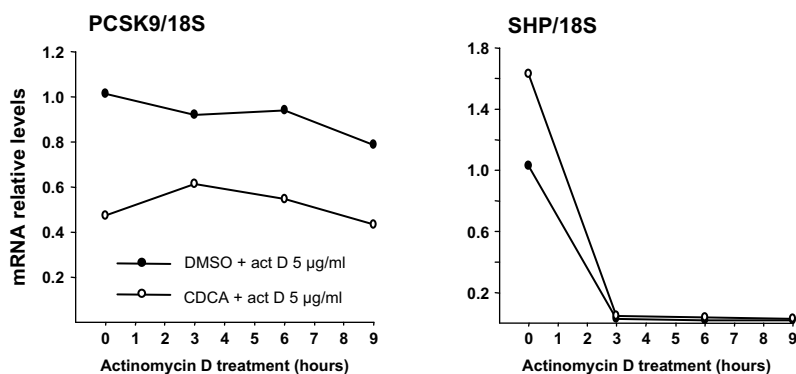


Fig. 3. CDCA regulates PCSK9 expression at the transcriptional level. The half-life of PCSK9 mRNA is unaffected by CDCA. IHH cells were cultured for 24 h in the presence or absence of $50 \mu\text{M}$ CDCA. Actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$) was then added to all dishes, and RNA was isolated after the indicated time. PCSK9 and SHP mRNA contents were measured by Q-PCR as described in Fig. 1. Values are means $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). Statistically significant differences compared to DMSO ($***P < 0.001$).

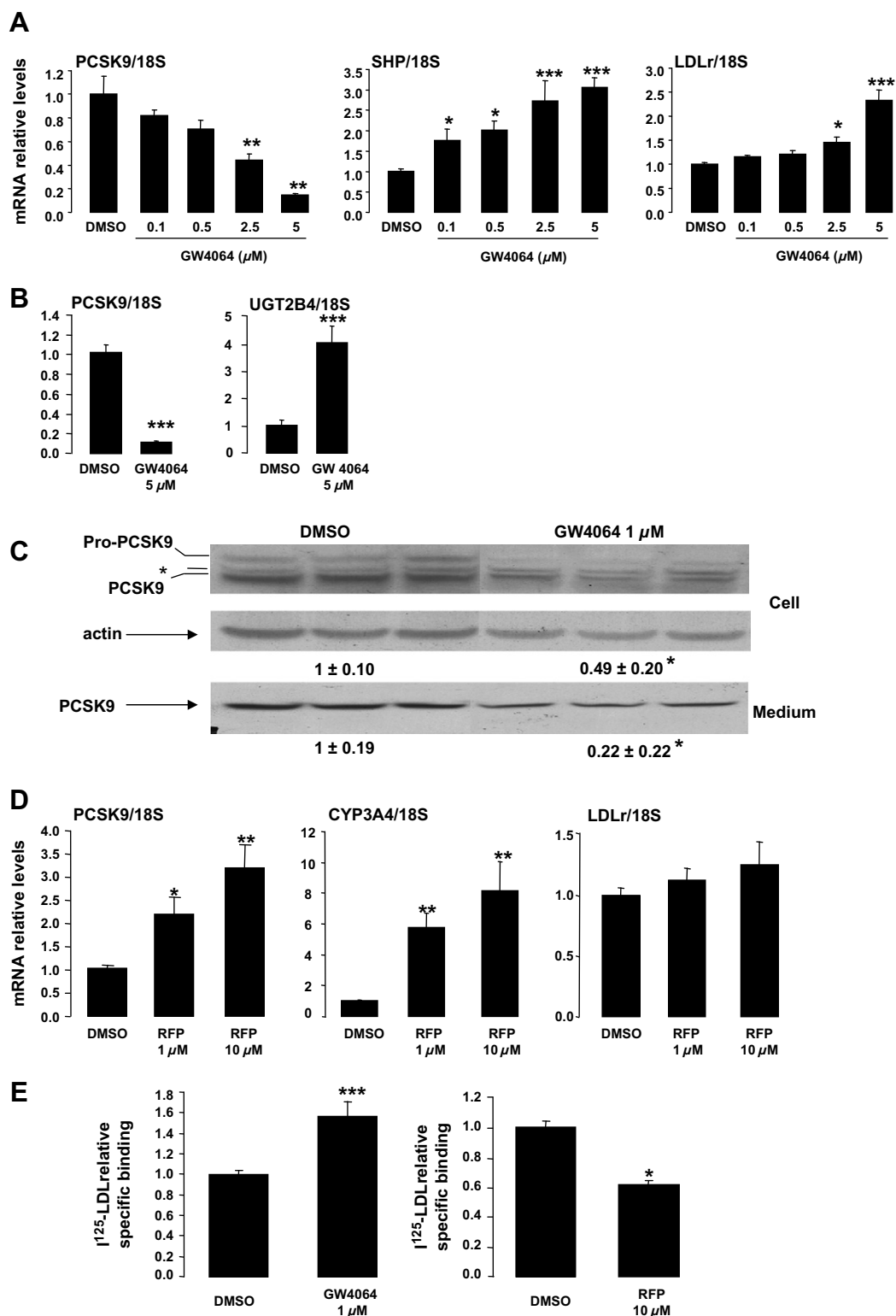


Fig. 4. FXR synthetic agonist GW 4064 represses PCSK9 expression and increases LDLr activity. IHH (A) and HepG2 (B) cells were treated with the indicated concentrations of the FXR synthetic agonist GW4064. PCSK9, SHP, LDLr and UGT2B4 mRNA contents were measured by Q-PCR as described in Fig. 1. Values are means $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (C) GW4064 increases PCSK9 protein content. IHH Cell lysates and media were collected and their protein content analysed by Western blot and quantified using Image J 1.37v (Wayne Rasband, N.I.H., USA). Values represent the means $\pm$ S.E.M. ($n = 3$). This blot is representative of two independent experiments. * indicates a non-specific band. (D) IHH cells were treated with the indicated concentrations of the PXR agonist rifampicine (RFP). PCSK9, CYP3A4 and LDLr mRNA contents were measured by Q-PCR as described in Fig. 1. Values are means $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (E) Effects of GW4064 and RFP on LDLr activity. LDLr activity was quantified as described in Fig. 2B. Values are means $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). Statistically significant differences between control DMSO and specific treatments are indicated (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; and * $P < 0.05$).

strongly induced mRNA levels of the PXR target gene Cyp3A4, it did not alter LDLr mRNA levels.

Of functional relevance, 1 μ M GW4064 significantly increased the LDLr activity (+60%, $P < 0.001$). In correlation with the PXR-mediated induction of PCSK9, LDLr activity was conversely reduced by 30% ($P < 0.05$) in response to 10 μ M rifampicin (Fig. 4E). These results suggest that FXR activation may contribute to the CDCA-mediated repression of PCSK9 in IHH cells.

4. Discussion

Human genetic studies indicate that inhibiting PCSK9 is a very promising strategy to lower LDL-c [3]. One way to reach this goal is to decrease the synthesis of PCSK9. Recently, the administration of an anti-sense oligonucleotide inhibitor targeting PCSK9 in high-fat fed mice led to a 38% decrease of the plasma LDL-c concentrations [23]. An alternative strategy is to directly inhibit PCSK9 transcription. In the current study, we demonstrated for the first time that CDCA is a new repressor of PCSK9 gene expression in human hepatocytes. Of functional relevance, the down-regulation of PCSK9 mRNA levels by CDCA treatment is associated with an increased LDLr activity. More importantly, CDCA is able to counterbalance the positive regulation of PCSK9 by pravastatin and therefore potentiates its stimulating effect on the LDLr activity. CDCA increases LDLr mRNA levels [20], an effect that should also contribute to stimulate LDLr activity. In our cellular model, however, the potentiation of LDLr activity in response to CDCA and pravastatin combination treatment occurs in the absence of a further increase of LDLr mRNA levels. This finding validates the working hypothesis that coadministration of a PCSK9 inhibitor may amplify the hypolipidemic effect of statins.

Amongst the BAs we tested, only the most potent FXR agonist CDCA repressed PCSK9 expression, indicating that the regulatory pathway might be specific for this nuclear receptor. In accordance with this hypothesis, we found that the specific synthetic agonist GW4064 reduces PCSK9 mRNA and protein contents. Moreover, we demonstrate for the first time that GW4064 increases the LDLr activity in vitro. On the other hand, a contribution of the other signalling pathways induced by the CDCA in the repression of PCSK9 was excluded. Activation of PXR leads indeed to an increased PCSK9 expression and a subsequent decrease of LDLr activity. In addition, treatment with DCA, a more potent ligand than CDCA for the G protein-coupled cell-surface BA receptor TGR5 [24], moderately increased PCSK9 expression. CDCA has been shown to increase LDLr mRNA stability by inducing mitogen activated protein (MAP) kinase signalling pathways, particularly extracellular-regulated kinases (ERK) 1/2 [20]. Inhibition of ERK1-2 signalling pathway by the specific inhibitor U0126 significantly reduced PCSK9 mRNA levels (*data not shown*). These results indicate that neither the activation of PXR, TGR5 nor ERK1-2 is involved in the CDCA-mediated repression of PCSK9.

To definitively confirm that CDCA-mediated repression of PCSK9 is FXR-dependent, a FXR-silencing gene experiment using siRNA was performed. Despite a highly significant decrease of FXR mRNA levels (–80%, $P = 0.001$) and the abo-

lition of CDCA-induced SHP gene expression, the repression of PCSK9 still occurred in FXR siRNA transfected cells (Supplementary Fig. S1). Therefore, this RNAi mediated approach failed to abolish the repressive potency of the FXR pathway. Thus, in addition to FXR activation, it can not be formally excluded that additional BAs-mediated signalling pathways can govern CDCA-mediated PCSK9 repression.

In addition, we cannot use the FXR-deficient mouse model since the CDCA-mediated PCSK9 repression was not retrieved in primary mouse hepatocytes (*data not shown*). Such a species-specific regulation in response to FXR was already observed for many genes involved in lipid metabolism as PPAR α [25], hepatic lipase [26] and syndecan-1 [27]. While actinomycin D experiments indicate that CDCA acts at the transcriptional level for repressing PCSK9, additional studies are needed to precisely assess the molecular mechanism by which CDCA and GW4064 repress PCSK9 expression.

Very recently, Nilsson et al. demonstrated that a 3-weeks treatment with CDCA reduces LDLr mRNA levels in the liver of subjects who underwent a cholecystectomy for gallstone disease, while PCSK9 mRNA levels were not altered [28]. Conversely, a 3-weeks treatment with cholestyramine, a BA sequestrant, increased LDLr and PCSK9 mRNA levels by 65% and 70%, respectively. Although this study reinforces the hypothesis for a cross-talk between BAs and PCSK9, it remains difficult to reconcile these *in vivo* findings with our *in vitro* data, as well as with previously published results demonstrating that CDCA induces LDLr gene expression *in vitro* [20,29]. The reason for this discrepancy remains unclear. However, it should be noticed that CDCA treatment in these patients failed to modulate the expression of hepatic FXR-target genes such as ApoCIII and ApoAI [28].

FXR appears as a promising target to treat dyslipidemia [12]. CDCA has been shown to reduce triglyceride and cholesterol levels in the fructose fed hamster model of metabolic syndrome and combined dyslipidemia [30]. Similar results were recently reported with a new synthetic FXR agonist in several rodent models of dyslipidemia [31], and phase I studies in human are in progress (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00499629 and NCT00509756). Our present results suggest that part of the hypolipidemic effects of FXR agonists might be mediated by PCSK9 repression.

Acknowledgements: This work was supported by Grants from the Agence Nationale de la Recherche (No. PPV06217NSA and ANR-06-PHYSIO-027-01, Project R06510NS), Laboratoires Pierre Fabre, and the EU Grant Hepadip (No. 018734). C. Langhi is a recipient of a fellowship from the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose. C. Le May is supported by a Grant from the Fondation pour la Recherche Médicale. S. Kourimate is supported by a Grant from Région Pays de la Loire and Philippe Costet is titular of a Contrat d'interface INSERM – CHU de Nantes.

We gratefully acknowledge Lucie Arnaud and Anne-Laure Jarnoux for expert Technical Assistance. We thank Dr. K.E. Berge for providing us TK-Renilla plasmid.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.febslet.2008.02.038](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.038).

References

- [1] Horton, J.D., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H. (2007) Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 32, 71–77.
- [2] Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villegier, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N.G. and Boileau, C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34, 154–156.
- [3] Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley Jr., T.H. and Hobbs, H.H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *New Engl. J. Med.* 354, 1264–1272.
- [4] McNutt, M.C., Lagace, T.A. and Horton, J.D. (2007) Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 282, 20799–20803.
- [5] Zhang, D.W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H. (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 18602–18612.
- [6] Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N.G., Bernier, L. and Prat, A. (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454–1459.
- [7] Maxwell, K.N., Soccio, R.E., Duncan, E.M., Sehayek, E. and Breslow, J.L. (2003) Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* 44, 2109–2119.
- [8] Rashid, S., Curtis, D.E., Garuti, R., Anderson, N.N., Bashmakov, Y., Ho, Y.K., Hammer, R.E., Moon, Y.A. and Horton, J.D. (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 5374–5379.
- [9] Berge, K.E., Ose, L. and Leren, T.P. (2006) Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1094–1100.
- [10] Costet, P., Cariou, B., Lambert, G., Lallanne, F., Lardeux, B., Jarnoux, A.L., Grefhorst, A., Staels, B. and Krempf, M. (2006) Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* 281, 6211–6218.
- [11] Lambert, G., Jarnoux, A.L., Pineau, T., Pape, O., Chetiveaux, M., Laboisse, C., Krempf, M. and Costet, P. (2006) Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology* 147, 4985–4995.
- [12] Cariou, B. and Staels, B. (2007) FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 236–243.
- [13] Lee, F.Y., Lee, H., Hubbert, M.L., Edwards, P.A. and Zhang, Y. (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem. Sci.* 31, 572–580.
- [14] Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H. and Kliewer, S.A. (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3369–3374.
- [15] Zollner, G., Marschall, H.U., Wagner, M. and Trauner, M. (2006) Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol. Pharm.* 3, 231–251.
- [16] Chapman, M.J., Goldstein, S., Lagrange, D. and Laplaud, P.M. (1981) A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J. Lipid Res.* 22, 339–358.
- [17] Fraker, P.J. and Speck Jr., J.C. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849–857.
- [18] Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J. and Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- [19] Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2003) FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124, 1926–1940.
- [20] Nakahara, M., Fujii, H., Maloney, P.R., Shimizu, M. and Sato, R. (2002) Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 37229–37234.
- [21] Wang, L., Lee, Y.K., Bundman, D., Han, Y., Thevananther, S., Kim, C.S., Chua, S.S., Wei, P., Heyman, R.A., Karin, M. and Moore, D.D. (2002) Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev. Cell* 2, 721–731.
- [22] Moore, L.B., Maglich, J.M., McKee, D.D., Wisely, B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Lambert, M.H. and Moore, J.T. (2002) Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 16, 977–986.
- [23] Graham, M.J., Lemonidis, K.M., Whipple, C.P., Subramaniam, A., Monia, B.P., Crooke, S.T. and Crooke, R.M. (2007) Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* 48, 763–767.
- [24] Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y. and Fujino, M. (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* 278, 9435–9440.
- [25] Pineda, T.I., Claudel, T., Duval, C., Kosykh, V., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2003) Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol. Endocrinol.* 17, 259–272.
- [26] Sirvent, A., Verhoeven, A.J., Jansen, H., Kosykh, V., Dartail, R.J., Hum, D.W., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2004) Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J. Lipid Res.* 45, 2110–2115.
- [27] Anisfeld, A.M., Kast-Woelbern, H.R., Meyer, M.E., Jones, S.A., Zhang, Y., Williams, K.J., Willson, T. and Edwards, P.A. (2003) Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 20420–20428.
- [28] Nilsson, L.M., Abrahamsson, A., Sahlin, S., Gustafsson, U., Angelin, B., Parini, P. and Einarsson, C. (2007) Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 707–711.
- [29] Taniguchi, T., Chen, J. and Cooper, A.D. (1994) Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene expression in Hep-G2 cells. Effect of serum, bile salts, and coordinate and noncoordinate regulation with other sterol-responsive genes. *J. Biol. Chem.* 269, 10071–10078.
- [30] Bilz, S., Samuel, V., Morino, K., Savage, D., Choi, C.S. and Shulman, G.I. (2006) Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E716–E722.
- [31] Evans, M.J., Mahaney, P.E., Zhang, S., Gantan, E., Borges-Marcucci, L.A., Lai, K., Wang, S. and Harnish, D.C. (2007) A synthetic farnesoid X receptor agonist protects against diet-induced dyslipidemia. *Circulation*. (Abstract) AHA07L1_584.

IV.2. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia.

*Cédric Le May, **Sanae Kourimate**, Cédric Langhi, Maud Chétiveaux, Anne Jarry, Christine Comera, Xavier Collet, F. Kuipers, Michel Krempf, Bertrand Cariou and Philippe Costet*

En révision.

Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia.

LE MAY

PCSK9 function in postprandial lipemia

Cédric Le May¹, Sanae Kourimate¹, Cédric Langhi¹, Maud Chétiveaux¹, Anne Jarry², Christine Comera^{3,7}, Xavier Collet³, F. Kuipers⁴, Michel Krempf^{1, 5, 6}, Bertrand Cariou^{1, 5} and Philippe Costet^{1, 6}.

From : ¹ INSERM, U915, Nantes, F-44000 France; CHU de Nantes, Nantes, F44000 France
²Université de Nantes, EA Biometadys, Nantes, F-44035 France ; ³INSERM, U563, Toulouse, F-31024 France; ⁴Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, University of Groningen, Groningen, 9700 RB, The Netherlands; ⁵Université de Nantes, l'institut du thorax, Clinique d'Endocrinologie et Nutrition, Nantes, F-44000 France ; ⁶ Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes, Nantes, F-44000 France ; ⁷INRA, UR66, F-31931 France.

Address correspondance to : Philippe Costet, INSERM U915, CHU Hôtel Dieu, 3ENORD, 9, Quai Moncousu, 44000, Nantes, France. Fax: 01133(0)240287544, phone: 1133(0)240287533
Philippe.costet@univ-nantes.fr.

Word count of body: 5449

Word count of abstract: 185

Number of figures: 5

Number of tables: 1

ABSTRACT

Objectives: Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) is a natural inhibitor of low density lipoprotein receptor and its deficiency in humans results in low plasma LDL-cholesterol and protection against cardiovascular disease. We explored whether PCSK9 expression impacts postprandial triglyceridemia, another important cardiovascular risk factor.

Methods and results: Real time PCR and confocal microscopy were used to show that PCSK9 is expressed throughout the entire small intestine and in human enterocytes. Upon olive oil gavage, PCSK9 deficient mice showed a dramatically decreased postprandial triglyceridemia compared with their wild-type littermates. Lymph analysis revealed that intestinal TG output is not quantitatively modified by PCSK9 deletion. However, PCSK9^{-/-} mice present a significant reduction of lymphatic apoB secretion compared to PCSK9^{+/+} mice. Modulating PCSK9 expression in polarized Caco-2 cells confirmed the relationship between PCSK9 and apoB secretion; PCSK9^{-/-} mice consistently secrete larger TG-rich lipoprotein than wild-type littermates. Finally, kinetic studies showed that PCSK9 deficient mice have an increased ability to clear chylomicrons compared to wild-type littermates.

Conclusion: These findings indicate that in addition to its effect on LDL-cholesterol, PCSK9 deficiency might protect against cardiovascular disease by reducing postprandial triglyceridemia.

PCSK9, chylomicron, postprandial, intestine, Caco-2

Condensed abstract:

This study shows that PCSK9 is expressed throughout the entire small intestine and in human enterocytes. In mice, PCSK9 deficiency dramatically reduces the postprandial triglyceridemia. This phenotype can be explained by a qualitative modification of intestinal chylomicron production and an enhanced hepatic catabolism.

Introduction

Gain-of-function mutations affecting pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia and premature atherosclerosis ¹. It is now established that PCSK9 is a natural inhibitor of the low density lipoprotein receptor (LDLr), acting post-transcriptionally ². Circulating PCSK9 binds to the EGF-A extracellular domain of the hepatic LDLr and prevents its recycling to the cell surface ³.

A breakthrough study reported that african-americans harbouring PCSK9 loss-of-function mutations had an 88% reduction in risk for coronary heart disease ⁴. Although the lower concentrations of LDL cholesterol over one's lifetime is suggested to be the main reason for this very high level of protection, we hypothesized that PCSK9 deficiency might also affect other risk factors. Low levels of HDL cholesterol (HDL-c) and elevated non fasted triglyceride (TG) levels are associated with increased risk for cardiovascular diseases. No association between PCSK9 loss-of-function mutations and plasma HDL-c levels has been noticed ^{4, 5}. However, to our knowledge, non fasting plasma TGs were not measured in PCSK9 deficient individuals. They are an important contributor to the risk for cardiovascular diseases ^{6, 7}.

Rashid et al. reported the phenotype of PCSK9 deficient mice (PCSK9^{-/-}) mice and observed that they exhibit lower plasma cholesterol levels (-50%) and are hypersensitive to statins ⁸. However, to our knowledge, PCSK9's potential role in the intestine, in mice, and humans remains unexplored.

During the postprandial period, dietary lipids are actively absorbed into the enterocyte. After intracellular re-esterification, long chain fatty acids (LCFA) and cholesterol esters are associated with phospholipids and apolipoproteins, particularly apoB48, to produce TG-rich lipoproteins, mainly chylomicrons ⁹.

Chylomicrons are secreted into the mesenteric lymph to eventually deliver lipids to the peripheral tissues and organs ⁹. It is believed that the number of chylomicrons does not change postprandially, but their size increases due to their enrichment with TG ¹⁰. Since a single copy of apoB48 is present per chylomicron ¹¹, the intestinal output of apoB remains constant during the absorptive process. ApoB48 is the preferred protein for the intestine to coat chylomicrons in mice ¹². Chylomicron remnants are cleared from the blood by the Low Density Lipoprotein receptor (LDLr) and the LDLR-Related Protein (LRP) ¹³. PCSK9 deficient mice display an increase in hepatic LDLr protein, but not of LRP ⁸.

Our aim was to determine PCSK9 localization in murine and human intestines, and to determine its role in postprandial lipemia. The main outcome is that PCSK9 deficiency results in dramatically less plasma TG accumulation in 14hr-fasted mice, challenged with an olive oil gavage, due to increased hepatic clearance of larger chylomicrons.

METHODS

An expanded methods section can be found in the online supplement (available online at <http://atvb.ahajournals.org>).

Real time PCR.

Real time PCR analyses were performed with the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). For the sequence of the oligonucleotides used for real time PCR, please see Supplemental Table 1.

Immunohistochemistry

For PCSK9 immunostaining, followed by confocal microscopy, filters from wells of caco-2 cell culture plates were collected (or 10µm cryostat sections of normal human duodenum and ileum were performed), fixed in paraformaldehyde, and processed for immunofluorescence. The human tissue fragments were processed according to the French Guidelines for Research on Human Tissues ¹⁴. Informed patient consent was obtained, according to the French bioethics law ¹⁵. For a detailed protocol and information concerning patients, please see Supplemental Methods.

Animals

PCSK9^{+/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Maine, USA), interbred to produce PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} (wild type, wt) littermates, and genotyped as described elsewhere⁸. Mice had free access to food and water under a 12-hour light/12-hour dark cycle in a temperature-controlled environment. All animal studies were conducted on age-matched male mice (2 months-old), and approved by the Unité de Thérapeutique Expérimentale (Agreement N° BP44015). For surgery, mice were anesthetized with a single intraperitoneal injection of 100µl of ketamin/ivermectine (Imalgène 1000, Merial, Lyon, France).

Triglyceride measurement

Lipids from jejunal mucosa and livers were extracted with isopropylether/butanol (6/4, v/v). After solvent evaporation, dried TGs were sonicated in 0.5ml of the provided kit buffer. Intestinal, hepatic, plasma, and lymphatic TGs were quantified using the PAP150TG kit (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Gastric emptying and intestinal transit measurement

Gastric emptying and intestinal transit were measured by assessing the distribution of a non-absorbable, 70 kDa Fluorescein isothiocyanate conjugated dextran marker throughout the gastrointestinal tract of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (n=4 each). For a detailed protocol, please see Supplemental Methods.

Fecal Fat balance

PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice were housed in individual cages. Food intake and fecal fat excretion was measured for 3 days. For a detailed protocol, please see Supplemental Methods.

Chylomicron plasma clearance

Lymph from mesenteric duct, cannulated PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice, following olive oil gavage, was harvested. Chylomicrons were isolated by ultracentrifugation, dialyzed for 48hrs at 4°C against PBS pH7.4 and radio labeled according to the iodogen method modified by Fraker et al¹⁶. Briefly, after measurement of protein content, similar amount of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} chylomicrons associated protein (0.5mg) were iodinated with ¹²⁵I (0.2mCi) for 30 minutes. After separation of free ¹²⁵I and ¹²⁵I labeled chylomicrons, specific activity was measured. Mice fasted for 14 hours received an intravenous injection of radio

labeled chylomicron in 0.2ml of PBS. Blood was collected at indicated times, and plasma radioactivity was measured with a γ Counter (1480 Wizard 300 Automatic Gamma Counter, Wallac, Waltham, Massachusetts, USA).

Chylomicron size, lymph apolipoprotein content.

Lymphatic lipoprotein size was determined after lymph collection by dynamic light scattering techniques using a Zetasizer 3000 HSA (Malvern) at 25°C. Particle diameters were assessed from the volume distribution patterns provided by the analyzer. Mesenteric lymph apolipoprotein content was determined by electrophoresis on a 4-20% Tris-Glycine gel, stained with Coomassie blue. Purified proteins were used as a positive control (Bioscience Resource Project, Saco, ME, USA).

Statistics

Each experiment is representative of at least two independent experiments with a minimum of triplicates per condition. Values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical significance was analyzed using a student's unpaired *t* test. The values of $p < 0.05$ were considered as significant.

RESULTS

PCSK9 is expressed in the small intestine of mice and humans

Using real-time quantitative PCR, we first examined PCSK9 and the LDLr mRNA quantities along the gastrointestinal tract in mice (Figure 1A). PCSK9 expression in the stomach was virtually undetectable. However, PCSK9 was expressed throughout the small intestine and colon, at a level which did not vary along the intestinal cephalo-caudal axis, and

which was similar to that in the liver (Figure 1A). As previously published ¹⁷, the LDLr was abundantly expressed along the digestive tract.

Using confocal microscopy, we determined the localization of PCSK9 protein in frozen sections of normal, human, small intestines for the first time. PCSK9 was expressed almost exclusively in the epithelial barrier of the human duodenum and ileum, both in enterocytes and goblet cell, without any crypt-to-villus gradient of expression (Figure 1B). PCSK9 immunostaining was observed in the cytoplasm of epithelial cells and accumulated at the apical and basolateral sides of the cells (Figure 1B). Blocking of the PCSK9 antibody with an excess of antigen peptide abolished the staining (Figure 1B, upper panel, right), confirming the specificity of the antibody. We also examined the localization of PCSK9 in the human colonic, enterocyte-like cell line, Caco-2, maintained as polarized by culturing on filters. As shown in Figure 1B (lower panel), xy image (left) shows a punctuated staining within Caco-2 cells, and xz image (right) shows a strong PCSK9 immunostaining mainly in the apical compartment of the cells.

PCSK9 is upregulated by pravastatin in Caco-2 cells and the LDLr expression is increased in intestines of PCSK9^{-/-} mice.

We next examined whether PCSK9 is upregulated by statins in Caco-2 cells as it has been reported in hepatocytes ^{18, 19} (please see Supplemental Figure 1A). We exposed the cells for 48hrs to 10μM pravastatin and observed an increase by 160% in PCSK9 mRNA, and an increase by 110% in LDLr mRNA (Supplemental Figure 1A). We next confirmed that the LDLr content is increased in the liver of PCSK9^{-/-} mice compared to wt littermates, and observed a similar phenotype in the medial intestine (+621%, p< 0.05) (Supplemental Figure 1B).

PCSK9 deficiency protects mice against postprandial lipemia.

Random fed PCSK9^{-/-} mice had lower total cholesterol than wt littermates (-35% in 3 month old mice, $p < 0.001$), and similar plasma TG concentrations (Supplemental figure 2A). Plasma TG levels were measured over a 4hr period in 14hr-fasted mice after they received an intragastric bolus of olive oil (200 μ l) (Figure 2). At T0, plasma levels of TG were comparable between PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice. Two hours after gavage, PCSK9^{+/+} mice showed a 209% increase in plasma TG whereas PCSK9^{-/-} littermates displayed a strongly attenuated TG postprandial response. Mean TG appearance rates were respectively 0.19 ± 0.032 and 0.082 ± 0.022 g/L/h for PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice, *i.e.* 62% less ($n = 12$ PCSK9^{+/+} and $n = 14$ PCSK9^{-/-} mice from 2 independent experiments).

Fractionation by fast protein liquid chromatography (FPLC) showed that the difference in triglyceridemia observed 2hrs after gavage was due to a decrease in the TG content of chylomicrons/VLDL lipoproteins (Supplemental Figure 2B and corresponding Supplemental Methods and Results).

Gastric emptying, intestinal transit, and fat absorption following oral oil challenge

The defect in postprandial lipemia observed in PCSK9^{-/-} mice could be attributable to 1) decreased intestinal lipid absorption, and/or chylomicron production, or 2) accelerated lipolysis and/or clearance of TG-rich lipoproteins. We first measured the TG contents of mucosal scrapings from intestinal segments of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} littermates 1.5hrs after an olive oil gavage (Figure 3A). We did not observe TG content differences in proximal and distal intestines from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice. Interestingly, PCSK9^{-/-} mice had 40% less TG in the medial part of their intestine compared to wild-type mice, suggesting that lipid uptake could be defected in this segment. To assess its consequence on intestinal fat absorption, we measured food intake and collected feces every 24hrs for 3 days. Food intake,

weight of excreted feces, and fecal fat excretion were not significantly different between mice (Table I). PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice absorb fat with the same efficiency (Figure 3B) demonstrating that reduced lipemia in PCSK9^{-/-} mice is not due to fat malabsorption. As a control, PCSK9^{+/+} mice fed with Orlistat, an inhibitor of pancreatic lipases, showed a 45% of total fat absorption compared to PCSK9^{+/+} mice under normal chow (Figure 3B).

Altered postprandial lipemia could also be due to gastric emptying or intestinal motility defect. We performed an oral gavage with a non absorbable 70KDa FITC dextran marker diluted in olive oil. After thirty minutes, about 10% of the marker was still present in the stomach of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (Figure 3C) demonstrating that PCSK9 deficiency does not alter gastric emptying. Intestinal transit was also similar in both genotypes (Figure 3C).

Thus, although we observed that triglycerides accumulate less in the medium intestine of PCSK9^{-/-} mice following an olive oil gavage, these mice do not show a defect in fat absorption.

Chylomicrons secretion in PCSK9^{-/-} mice.

To directly explore the impact of PCSK9 deficiency on chylomicron output, we cannulated the lymph ducts from 2hr-fasted PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} littermates. After establishing a 30 min baseline collection, we injected a bolus of olive oil in their duodenum, and collected the lymph in timed intervals for 210 min (Figure 4A). Lymph flow was reduced by 20% in knockout mice (0.59 μ l/min vs 0.47 μ l/min, $p < 0.05$). No difference in cumulative TG contents was observed in the first 1.5hrs. But, in a second phase, the accumulation tended to be reduced in PCSK9^{-/-} mice, but it did not reach significance (Figure 4A).

Lymph samples collected at various times after olive oil injection were pooled, and equal amounts were loaded on a gel for separation of the proteins by electrophoresis (Fig.

4B). As expected, the quantity of apoBs was relatively constant during the absorption process within each genotype, and apoB48 was more abundant than apoB100¹⁰. However, ApoB100 and apoB48 contents were significantly lower in lymph from PCSK9^{-/-} mice (-39%, $p < 0.05$ and -40%, $p < 0.01$), suggesting that PCSK9 deficiency results in less chylomicrons being secreted. The positive relation between PCSK9 expression and the apoB output was confirmed in caco-2 cells (Please see Supplemental Figure 3 and corresponding methods and results). We also determined the other apolipoprotein's content by electrophoresis. No striking difference between genotypes was observed. There was a tendency towards an accumulation of apoE in lymph from PCSK9^{-/-} mice (Fig.4C).

As lymphatic TG output was unchanged and lymphatic apoB secretion was increased, it suggests that PCSK9^{-/-} mice might secrete larger chylomicrons than WT littermates. Using dynamic light scattering techniques, we showed that chylomicron diameters from PCSK9^{-/-} mice were increased by 10% compared to WT littermates (Figure 4D). Assuming that they are spheric particles, PCSK9^{-/-} mice secrete chylomicrons with a volume at least 25% higher than PCSK9^{+/+} mice (Figure 4D).

Chylomicron catabolism in PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice.

We next measured the hepatic TG content after olive oil gavage. There was no change in hepatic TG contents in fed PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (Figure 5A). Fasting induced an accumulation of TG by 100% in both genotypes ($p < 0.01$). Two hours after olive oil gavage, hepatic TG contents were similar to those of livers in the fed state in PCSK9^{+/+} mice, but remained elevated in PCSK9^{-/-} mice. Consequently, there was 54% more TG in livers of knockout mice after gavage ($p < 0.05$), suggesting that TG originated from olive oil fatty acids. To confirm this, ³H-triolein diluted in olive oil was orally administered to fasted mice, and 2hrs later the amount of hepatic radioactivity was measured. PCSK9^{-/-} mice exhibited almost

200% more radioactivity than wt littermates showing that the hepatic uptake of chylomicrons is increased in these mice (Supplemental Figure 4)

We verified whether the clearance of chylomicrons is enhanced in knockout mice (Figure 5B). Chylomicrons obtained by lymph cannulation of wild-type and knockout mice (chylo^{+/+} and chylo^{-/-}) were labeled with ¹²⁵I, and injected into the circulatory systems of mice from both genotypes. We observed no difference in chylo^{+/+} clearance rates between the genotypes, in spite of their different hepatic LDLr contents (Supplemental Figure 1B). Chylo^{-/-} were also not cleared more efficiently than chylo^{+/+} by PCSK9^{+/+} mice. Interestingly, PCSK9^{-/-} mice cleared their own chylo^{-/-} 21% faster than PCSK9^{+/+} mice did (p<0.01), and 56% faster than chylo^{+/+} (p<0.001). Lastly, PCSK9^{-/-} mice cleared chylo^{-/-} 37% faster than PCSK9^{+/+} cleared chylo^{+/+} (p<0.05).

Taken together, these data showed that reduced postprandial lipemia in PCSK9^{-/-} mice is caused in part by increased hepatic uptake.

Discussion

This study shows that PCSK9 is highly expressed in enterocytes, and plays a critical role in postprandial lipemia in mice. We first determined the expression of PCSK9 in the gastrointestinal tract. We showed that in mice PCSK9 is expressed throughout the digestive tract and colon at levels equivalent to those found in the liver. In the human intestine, PCSK9 is localized in the cytoplasm probably in the endoplasmic reticulum and the golgi, and it accumulates at the subapical and basolateral compartments of the enterocyte. In differentiated Caco-2 cells, most of the signals were concentrated at the apical side. We observed high levels of expression in the ileum where the bile acid re-uptake takes place. As we recently showed that bile acids repress PCSK9²⁰, it is tempting to speculate that PCSK9 might play a

role in their metabolism. We also observed some signals in goblet cells, although the function of PCSK9 in this cell type remains unknown.

PCSK9 deficient mice clearly exhibited reduced postprandial lipemia after olive oil gavage. A balance study showed that intestinal fat absorption was not significantly different between genotypes, and that PCSK9 deficiency does not alter the gastric emptying and intestinal transit. Therefore we investigated whether the phenotype we observed could be due to chylomicron production and/or catabolism. We directly collected the mesenteric lymph after olive oil gavage. TG outputs in lymph were virtually similar in both genotypes. We observed a 20% reduction of lymph flow in PCSK9^{-/-} mice. There is a large number of plausible causes for lymph flow reduction²¹ and more work is needed to determine which one is responsible for this phenotype. Direct measurement from lymph collected in mice after oil gavage revealed that PCSK9^{-/-} mice secrete less apoB than their wt littermates. The reduction in lymph flow cannot account for this, as it was estimated with equal amounts of lymph from both genotypes. Experiments in differentiated Caco-2 cells confirmed that PCSK9 deficiency results in a decrease of apoB secretion. Interestingly, Rashid *et al.* showed that primary hepatocytes from PCSK9^{-/-} mice exhibit reduced apoB48 secretion⁸. However, upon a high fat diet, transient PCSK9 knockdown in mice led to a decrease of serum apoB100 content and an increase of apoB48 content, probably due to the upregulation of apobec1²². Apobec 1 is the enzyme responsible for the production of apoB48 in human intestine, and it is also expressed in the liver in rodents²³. We did not observe a change in the ratio of apoB48 to apoB100 in lymph of PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} mice, suggesting that apobec1 is not involved in the differences we observed. The lower lymph apoB output in PCSK9^{-/-} mice indicates that they secrete less chylomicrons. But, a direct measurement of their size showed an average diameter 10% larger than that found in wild type littermates. The corresponding 25% increase of volume could compensate for the lower number of particles, and result in the absence of a

significant difference concerning the resulting TG output. Another plausible explanation is the higher expression of LDLr we observed in the intestine of PCSK9^{-/-} mice. In humans and rodents, LDLr is present in the basolateral side of enterocytes, and is able to efficiently bind LDL particles²⁴. However, the functional importance of the LDLr in the intestine is unclear. In the liver, Twisk *et al.* showed that the LDLr controls ApoB secretion by promoting the re-uptake of newly synthesized apoB containing lipoprotein particles²⁵. We can speculate that intestinal, TG-rich lipoproteins are more avidly recaptured in PCSK9^{-/-} mice than in wt mice leading to the secretion of larger particles. Consistent with our results, LDLr deficient mice present increased postprandial lipemia after oil gavage compared to wt mice²⁶. Furthermore, kinetic studies suggested that patients with familial hypercholesterolemia are characterized by an increased intestinal chylomicron production²⁷.

Our experiments also indicate a contribution from the liver to the reduced postprandial lipemia observed in PCSK9^{-/-} mice. It is believed that the chylomicrons remnant clearance in mice is accountable for 75% of the LDLr, mainly in an apoE-dependent fashion²⁶. Thus, it makes sense that PCSK9 deficient mice that exhibit more LDLr clear their own remnants faster than wt mice. However, a hypothesis based on an LDLR-dependent pathway only is difficult to reconcile given the fact that PCSK9^{-/-} mice do not clear chylomicrons from wt mice significantly faster than control mice. We were unable to detect a difference in lipoprotein contents of chylomicrons from PCSK9^{-/-} mice that differed only by their larger size, together with a trend to a higher TG to PL ratio which suggests that other factors may be at play.

To summarize, we believe that the dramatic reduction of postprandial lipemia we observed in PCSK9^{-/-} mice results from the combination of various effects, and the higher hepatic clearance rate of less chylomicrons particles carrying more TGs. We can only speculate on a role for the intestinal LDLr in the re-uptake of nascent particles. It is tempting

to postulate that a specific intestinal target of PCSK9 that is still to be discovered is involved. All together these results make postprandial kinetic investigations in human with partial or complete loss of PCSK9 highly desirable. We propose that PCSK9 inhibitors would help manage LDL cholesterol and also postprandial triglyceridemia, two important risk factors of cardiovascular disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was obtained from the Agence Nationale de la Recherche (PNRA 2006 “ABSINTE”). C. Le May was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, Sanae Kourimate by Région Pays de la Loire and Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes, and Cédric Langhi by Nouvelle Société Française d’Athérosclérose. Philippe Costet is the titular of a “contrat d’interface CHU de Nantes-INSERM”.

We thank Lucie Arnaud, Rick Havinga and Sabine Erbibou for their excellent technical help. The authors are grateful to Athina Kalopissis and Raphael Moriez for helpful discussions and to Joshua Musgrave for the correction of the manuscript

Non standard Abbreviations:

PCSK9: pro-protein convertase subtilisin/kexin 9; TG: triglycerides; LDLr: low density lipoprotein receptor; FPLC: fast-protein liquid chromatography; HDL-c: High density lipoprotein-cholesterol.

Reference List

- (1) Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003 June;34(2):154-6.
- (2) Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 2007 February;32(2):71-7.
- (3) Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Binding of PCSK9 to EGF-A repeat of LDL receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 2007 April 23;282(25):18602-12.
- (4) Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006 March 23;354(12):1264-72.
- (5) Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005 February;37(2):161-5.
- (6) Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007 July 18;298(3):309-16.
- (7) Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007 July 18;298(3):299-308.
- (8) Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, Horton JD. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 April 12;102(15):5374-9.
- (9) Mansbach CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 October;293(4):G645-G650.
- (10) Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol* 1990 November;259(5 Pt 1):G709-G719.
- (11) Phillips ML, Pullinger C, Kroes I, Kroes J, Hardman DA, Chen G, Curtiss LK, Gutierrez MM, Kane JP, Schumaker VN. A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. *J Lipid Res* 1997 June;38(6):1170-7.
- (12) Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, Lee D, Swift LL, Davidson NO, Tso P. Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100

for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 January;294(1):G344-G352.

- (13) Martins IJ, Hone E, Chi C, Seydel U, Martins RN, Redgrave TG. Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J Lipid Res* 2000 February;41(2):205-13.
- (14) [Recommendations for cryopreservation of cells tumor tissues to be used for molecular analyses]. *Ann Pathol* 2001 April;21(2):184-201.
- (15) French Bioethic Law n°2004-800. 2008.
- (16) Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978 February 28;80(4):849-57.
- (17) Fong LG, Bonney E, Kosek JC, Cooper AD. Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland, liver, and intestine. *J Clin Invest* 1989 September;84(3):847-56.
- (18) Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 August;24(8):1454-9.
- (19) Kourimate S, Le May C, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, Nguyen P, Krempf M, Cariou B, Costet P. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem* 2008 February 3;283(15):9666-73.
- (20) Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B. Activation of the farnesoid X receptor represses pcsk9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett* 2008 February 22;19(582(6)):949-55.
- (21) Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness. *JOP* 2007;8(4):374-99.
- (22) Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST, Crooke RM. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* 2007 April;48(4):763-7.
- (23) Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1993 August;34(8):1367-83.
- (24) Fong LG, Bonney E, Kosek JC, Cooper AD. Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland, liver, and intestine. *J Clin Invest* 1989 September;84(3):847-56.

- (25) Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest* 2000 February;105(4):521-32.
- (26) Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, Yamada N. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem* 1996 September 13;271(37):22422-7.
- (27) Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel I, Hogue JC, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Lack of evidence for reduced plasma apo B48 catabolism in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia carrying the same null LDL receptor gene mutation. *Atherosclerosis* 2004 February;172(2):367-73.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: PCSK9 is highly expressed in the small intestine and enterocytes.

(A) Real-time PCR measurement of PCSK9 and LDLr gene expression in PCSK9^{+/+} mice tissues. Values are normalized to cyclophilin and expressed as mean $\pm$ SEM relative to the proximal intestine arbitrarily set at 1.

(B) Immunofluorescence staining followed by confocal microscopy on frozen sections of human duodenum and ileum, and on Caco-2 cells maintained on filters. PCSK9 appears in green, and nuclei in red. PCSK9 is present in the epithelial barrier, in the apical (arrow), and basolateral (arrowhead) compartments of enterocytes, both in the villus (see the duodenum) and crypt (see the ileum). PCSK9 is also expressed by goblet cells (asterisk). The upper right panel (duodenum) shows absence of immunostaining when the antibody is pre-incubated with an excess of antigen peptide. In Caco-2 cells maintained on filters, xy section shows a punctuated distribution of PCSK9, and xz section shows an accumulation of PCSK9 in the apical compartment (arrow). The filter (basal pole of the cells) appears as a red line (arrowhead, original magnification - x630).

Figure 2: Postprandial lipaemia is reduced in PCSK9^{-/-} mice.

14hr-fasted PCSK9^{+/+} (white circle, n=12 mice) and PCSK9^{-/-} littermates (black circle, n=14 mice) received an intragastric olive oil load (200 μ l). Blood samples were collected before gavage (time 0) and at 1, 2, 3, 4hrs after gavage and triglyceride concentrations were determined on corresponding plasma. Values are depicted as means $\pm$ SEM. **p<0.01.

Figure 3: PCSK9^{-/-} mice do not present altered intestinal fat absorption

A) Intestinal mucosals (left) were scrapped in PCSK9^{+/+} (white bar; n=10 mice) and PCSK9^{-/-} mice (black bar, n=10 mice), and TG contents determined 1.5hrs after olive oil gavage. Data represents means $\pm$ SEM. * p<0.05). B) Mice, individually housed, received a 3.1% fat chow diet supplemented (PCSK9^{+/+} mice; n=6 mice) or not with 200 mg/kg diet Orlistat (PCSK9^{+/+} mice, white bars; n=18 mice; PCSK9^{-/-} mice, black bars; n=18 mice). Food intake and fecal fat excretion were assessed daily for 3 days. Percentage of total fat absorption was measured as described in the Methods. ***p<0.001. C) Gastric emptying and intestinal transit of 70Kda Fluorescein isothiocyanate – dextran in PCSK9^{+/+} (white bars; n=4 mice) and PCSK9^{-/-} mice (black bars; n=4 mice). Data represent means $\pm$ SEM.

Figure 4: Mesenteric lymph output, composition and size.

Lymph ducts from fed PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} littermates were cannulated (n=10 mice from each genotype). At t=0, a bolus of olive oil (200 μ L) was injected in the upper duodenum. Lymph samples were then collected at various times and TG contents measured. (A) Data represents means $\pm$ SEM of plasma cumulative TG. (B) Lymph samples collected at various times from each genotype were pooled (n = 10 mice of each genotype) and equal amounts (2.5 μ L) analysed by electrophoresis. Proteins were stained using Coomassie blue; apoB100 and apoB48 relative quantities were estimated by densitometry. The value obtained

for apoB100 in wild type mice was arbitrarily set at 1. C) Equal amounts of lymph samples (2.5µL) from 4 PCSK9^{+/+} and 4 PCSK9^{-/-} mice, collected after olive oil gavage (t= 30min), were analysed by electrophoresis. Proteins were stained using Coomassie blue and the bands corresponding to apoE, ApoAI and AII, ApoCs were identified using positive controls. For the apoE, relative quantities were estimated by densitometry (lower scan). The value obtained for apoE in PCSK9^{+/+} mice was arbitrarily set at 1. (D) Lipoprotein sizes (nm) were analyzed by dynamic light scattering in lymph of PCSK9^{+/+} (white circle, n=4 mice) and PCSK9^{-/-} mice (black circle, n=4 mice) after intraduodenal olive oil administration. Data represents means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 5: Lipoprotein kinetics in PCSK9^{-/-} mice.

A) Hepatic TG contents were determined in fed, 14hr-fasted and in14hr-fasted mice submitted to an olive oil gavage, 2hrs after the gavage (n = 10 mice of each genotype).

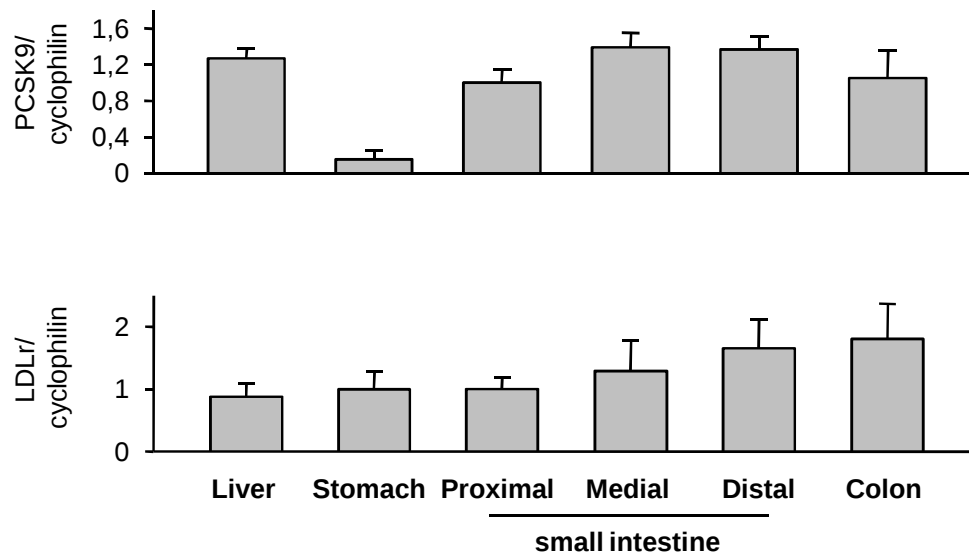
B) ¹²⁵I labeled chylomicrons isolated from mesenteric lymph of PCSK9^{+/+} (n = 3 mice) and PCSK9^{-/-} littermates (n=4 mice) were intravenously injected to mice of both genotypes and plasma ¹²⁵I clearance rates were calculated using values at 2min and 30min. Data represent mean percentage of total ¹²⁵I clearance rate for each group ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Table I – Effect of PCSK9 deficiency and Orlistat treatment on food and fat intake, fecal fat excretion, and total fat absorption.

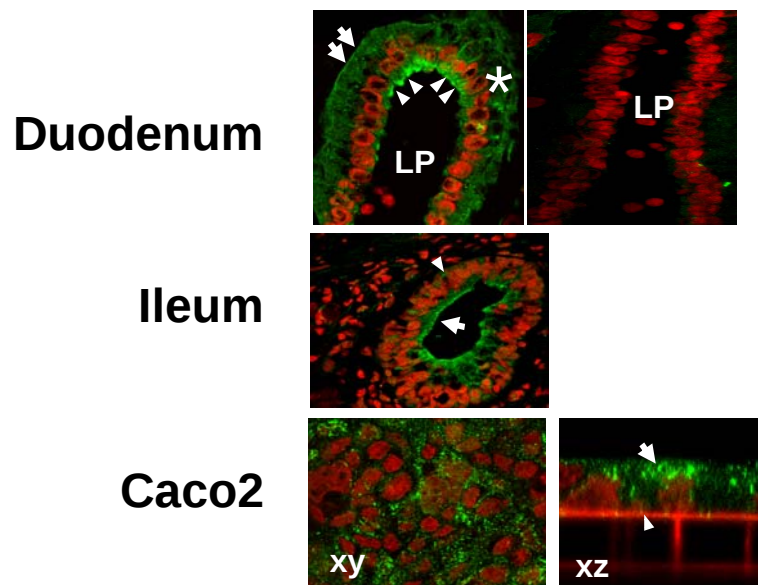
Mice, individually housed, had free access to a 3.1% fat chow diet supplemented or not with 200 mg/kg diet Orlistat. Food intake and fecal fat excretion were assessed daily for 3 days. Values shown are means ± SEM. (*p<0.05, ***p<0.01, vs PCSK9^{+/+} mice under regular chow).

	Number of mice	Orlistat mg/kg diet	Daily Food Intake g/day/mouse	Daily Fat Intake g/day/mouse	Fecal Excretion g/day/mouse	Total Fecal Fat excretion g/day/mouse	Total Fat Absorption %
PCSK9^{+/+}	18	0	5,96 ± 0,24	0,185 ± 0,007	1,162 ± 0,06	0,031 ± 0,004	83,32 ± 1,92
PCSK9^{-/-}	18	0	6,00 ± 0,28	0,186 ± 0,009	1,127 ± 0,05	0,035 ± 0,003	81,47 ± 1,9
PCSK9^{+/+}	6	200	6,16 ± 0,24	0,191 ± 0,007	1,43 ± 0,1 *	0,104 ± 0,009 ***	46,06 ± 3,02 ***

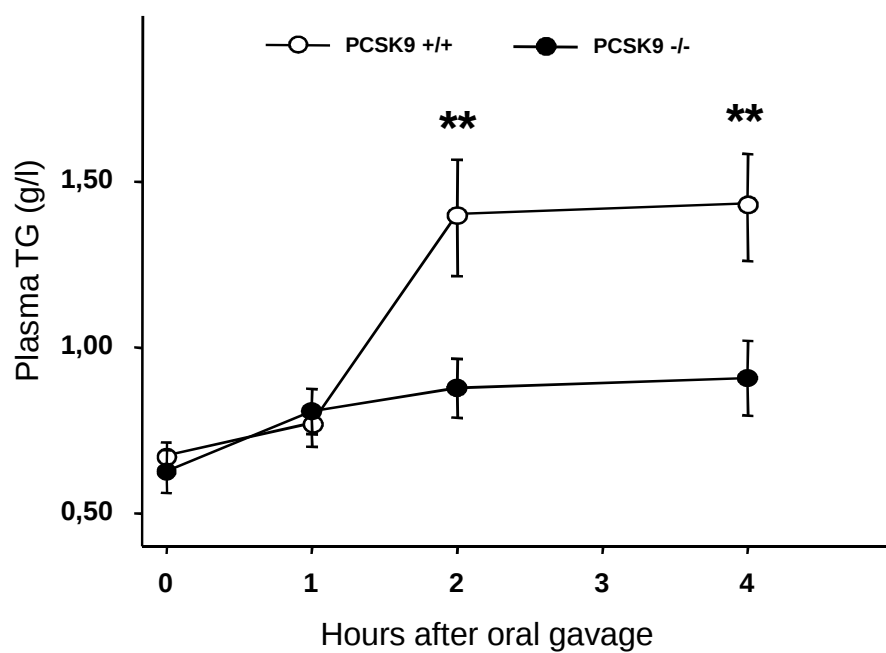
A

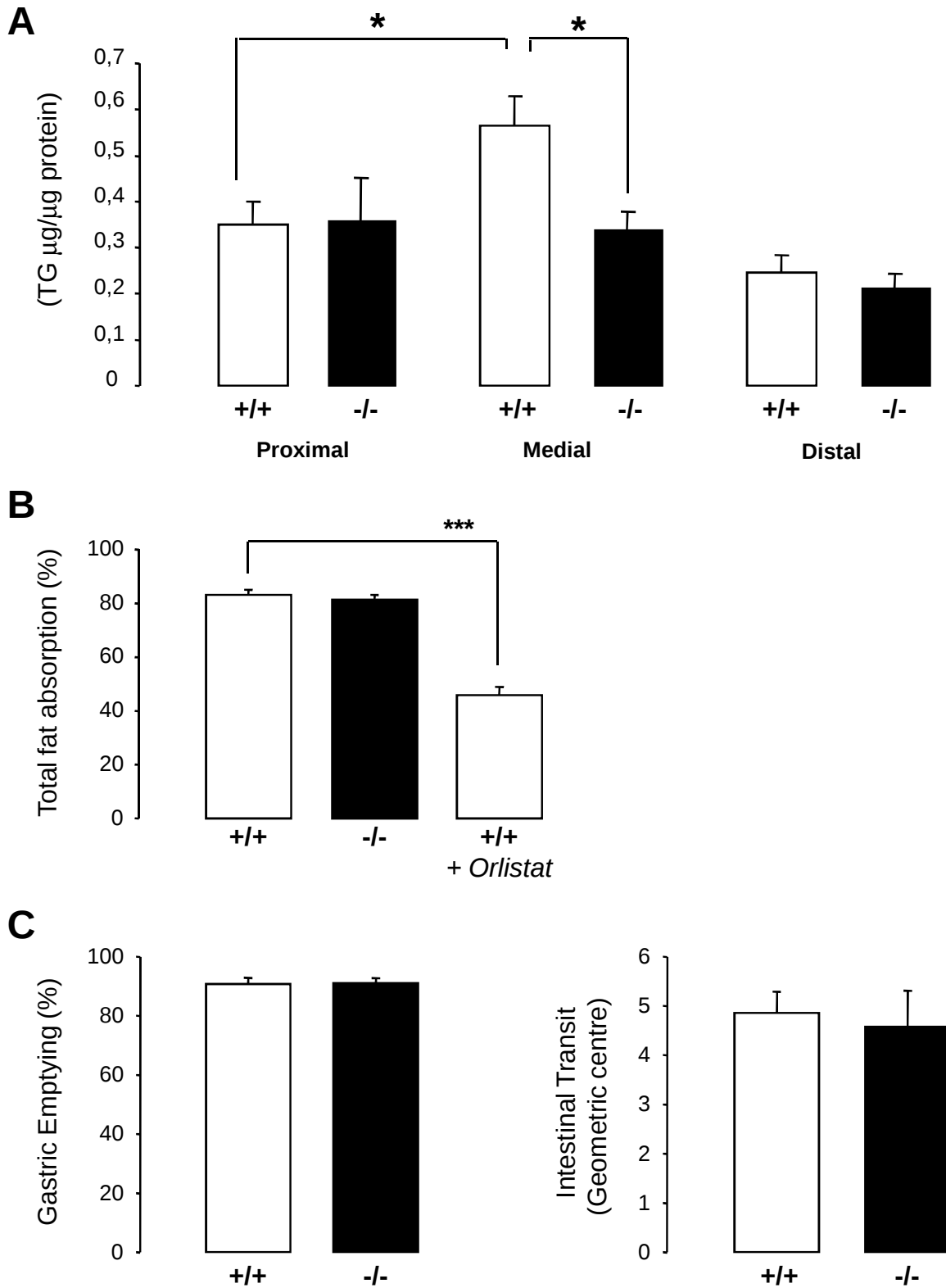


B

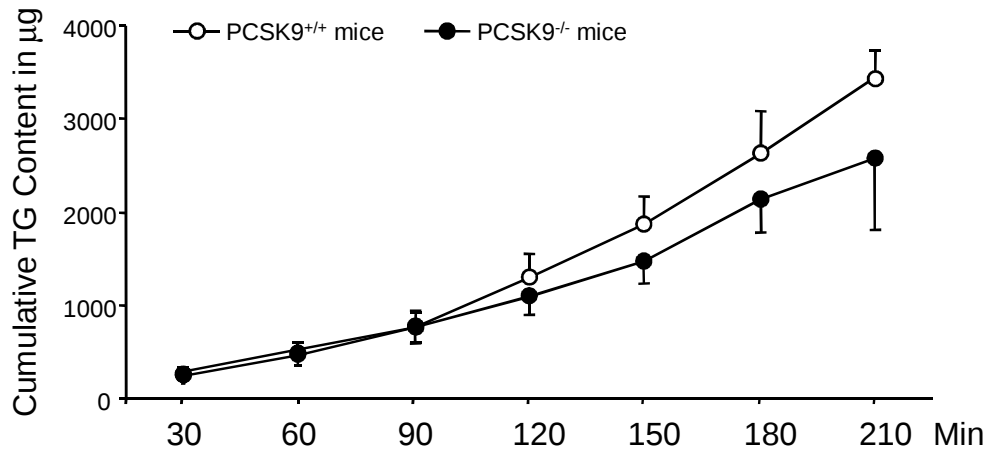


Le May et al. Figure 2

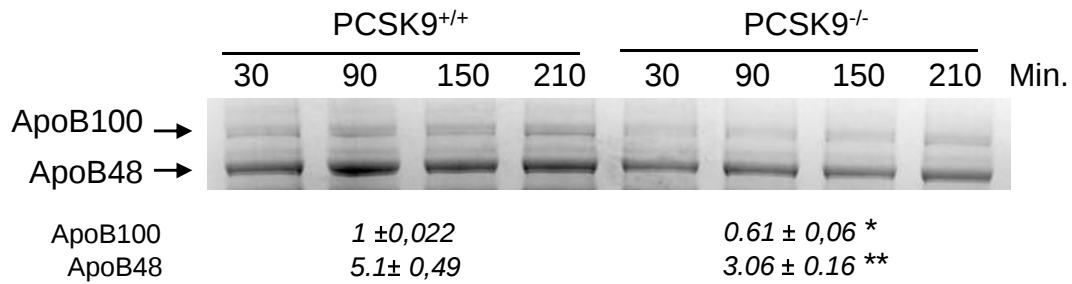




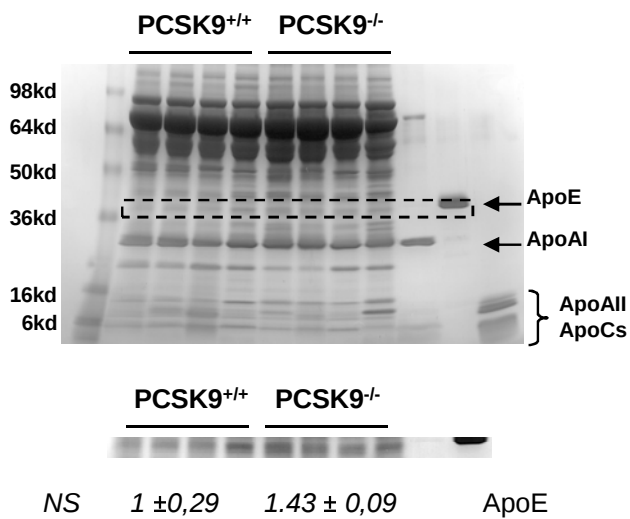
A



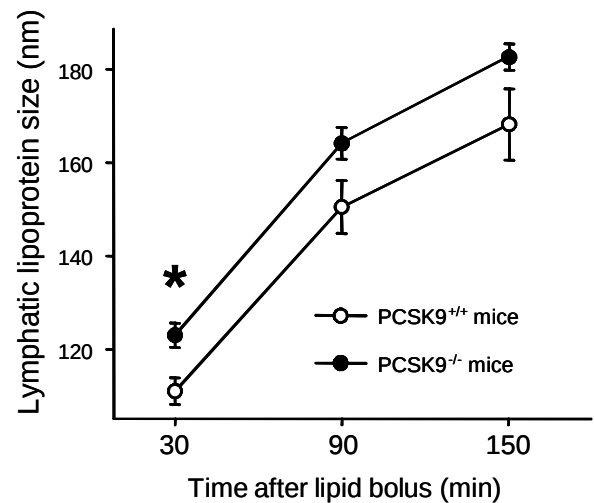
B



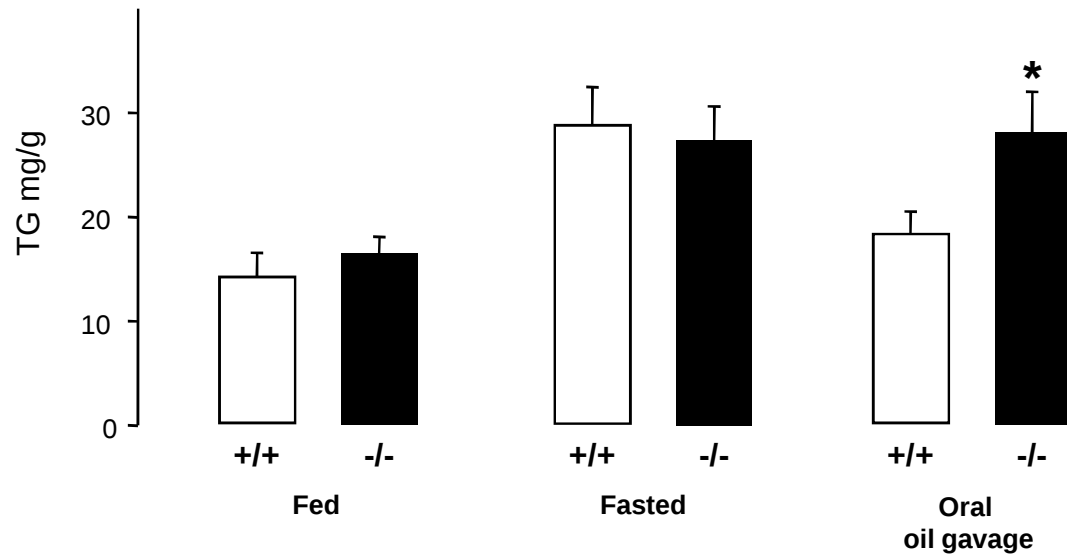
C



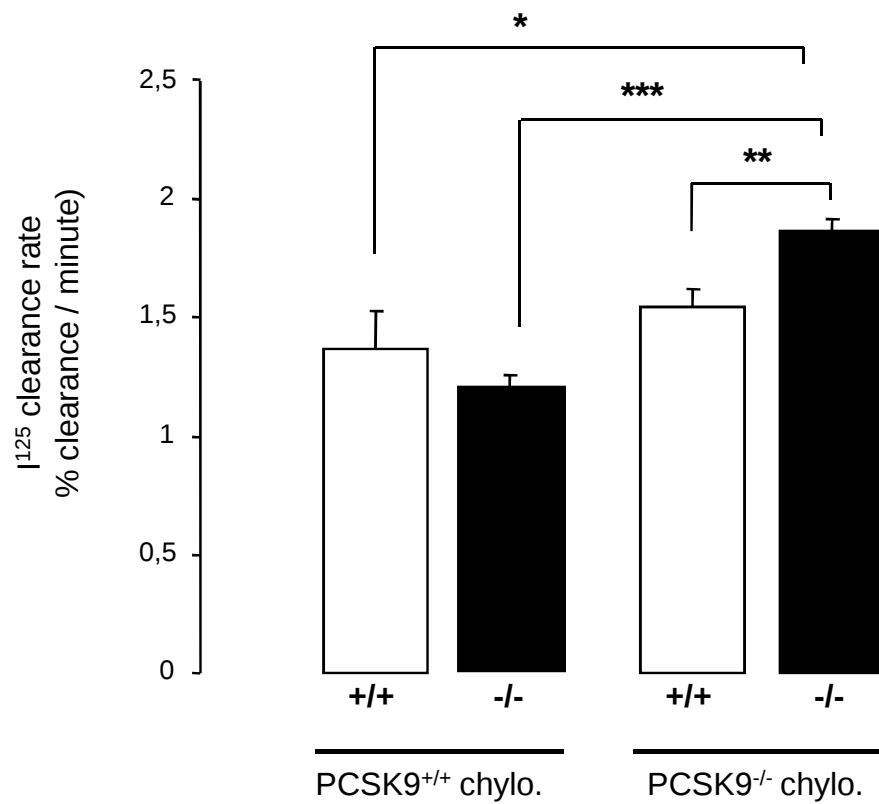
D



A



B



IV.3. PCSK9 loss-of-function double mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia

*Bertrand Cariou, Khadija Ouguerram, Yassine Zaïr, Raphael Guerois, **Sanae Kourimate**, Cédric Langhi, Isabelle Benoit, Khaldia Belabbas, Fabienne Dufernez⁵, Mathilde Berthome, Henri Vie, Maud Chétiveaux, Michel Krempf, Pascale Benlian, and Philippe Costet*

En révision.

PCSK9 loss-of-function double mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia

Bertrand Cariou^{1,2,3†}, Khadija Ouguerram^{1,2†}, Yassine Zaïr^{1,2,3}, Raphael Guerois⁴, Sanae Kourimate^{1,2}, Cédric Langhi^{1,2}, Isabelle Benoit^{1,2}, Khaldia Belabbas⁵, Fabienne Dufernez⁵, Mathilde Berthome⁶, Henri Vie⁶, Maud Chétiveaux^{1,2}, Michel Krempf^{1,2,3}, Pascale Benlian^{5, 7}, and Philippe Costet^{1,3,&}

¹ INSERM, U915, Nantes, F-44000 France ;

² Université de Nantes, Faculté de Médecine, l’Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France ;

³ Clinique d’Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, l’Institut du Thorax, Nantes, F-44000 France ;

⁴ Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, iBiTec-S, CEA, Gif sur Yvette, France

⁵ APHP, Hôpital Saint-Antoine, Biochimie B, Laboratoire de Référence pour le Diagnostic Génétique des Maladies Rares, F-75012, Paris, France;

⁶ INSERM, U892, Nantes, F-44000 France;

⁷ UPMC Univ Paris 06, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, F-75012, Paris, France ;

† The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

& Address correspondance to : Philippe Costet, INSERM, U915, CHU Hôtel Dieu, 3ENORD, 9, Quai Moncousu, 44000, Nantes, France. Fax: 01133(0)240287544, phone: 1133(0)240287533 Philippe.costet@univ-nantes.fr.

ABSTRACT

Pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) acts as a central player in the regulation of cholesterol homeostasis by inhibiting the low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) activity. *PCSK9* loss-of-function (LOF) mutations are associated with low levels of LDLCholesterol and confer protection against coronary heart disease. There has been no demonstration in human that PCSK9 deficiency is associated with increased LDL clearance. We identified a caucasian subject with severe familial hypobetalipoproteinemia (LDLCholesterol: 16 mg/dl) heterozygous for two *PCSK9* mutations: R104C and V114A. Genetic analysis in relatives confirmed co-segregation with hypobetalipoproteinemia (HBL) of both mutations on a single allele. Transient transfection of human immortalized hepatocytes with the V114A mutant reduced PCSK9 cleavage and the secretion of PCSK9, while the R104C mutant had a less dramatic effect. Combining both mutations virtually abolished the processing and secretion of PCSK9. The LDL binding capacity was increased (>100%) in the immortalized lymphocytes from R104C/V114A heterozygous relatives as compared with control. *In vivo* lipoprotein kinetics of apolipoprotein B100-rich lipoproteins in two HBL individuals have shown almost 100% increase of LDL catabolic rate as compared to controls (0.044 and 0.047 vs $0.025 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$). These results show that heterozygous PCSK9 missense mutations may associate with severe hypobetalipoproteinemia and constitute the first direct evidence in human that the decrease of plasma LDLCholesterol associated to PCSK9 LOF mutations are due to an increased clearance rate of LDL.

INTRODUCTION

Hypobetalipoproteinemia (HBL) refers to a heterogeneous group of monogenic disorders characterized by very low plasma concentrations of low density lipoprotein-cholesterol (LDLC) and apolipoprotein B (Apo B) (i.e. < 5th percentile of the distribution in the population) (for review see (1)). HBL includes three inherited disorders: (i) familial hypobetalipoproteinemia (FHBL) (OMIM 107730), (ii) abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM 200100), and chylomicron retention disease (CRD) (OMIM 246700). Both ABL and CRD are very rare recessive diseases expressed in the early infancy. ABL is due to mutations in the microsomal transfer protein gene (2), while CRD is due to mutations in the *SARA2* gene, which encodes a small GTPase (Sar1b) that controls the trafficking of chylomicrons in the enterocyte (3). In contrast to these very rare disorders, the frequency of subjects with heterozygous FHBL (mainly based on clinical diagnosis, i.e. very low levels of LDLC and ApoB) has been estimated to be 1:500/1:1000 (4). FHBL heterozygotes are often asymptomatic or express mild clinical manifestations such as fatty liver disease and intestinal fat malabsorption (5). FHBL are often caused by *APOB* gene mutations. Most of these mutations prevent the complete translation of ApoB mRNA, leading to truncated ApoBs of various size, reduced plasma half-life and, ultimately, altered functional activity (1,6). However, a substantial number of FHBL (varying to 36% (1) to 56% (7) in the literature) do not harbour ApoB point mutations.

In the last five years, pro-protein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) has emerged as a crucial modulator of cholesterol metabolism (8). PCSK9 is primarily expressed in the liver and the intestine. PCSK9 inhibits the LDL receptor (LDLR) activity in a post-transcriptional manner (8). Its autocatalytic activity is necessary to its processing and subsequent degradation of the hepatic LDLR. Recent data suggest that, once cleaved, secreted PCSK9 acts as a chaperone and promotes intracellular LDLR degradation by interfering with

the receptor recycling to the plasma membrane (9,10). In mice, adenoviral-mediated overexpression of wild-type PCSK9 resulted in a marked reduction of hepatic LDLR leading to hypercholesterolemia (11-13). In contrast, PCSK9-deficient mice exhibit reduced plasma LDLC levels and are more sensitive to statins (14). In human, PCSK9 was initially reported as the third gene causing autosomal dominant hypercholesterolemia, in addition with LDLR and ApoB mutations (15). Indeed, *PCSK9* gain-of-function (GOF) mutations lead to an increase of plasma LDLC levels and premature atherosclerosis (15,16). In contrast, *PCSK9* loss-of-function (LOF) mutations are associated with low levels of LDLC, protection against coronary diseases and possibly an increased response to statin therapy (17,18). Up today, only two individuals fully deficient in PCSK9 have been identified and present with very low levels of LDLC (14 mg/dL and 15 mg/dL) (19,20). Although *PCSK9* truncating mutations are more prevalent in FHBL subjects of African ancestry, LOF missense mutations associated with lowered plasma LDLC in the general population were reported on all continents (8).

Here, we identified a novel PCSK9 LOF mutation in a subject with heterozygous FHBL. As a molecular characterization, we found that this mutation abolished PCSK9 secretion in immortalized human hepatocytes *in vitro*. Of functional relevance, the LDLR activity was increased in the lymphocytes of family members carrying the mutation. By performing lipoprotein kinetics, we were able to demonstrate, for the first time, that FBHL linked to PCSK9 deficiency is due to an increase of LDL catabolic rate in human.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Clinical characteristics in the FHBL proband and relatives

A 48-year-old man was hospitalized for the rapid-onset of an insulin-requiring diabetes-mellitus with extremely low plasma LDLC levels (7 mg/dl) upon admission. At distance of diabetes onset, plasma LDLC concentrations were still very low (16 mg/dl). Abdominal ultrasonography did not show any evidence of liver steatosis in the proband. Hepatic enzymes levels, as blood count, were not altered. There was neither history of diarrhea nor eyes or neurological abnormalities related to any vitamin deficiency. The aetiology of the diabetes of the proband remains uncertain. HbA1C was initially increased at 11.5%. Upon admission, ketonuria (++++) was detected, evocative of an insulin-deficient state. However, islet-related auto-antibodies (anti-GAD and anti-IA2) were negative, probably excluding auto-immune type 1 diabetes. In favor of a type 2 diabetes, his brother (II.1) is type 2 diabetic and takes oral antidiabetic agents, but the proband was only slightly overweight (BMI: 27 kg/m², waist circumference: 92.5 cm) for a patient with type 2 diabetes. There was neither argument for endocrinopathy nor pancreas exocrine disease, with a normal abdominal computed tomography. He was free of microvascular and macrovascular diabetes-related complications. The patient was initially treated with a basal-bolus insulin therapy regimen, but he rapidly stopped the injections and he has actually a good glycemic control (HbA1C = 6.5%) with diet only.

Clinical and biological parameters were explored in volunteer family members of the proband (II.3) (**Table 1**). Of note, his son (III.2) was victim of an accidental death and one daughter (III.3) was not available for further investigations. One of his daughters (III.1, LDLC: 44 mg/dl) and his sister (II.2, LDLC: 57 mg/dl) had also FHBL. His wife (II.4, LDLC: 140 mg/dl) and his brother (II-1, LDLC: 93 mg/dl) were normolipidemic. Except for the

proband (II.3), fasting plasma glucose was strictly normal in FHBL relatives (II.2: 4.8 mmol/l, III.1: 4.7 mmol/l). As expected, FHBL subjects had also low plasma apoB concentrations (**Table 1**). Consequently, FHBL subjects exhibited highly cardioprotective ApoB/ApoA1 ratio (<0.25). The proband appeared to have low fasted plasma triglycerides levels for a type 2 diabetic patient, while both his sister (II.2) and his daughter (III.1) had near normal levels. In addition, there was no striking difference in plasma levels of other apolipoproteins (i.e. ApoC2, ApoC3, ApoE, Lp[a]), between FHBL subjects and normolipidemic relatives. Of note, the mother of the proband was prematurely deceased at 66-year old following a dementia. His grand parents died at the age of 79, 87, 91 and 94 year-old.

A Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) was performed on plasma from mutation-carriers II.3 and III.1 and from two healthy volunteers, a 36 year old male with a LDLC of 133mg/dl and a 25 year-old women with a LDLC of 77 mg/dl (**Figure 1**). Subjects fasted for 12hrs and cholesterol and triglycerides were measured in the various fractions. As expected, controls exhibited peaks of LDLC higher than that of HDLC but this was not the case for FHLB mutation-carriers (**Figure 1, upper panel**). Of note, the peak of HDL for III.1 was shifted to the left, suggesting larger particles. This was probably due to a larger content of triglycerides in the HDLs of III.1, **Figure 1, lower panel**).

Genotypic findings in the proband and family

The proband was heterozygous for 2 missense mutations R104C (c.310C>T) and V114A (c.341T>C) in exon 2 (**Figure 2A**). Both mutations were absent from 600 and 300 chromosomes from French hypercholesterolemic patients and normolipidemic blood donors respectively. Co-segregation analysis (**Figure 2B**) revealed that FHBL relatives II.2 and III.1 were also heterozygous for both mutations, whereas normolipidemic individuals were non-carriers of these mutations. Haplotyping informative single nucleotide polymorphism (SNP)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

and microsatellite at the PCSK9 locus, confirmed that both mutations were allelic, therefore adjacent on the same DNA strand. The proband’s normolipidemic spouse (II.4) and HBL daughter (III.1) were respectively homozygous and heterozygous carriers of a rare conservative L483V variation (c.1447C>G, in exon 9). All family members were carriers of the E3E3 genotype of APOE. In all family members DNA sequence of the LDLR proximal promoter and 5’-UTR (500 bp upstream initiation codon) matched the reference wild-type genomic sequence.

Computed structural model of PCSK9

Independent analysis of amino acid sequence conservation across animal species suggested a potential functional effect induced in human, by the single allele double R104C/V114A mutation (**Figure 3A**). Indeed, the presence of two adjacent DNA changes would generate a mutant protein harbouring two amino acid substitutions within a 10 amino-acid stretch of the PCSK9 prodomain which is highly conserved in 3 primate species, with lower level of amino acid sequence conservation in other mammals (7 species). In contrast, when the R104C or the V114A mutations were considered alone, amino-acid substitution prediction algorithms failed to provide consistent estimations of functionality, both mutations being alternately predicted as probably damaging, possibly deleterious or neutral. The only valid result was obtained for the L483V common genetic variant, being consistently estimated as neutral by the four algorithms.

The X-ray structure of PCSK9 (protein data bank code: 3BPS) can be used to map the positions of the mutations R104C and V114A and shed light on their potential impact (**Figure 3B**). PCSK9 is composed of three domains, the N-terminal domain corresponding to the pro-domain known to inhibit the proteolytic activity of the enzyme, the catalytic domain itself and a C-terminal domain adopting an three six-stranded β -sheet adipokine resistin-like structure.

Both point mutations are located in the pro-domain, remote from the catalytic site of the enzyme. R104 is rather solvent exposed while V114 is part of the hydrophobic core of the pro-domain suggesting this mutation may decrease the stability of the pro-domain.

It has been demonstrated that the final structure of the catalytic domain of subtilisin-like proteases is dependent on the folding process guided by their pro-domain. Notably, a previous study showed that a conservative mutation from Ile to Val (I-48V) in the hydrophobic core of the pro-domain of *Bacillus subtilis* subtilisin could change the structure and specificity of the active folded enzyme by altering the folding process (21). A remarkable feature of the V114A mutation is that it affects the same region of the pro-domain hydrophobic core as the I-48V mutation in the bacterial subtilisin (**Figure 3C**).

Processing and secretion of PCSK9

To assess the effect of R104C and V114 amino acid substitutions, alone or in combination, on PCSK9 processing, and secretion, immortalized human hepatocytes (IHH) were transiently transfected with the corresponding expression vectors flagged with a V5 epitope. In parallel, wild-type PCSK9 (WT-PCSK9) and the catalytically inactive S386A mutant (22) were also transfected in IHH cells (**Figure 4**). In lysates from cells expressing WT-PCSK9, two bands of 73 and 64 kDA were detected, corresponding to the pro-PCSK9 and the mature cleaved PCSK9 protein, respectively. As expected, cells expressing the S386A mutant contained only the pro- form, confirming that this protein failed to be processed. The relative amounts of pro-PCSK9 and cleaved PCSK9 of each variant were determined by western blot, independently of each other in order to avoid any bias that could be due to the level of expression of the constructs. The mutant R104C appeared to have decreased autocatalytic activity, whereas the autocatalytic cleavage of the mutant V114A was dramatically abolished when compared with that observed in cells expressing WT-PCSK9

(percentage of PCSK9 maturation at 62%, 13% and 2% in WT, V114A, and R104C respectively). Moreover, the combination of both amino acid substitutions R104C and V114A totally abolished the autocatalytic cleavage, in a similar extent to that of the catalytically inactive S386A mutant. Secreted mature WT-PCSK9 was detected in the cell culture medium by western blot analysis using anti-V5 antibody (**Figure 4, lower**). As previously described (23), cells expressing the S386A mutant appeared to secrete the uncleaved form of PCSK9 in the medium. A lower band appeared in the cells transfected with WT-PCSK9, potentially corresponding to the previously described cleavage product by furin and PC5/6A at RFHR₂₁₈↓ (24). Interestingly, this additional band was not present in the lanes corresponding to mutants R104C and V114A, suggesting that these mutations impair PCSK9 sensitivity to this degradation pathway. Compared with WT-PCSK9, the amino acid substitution R104C only slightly reduced and the V114A strongly impaired the secretion of the protein. Strikingly, the combination of both V114A and R104C resulted in no immunodetectable PCSK9 in the media, suggesting an additive effect. Altogether, these results indicate that the combination of both R104C and V114A amino acid substitutions, observed in heterozygous carriers, is associated with a severe defect of processing and secretion of PCSK9 *in vitro*.

LDL-binding capacity in immortalized lymphocytes

In a step further, we tested whether the quantity of cell surface LDLR was affected by the R104C/V114A amino acid substitutions in carriers. To address this question, we used Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphocytes from the patients, a cellular model in which both PCSK9 and LDLR have been shown to be expressed (**Figure 5**) (23,25). LDLR binding capacities was assayed by measuring the surface binding of ¹²⁵I-labelled human LDL at 4°C. The amount of bound LDL was increased by 105% (p<0.01) for the proband (II.3) and by 160% (p<0.05) for his daughter (III.1), both heterozygous carriers of R104C/V114A

mutations, when compared to cells from the proband's wife who is a non-carrier (II.4). The difference between the two carriers was not statistically significant. Thus, the monoallelic double amino acid substitution R104C/V114A is associated with a strong increase of cell surface LDLR expression in lymphocytes from FHBL subjects.

In vivo lipoprotein kinetics study

There is no demonstration yet that *PCSK9* LOF mutations actually increase LDL catabolism in human. In order to show that *PCSK9* LOF double mutant R104C/V114A could alter LDL metabolism in human, *in vivo* kinetics of ApoB100-containing lipoproteins using a 14-hour primed constant infusion of [2H3] leucine were conducted in the proband (II.3) and his daughter (III.1), as well as in healthy control subjects (n=11). The proband's sister, II.2, was not available for further investigation. Time course of enrichments in VLDL, IDL and LDL ApoB100 for the carriers and controls are shown as **supplementary figure 2**. Model fitted lines and experimental points showed close agreement. Kinetic parameters are shown in **Table 2**. In the preparation of the samples for mass spectrometry analysis, we did not observe any abnormalities of the Apo B100 electrophoresis.

For the proband, the Apo B100 total production rate (0.55 vs 0.60 ± 0.31 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$), as well as the proportion of ApoB100 secreted in VLDL, IDL and LDL, were similar to that of controls (calculated as PR VLDL or direct production of IDL (PRdIDL) or LDL (PRd LDL) divided by TPR, respectively 71%, 13% and 16% for II.3 and 72%, 10, 18% for controls) (**Table 2**). Importantly, the fractional catabolic rate (FCR) of these lipoproteins was dramatically higher than that of controls. The higher FCR is related to an increased direct lipoprotein removal (0.40 vs 0.05 ± 0.02 h^{-1} for VLDL and 0.69 vs 0.20 ± 0.15 h^{-1} for IDL).

For the proband's daughter III.1, the ApoB100 total production rate was higher than controls (1.13 vs 0.60 ± 0.31 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$). However, the proportion of ApoB100 secreted in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

VLDL, IDL and LDL was similar to controls (respectively 72%, 9% and 17%), suggesting a higher production rate but a normal distribution of ApoB100 on each lipoprotein class. This subject also displayed a higher FCR for VLDL, IDL and LDL. Once again, this higher FCR is related to a higher direct removal (0.22 h^{-1} vs $0.05\pm0.02\text{ h}^{-1}$ for VLDL and 0.92 h^{-1} vs $0.20\pm0.15\text{ h}^{-1}$ for IDL).

For Peer Review

DISCUSSION

We report a French family with several individuals exhibiting low concentrations of LDLC. The FHBL proband was a heterozygous carrier of R104C and V114A amino acid substitutions in PCSK9 prodomain. Both mutations were previously reported independently, as part of population screening by PCSK9 gene sequencing in healthy individuals. The R104C was reported as a heterozygous rare allele (frequency < 0.005) in a single hypercholesterolemic individual living in the area of Osaka, Japan (26). The V114A mutation was also found heterozygous and rare (frequency < 0.005) in a single hypocholesterolemic blood donor originating from Sicily, Italy (27). Apart from plasma lipid profile, any evidence of functionality was not further investigated in carriers of these mutations. A similar picture of very rare allele frequency was found in the French population since none of these mutations were found in both hypercholesterolemic and normolipidemic individuals. In addition, both mutations segregated on a single-allele in FHBL relatives, whom exhibited a phenotype compatible with heterozygosity at a FHBL disease-causing locus. ApoB100 migration on polyacrilamide gel electrophoresis (data not shown) and LDLR promoter genotype were compatible with normal LDLC homeostasis, suggesting that the R104C/V114A mutations are the cause of FHBL. Although mutations on the *APOB* or *MTP* genes cannot be excluded, the clinical profile of the patients (*i.e.* absence of impaired neurological development, severe intestinal malabsorption, or liver steatosis) was not compatible with *MTP* mutations or severe truncations of *APOB*.

One unresolved issue concerns the aetiology of the diabetes mellitus of the proband. The clinical course of the diseases is very similar that observed in ketosis prone diabetes (type 1B), with an abrupt onset without autoimmune markers against β -cell, and a subsequent recovery of the pancreatic function. Recently, experimental evidences suggest a potential link between cholesterol metabolism and β -cell function (28). Whether PCSK9 can indirectly

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

modulates the insulin secretion by altering the LDLCholesterol metabolism remains an opening question.

Bioinformatic estimation of potential functionality using different algorithms computing amino acid conservation across species or the subtilase gene family, and potential consequences of amino acid substitutions failed to provide consistent prediction of functionality for the R104C and V114A mutation when each was considered alone. Evolutionary conservation analysis revealed a high primate species-specificity of PCSK9 prodomain primary sequence where both mutations resided, with contrasted low cross-species amino-acid conservation since *Xenopus Laevis*. This could account for discrepant results provided by mutation predictions algorithms. When each mutation was considered alone, results varied depending on the relative weight allocated to cross-species evolutionary conservation, for final functionality prediction. This emphasizes that biological evidence remains a crucial issue for proof of functionality of human mutations. However, both mutations neighboured on the same DNA strand, in close proximity (10 residues) within a highly conserved region of PCSK9 prodomain in primates, albeit less conserved in mammals. Since old-world primates and human transport most extracellular cholesterol in LDL, contrary to rodents or other mammals (29,30), we hypothesized that, despite an overall mammalian prodomain sequence divergence, the present double substitution could alter PCSK9 function specifically in human. In addition, the structural analogy between the conservative mutation from Ile to Val (I-48V) in the hydrophobic core of the pro-domain of *Bacillus subtilis* subtilisin (21) and PCSK9 V114A mutation raises the possibility that the V114A mutant may not only affect the stability of the pro-domain but also impede the global structure and activity of the folded PCSK9 enzyme. Moreover, recent analyses of the proprotein convertase 1 and proprotein convertase 3 also suggest that the catalytic properties of this enzymes family may be modulated by mutations in the pro-domain region (31). In human hepatocytes transfected

1
2
3 with vectors coding for R104C or V114A, R104C impaired the cleavage of the protein, but
4
5 V114A appeared to be more deleterious to the processing and overall secretion of PCSK9.
6
7
8 However, concomitantly, both mutations seemed to present with an additive effect, resulting
9
10 in virtually no secretion and therefore no extracellular interaction with the LDLR.
11

12
13 We used stable isotope tracer methodology to study the *in vivo* kinetics of ApoB100 in
14
15 two subjects carrying the double mutation R104C/V114A. Previous work in PCSK9 *-/-* mice
16
17 showed an increase of LDL catabolism (14). Our study demonstrates for the first time an
18
19 accelerated LDL catabolism in patients affected by PCSK9 loss-of-function mutation. The
20
21 increase in FCR was observed for VLDL, IDL and LDL, and resulted in less proportion of
22
23 VLDL and IDL converted to LDL. The resulting effect is a dramatic decrease in plasma LDL
24
25 content. Taking into account previous studies in PCSK9 *-/-* mice (14) and the ones described
26
27 here on lymphocytes from FHBL individuals that exhibit higher LDL binding capacities, it is
28
29 very probable that the increased FCRs in human are related to the overexpression of the
30
31 hepatic LDLR. Indeed it was shown that not only LDL but also VLDL can be recaptured by
32
33 the liver via the LDLR (32). The increased ApoB100 rich lipoprotein catabolism in PCSK9
34
35 LOF-mutation carriers mirrors the deficient lipoprotein catabolism we previously reported in
36
37 patients with the GOF mutation S127R (33). However the comparison for ApoB100
38
39 production is less straightforward. In two hypercholesterolemic patients (mother and son)
40
41 harbouring the S127R variant we have found an ApoB100 production twice that of FH
42
43 patients (33), suggesting that PCSK9 could be involved in the packaging and plasma delivery
44
45 of VLDL. This link between ApoB100 production rate and the S127R variant was reproduced
46
47 by another team *in vitro* (23). In the present study, total production rate of apoB100 was
48
49 found to be increased in the daughter but not in the proband, potentially explaining the larger
50
51 decrease of LDLC observed in this patient. Whether this discrepancy in kinetic data between
52
53 the subjects is related to gender is still a matter of debate (34). However, the fact that
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

estrogens increase ApoB100 production while androgens attenuate this effect (35,36) support possible effect of gender on variability of data concerning ApoB100 production. Nevertheless, the present study doesn't allow us to conclude for an effect of PCSK9 deficiency related to R104C/V114A double mutation on apoB100 production. Thus our previous finding might be specific to the patients characterized or to the variant S127R. Indeed mutations affecting different residues of PCSK9 might result in different protein-protein interactions. Therefore more characterization is needed with patients carrying different GOF and LOF mutations to definitely conclude on this issue.

In conclusion, PCSK9 monoallelic LOF mutations affecting the protein prodomain can be associated to FHBL. The demonstration that PCSK9 LOF mutations are accompanied by increased LDL catabolic rate in humans provides an additional argument for developing inhibitors of PCSK9.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The experimental protocol was approved by the ethic committee of the Nantes University Hospital and written consents were obtained from each volunteer before inclusion in the study (Protocol referenced as n° 15/06 - BRD 06/3-E).

11 (1 female and 10 males) normolipidemic controls (34±12 years old; body mass index, 26±4.4 kg/m²) studied (33) by the same compartmental method were used for comparison of parameters kinetic. None had any disease on physical examination.

Molecular Genetics

DNA was extracted from blood leucocytes by a phase exchange method (Puregene, Gentra systems, Minneapolis, USA). Genomic sequences of PCSK9 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq# NC_000001.9](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq#NC_000001.9), GeneID 255738), and LDLR (NCBI Refseq # NC_000019.8, GeneID 3949), were PCR-amplified (YellowStar™, Taq Polymerase, Eurogentec, Belgium), and sequenced as previously described (16,37). Exonic and periexonic regions were sequenced on forward and reverse strands, by the Big-Dye terminator cycle-sequencing protocol on a 16-capillary DNA sequencer (ABI 3130, Applied Biosystems, France). For mutation detection, electronic DNA sequence tracks were read using software Seqscape™ (Applied Biosystems, France). APOE polymorphism (alleles E2, E3 and E4; dbSNP rs429358 and rs7412, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) was assessed by allele-specific hybridization of PCR products on nitrocellulose strips (InnoGenetics, Belgium).

Bioinformatics

The Gensearch® software (v3.5, Phenosystems, Belgium) was used to analyze raw sequence data for mutation detection and functionality qualification against HUGO criteria and public genomic databases (<http://www.phenosystems.com>). The algorithm uses base caller “Phred” (www.phrap.com/Phred) and incorporates computed criteria for DNA variation (substitutions or In/Del) qualification as possible or probable heterozygous or homozygous mutations, after filtering for known DNA polymorphisms. These criteria derive from computed comparisons of peak areas and relative positions along the sequence track, with genomic reference sequences and with wild-type sequence tracks. In addition, the software provides links with open-access tools to public databases for genomic comparisons, structure and ontology analyses. In the present study, the BLAT and PhastCons (<http://genome.ucsc.edu/>) tools were used for estimation of evolutionary sequence conservation and genetic polymorphism analysis.

Protein sequence alignments (NCBI accession#: NP_777596 (human/ Homo Sapiens Sapiens); NP_001104592 (Chimpanzee/Pan Troglodytes); NP_001106130 (Rhesus Monkey/Macaca Mulatta); NP_705793 (Mouse/Mus Musculus), were performed with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Several amino acid substitution prediction algorithms based on protein sequence comparisons and estimated functional changes from amino-acid structural differences, were used: POLYPHEN <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>; PMut <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>; SNPs3D <http://www.snps3d.org>; SIFT <http://blocks.fhcrc.org/sift>. Estimation of potential functionality of an amino acid change was considered as valid, if at least 3 algorithms provided consistent predictions.

Biochemistry

Biochemical analysis (table 1) were performed by the Biochemical Analysis Facility of Nantes University Hospital.

Fast Protein Liquid Chromatography.

Lipoproteins were isolated by FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). 200 µL of plasma were injected into a MV-7 multi-injection loop and separation was performed on 2 superose 6 HR 10/30 columns in series at flow rate of elution at 0.35 mL/min; 0.5 mL was collected for each fraction and entire profile was completed within 105 minutes. The system was controlled by FPLC DIRECTOR software (Amersham Pharmacia Biotech Inc). Cholesterol and triglycerides levels were measured on FPLC fractions using commercially available enzymatic kits (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

Expression constructs for PCSK9-WT and mutant forms of PCSK9

Wild type human PCSK9 (genebank AX207686) with a V5 epitope tag was inserted into pcDNA3.1 and used as a backbone in order to produce various mutants (Genscript, Piscataway, NJ, USA).

Western blot analysis of transfected IHH

Immortalized human hepatocytes (IHH) (38) were cultured on collagen-coated flasks in William's E medium in the presence of a 10% fetal calf serum (FCS). They were seeded (1×10^6 cells/well) in 6-well plates. Expression plasmids (2.5 μ g/well) were transiently transfected into IHH cells with lipofectamine (5 μ l/well) in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5 mM glucose, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). After a 4h30 transfection, the DMEM was replaced with William's E medium without FCS for 24h. Cells were scraped and homogenized in 1x phosphate-buffered saline containing 0.25% sodium-deoxycholate, 1% Triton X-100, and a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic). 70 μ g proteins were analysed by Western blot as described elsewhere (39), using a mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen). For secretion analysis, proteins from 500 μ l of cell culture media were precipitated with acetone and 30 μ g of proteins used for Western blot.

LDL binding capacity in immortalized lymphocytes

Human LDL (d 1.019 to 1.063 g/ml) was isolated from plasma of healthy normolipemic fasting donors by isopycnic preparative ultracentrifugation using a discontinuous KBr density gradient (40). Isolated LDL was dialysed at least 36 hours at 4°C against PBS pH 7.4. Radiolabelling procedure was performed according to the iodogen® method modified by Fraker et al (41). Immortalized lymphocytes (0.5×10^6 cells) were incubated for 30 min at 4°C with 20 μ g/ml of 125 I-labelled LDL in 1ml of RPMI supplemented with LPDS 5% containing

4 % fatty acid-free BSA and 50 mM Hepes, pH 7.4. Non-specific binding was determined by the addition of 0.5 mg/ml unlabelled LDL. At the end of the incubation period, the cells were washed three times with 1 ml of D-PBS containing 1 % BSA then three times with 1 ml of D-PBS. The cells were solubilized in 1 ml of 1 M NaOH, the protein content was determined using BSA as a standard, and the radioactivity was measured (1480 Wizard 3" Automatic Gamma Counter, Wallac, Waltham Massachusetts USA). The measured radioactivity was normalized per mg of cell proteins and the specific binding was calculated by subtracting the non-specific binding of ^{125}I -labelled LDL from the total binding.

Kinetics of lipoprotein

The endogenous labeling of ApoB100 was carried out by constant infusion of $[2\text{H}_3]$ -leucine in subjects fasted overnight for 12 h prior to the study, and who remained fasting during the entire procedure. Each subject received intravenously a prime of $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ of tracer immediately followed by a constant tracer infusion ($10 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) for 14 h. Venous blood samples were drawn into EDTA tubes (Venoject, Paris, France) at baseline and at 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 2.5 h, and then hourly until 14 h. Sodium azide, an inhibitor of bacterial growth, and Pefabloc SC (Interchim, Montluçon, France), a protease inhibitor, were added to blood samples at a final concentration of 1.5 and 0.5 mmol/L, respectively.

• Isolation of ApoB100 and measurement of enrichment.

Lipoproteins were separated by ultracentrifugation and ApoB100 was isolated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acids obtained by hydrolysis were esterified and derivatized and analyzed by electron-impact gas chromatography-mass spectrometry (5891A gas chromatograph connected with a 5971A quadrupole mass spectrometer). The isotopic ratio was determined by selected ion-monitoring at m/z of 282

and 285. Calculations of ApoB100 kinetic parameters were based on the tracer-to-tracee mass ratio (42).

• *Measurements of lipids and ApoB100*

Cholesterol and triacylglycerol concentrations were measured using commercially available enzymatic kits (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) at three different sampling times. The percentage recovery of cholesterol, triacylglycerol and apolipoprotein B100 after FPLC separation was higher than 85%. ApoB100 concentrations were obtained in lipoprotein fractions by combining selective precipitation and mass spectrometry (Beghin, 2000).

• *Modeling*

Kinetic analysis of tracer-to-tracee ratios was achieved using computer software for simulation, analysis and modeling (SAAMII, Resource Facility for Kinetic Analysis, SAAM Institute, Seattle, WA). The model used (**supplementary figure 1**) and the measure of the kinetic parameters were previously described (43). This model takes into account the heterogeneity of VLDLs, e.g. large (VLDL1) and small VLDL (VLDL2) and the shunt between VLDL and LDL. In this model, a forcing function, corresponding to the time course of plasma leucine enrichment, was used to drive the appearance of leucine tracer into ApoB100 during the process of synthesis. Methods provided identified values $\pm$ standard deviation obtained by iterative least squares fitting for individual kinetic parameters. Standard deviations were less than 30% for most of the parameters (data not shown). The use of more complex models did not provide significant improvement in the fitting from F test and Akaike information criterion (44). For comparison with controls, the VLDL1 and VLDL2 data were presented as VLDL conversion rate (CR) and VLDL fractional catabolic rate (FCR), which represents the sum of conversion rate and direct removal rate. The VLDL conversion rate was calculated as VLDL2 delipidation flux divided by total VLDL mass. The VLDL direct

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

removal was calculated as a sum of VLDL1 and VLDL2 direct removal divided by total VLDL mass. The ApoB100 production rate (PR) in mg/kg/h represents the product of FCR and pool size of ApoB100 in lipoprotein fractions. Pools of ApoB100 in VLDL, IDL, LDL were calculated by multiplying the ApoB100 concentration by 0.045 (L/kg) assuming a plasma volume of 4.5% of body weight (45).

Statistics: Results are representative of 2 or more experiments. Error bars represent means $\pm$ SD. A Student t test was used to estimate statistical significance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the patients and their families for their cooperation in this study. This work was supported by a specific funding program “Plan Maladies Rares”, of the French Ministry of Health (DHOS) and by Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), by Agence nationale de la Recherche (« Physiopathologies humaines 2006 R0651ONS »), Fondation de France, ALFEDIAM, PNR-Maladies Cardiovasculaires 2006. Sanae Kourimate is sponsored by Régions Pays de La Loire and Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes. Philippe Costet has a “Contrat d’Interface” INSERM –CHU de Nantes. We thank Chantal Bernard, Christine Morel and Laure Muller (Laboratoire de Reference pour le Diagnostic des Maladies Rares), APHP, for excellent technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to report.

Reference List

1. Tarugi,P., Aversa,M., Di,L.E., Cefalu,A.B., Noto,D., Magnolo,L., Cattin,L., Bertolini,S., Calandra,S. (2007) Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*, 195, e19-e27.
2. Wetterau,J.R., Aggerbeck,L.P., Bouma,M.E., Eisenberg,C., Munck,A., Hermier,M., Schmitz,J., Gay,G., Rader,D.J., Gregg,R.E. (1992) Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*, 258, 999-1001.
3. Jones,B., Jones,E.L., Bonney,S.A., Patel,H.N., Mensenkamp,A.R., Eichenbaum-Voline,S., Rudling,M., Myrdal,U., Annesi,G., Naik,S., *et al.* (2003) Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat. Genet.*, 34, 29-31.
4. Linton,M.F., Farese,R.V., Jr., Young,S.G. (1993) Familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.*, 34, 521-541.
5. Schonfeld,G. (2003) Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *J. Lipid Res.*, 44, 878-883.
6. Hooper,A.J., van Bockxmeer,F.M., Burnett,J.R. (2005) Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.*, 42, 515-545.
7. Fouchier,S.W., Sankatsing,R.R., Peter,J., Castillo,S., Pocovi,M., Alonso,R., Kastelein,J.J., Defesche,J.C. (2005) High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinaemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J. Med. Genet.*, 42, e23.
8. Costet P, Krempf M, Cariou B (2008) PCSK9 and LDL cholesterol: Unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem. Sci.*, 33, 426-434.
9. McNutt,M.C., Lagace,T.A., Horton,J.D. (2007) Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce LDL receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, 282, 20799-20803.
10. Zhang,D.W., Lagace,T.A., Garuti,R., Zhao,Z., McDonald,M., Horton,J.D., Cohen,J.C., Hobbs,H.H. (2007) Binding of PCSK9 to EGF-A repeat of LDL receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.*, 282, 18602-18612.
11. Lalanne,F., Lambert,G., Amar,M.J., Chetiveaux,M., Zair,Y., Jarnoux,A.L., Ouguerram,K., Friburg,J., Seidah,N.G., Brewer,H.B., Jr., *et al.* (2005) Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J. Lipid Res.*, 46, 1312-1319.

12. Maxwell,K.N., Breslow,J.L. (2004) Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 101, 7100-7105.
13. Maxwell,K.N., Fisher,E.A., Breslow,J.L. (2005) Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 102, 2069-2074.
14. Rashid,S., Curtis,D.E., Garuti,R., Anderson,N.N., Bashmakov,Y., Ho,Y.K., Hammer,R.E., Moon,Y.A., Horton,J.D. (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 102, 5374-5379.
15. Abifadel,M., Varret,M., Rabes,J.P., Allard,D., Ouguerram,K., Devillers,M., Cruaud,C., Benjannet,S., Wickham,L., Erlich,D., *et al.* (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.*, 34, 154-156.
16. Allard,D., Amsellem,S., Abifadel,M., Trillard,M., Devillers,M., Luc,G., Krempf,M., Reznik,Y., Girardet,J.P., Fredenrich,A., *et al.* (2005) Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.*, 26, 497.
17. Berge,K.E., Ose,L., Leren,T.P. (2006) Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 1094-1100.
18. Cohen,J.C., Boerwinkle,E., Mosley,T.H., Jr., Hobbs,H.H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 354, 1264-1272.
19. Zhao,Z., Tuakli-Wosornu,Y., Lagace,T.A., Kinch,L., Grishin,N.V., Horton,J.D., Cohen,J.C., Hobbs,H.H. (2006) Molecular Characterization of Loss-of-Function Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *Am. J. Hum. Genet.*, 79, 514-523.
20. Hooper,A.J., Marais,A.D., Tanyanyiwa,D.M., Burnett,J.R. (2007) The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*, 193, 445-448.
21. Shinde,U.P., Liu,J.J., Inouye,M. (1997) Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*, 389, 520-522.
22. Naureckiene,S., Ma,L., Sreekumar,K., Purandare,U., Lo,C.F., Huang,Y., Chiang,L.W., Grenier,J.M., Ozenberger,B.A., Jacobsen,J.S., *et al.* (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.*, 420, 55-67.
23. Sun,X.M., Eden,E.R., Tosi,I., Neuwirth,C.K., Wile,D., Naumova,R.P., Soutar,A.K. (2005) Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 1161-1169.

24. Benjannet,S., Rhainds,D., Hamelin,J., Nassoury,N., Seidah,N.G. (2006) The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J. Biol. Chem.*, 281, 30561-30572.
25. Benjannet,S., Rhainds,D., Essalmani,R., Mayne,J., Wickham,L., Jin,W., Asselin,M.C., Hamelin,J., Varret,M., Allard,D., *et al.* (2004) NARC-1/PCSK9 and Its natural mutants: Zymogen cleavage and effects on the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 279, 48865-48875.
26. Miyake,Y., Kimura,R., Kokubo,Y., Okayama,A., Tomoike,H., Yamamura,T., Miyata,T. (2007) Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: Rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis.*, 196, 29-36.
27. Fasano,T., Cefalu,A.B., Di,L.E., Noto,D., Pollaccia,D., Bocchi,L., Valenti,V., Bonardi,R., Guardamagna,O., Averna,M., Tarugi,P. (2007) A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27, 677-681.
28. Brunham,L.R., Kruit,J.K., Verchere,C.B., Hayden,M.R. (2008) Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest*, 118, 403-408.
29. Dietschy,J.M., Turley,S.D., Spady,D.K. (1993) Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.*, 34, 1637-1659.
30. Davis,R.A. (1997) Evolution of processes and regulators of lipoprotein synthesis: from birds to mammals. *J. Nutr.*, 127, 795S-800S.
31. Rabah,N., Gauthier,D., Wilkes,B.C., Gauthier,D.J., Lazure,C. (2006) Single amino acid substitution in the PC1/3 propeptide can induce significant modifications of its inhibitory profile toward its cognate enzyme. *J. Biol. Chem.*, 281, 7556-7567.
32. Twisk,J., Gillian-Daniel,D.L., Tebon,A., Wang,L., Barrett,P.H., Attie,A.D. (2000) The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J. Clin. Invest*, 105, 521-532.
33. Ouguerram,K., Chetiveaux,M., Zair,Y., Costet,P., Abifadel,M., Varret,M., Boileau,C., Magot,T., Krempf,M. (2004) Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24, 1448-1453.
34. Watts,G.F., Moroz,P., Barrett,P.H. (2000) Kinetics of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in normolipidemic subjects: pooled analysis of stable-isotope studies. *Metabolism*, 49, 1204-1210.
35. Croston,G.E., Milan,L.B., Marschke,K.B., Reichman,M., Briggs,M.R. (1997) Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinology*, 138, 3779-3786.

36. Smith,P.M., Cowan,A., White,B.A. (2004) The low-density lipoprotein receptor is regulated by estrogen and forms a functional complex with the estrogen-regulated protein ezrin in pituitary GH3 somatolactotrope. *Endocrinology*, 145, 3075-3083.
37. Amsellem,S., Briffaut,D., Carrie,A., Rabes,J.P., Girardet,J.P., Fredenrich,A., Moulin,P., Krempf,M., Reznik,Y., Vialettes,B., *et al.* (2002) Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, 111, 501-510.
38. Schippers,I.J., Moshage,H., Roelofsen,H., Muller,M., Heymans,H.S., Ruiters,M., Kuipers,F. (1997) Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol. Toxicol.*, 13, 375-386.
39. Costet,P., Cariou,B., Lambert,G., Lalanne,F., Lardeux,B., Jarnoux,A.L., Grefhorst,A., Staels,B., Krempf,M. (2006) Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory-element binding protein 1c. *J. Biol. Chem.*, 281, 6211-6218.
40. Chapman,M.J., Goldstein,S., Lagrange,D., Laplaud,P.M. (1981) A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J. Lipid Res.*, 22, 339-358.
41. Fraker,P.J., Speck,J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 849-857.
42. Cobelli,C., Toffolo,G., Foster,D.M. (1992) Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism. *Am. J. Physiol.*, 262, E968-E975.
43. Ouguerram,K., Magot,T., Zair,Y., Marchini,J.S., Charbonnel,B., Laouenan,H., Krempf,M. (2003) Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306, 332-337.
44. Pont,F., Duvillard,L., Verges,B., Gambert,P. (1998) Development of compartmental models in stable-isotope experiments: application to lipid metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 853-860.
45. Dagher,F.J., Lyons,J.H., Finlayson,D.C., Shamsai,J., Moore,F.D. (1965) Blood volume measurement: a critical study prediction of normal values: controlled measurement of sequential changes: choice of a bedside method. *Adv. Surg.*, 1, 69-109.
46. Kwon,H.J., Lagace,T.A., McNutt,M.C., Horton,J.D., Deisenhofer,J. (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 1820-1825.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Fast-protein liquid chromatography of R104C/V114A carriers

Fast-protein liquid chromatography (FPLC) profile of plasma samples from the proband (II-3, black square) and his daughter (III-3, black circle), carrying the R104C/V114A amino acid substitutions, and a 36-year old male (empty square) and 24-year old female (empty circle) controls. Cholesterol (upper panel) and triglycerides (lower panel) concentrations in the eluted fractions are indicated on the y axis.

Figure 2. Genotypic findings and cosegregation analysis in the HBL family.

A) DNA sequence chromatogram (Gensearch® output) centred on PCSK9 mutations found in FHBL proband. Exon 2 reference sequence is shown in black letters (bottom line), patient sequence is coloured according to PHRED base-calling (top line). Alternate bases found in patient at specific positions are shown in between. Positions with high probability of mutation are highlighted in yellow. B) Segregation analysis of PCSK9 exon 2 mutations (indicated by “*”) and informative polymorphic markers, with HBL in the family. HBL subjects are represented by filled symbols, normolipidemic subjects by open symbols. Subject represented by dotted-line symbols filled with “ND”, were not available for genetic studies. Age and plasma LDL cholesterol concentrations are indicated below symbols (ND: not determined). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are described according to coding sequence numbering, with corresponding accession number in dbSNP. The number (n) of short tandem repeats in intron 9 (GT)_n is indicated within haplotypes (above or below individual symbols). Haplotype segregating with exon 2 allelic mutations and HBL is coloured in red.

Figure 3: R104C and V114A amino acid substitutions

A) Amino acid sequence alignment for human (homo sapiens), primate (Chimpanzee : Pan troglodytes, and Rhesus monkey : Macaca mulatta) and mouse (Mus Musculus) PCSK9 N-terminal domain. Residues corresponding to the prodomain are coloured in blue. Residues non-identical to human sequence are coloured in red, and marked by a red “*” below sequences; identical residues are marked by a “-“. R104 and V114 residues are highlighted in green and indicated by an arrow. B) Ribbon representation of the complex between PCSK9 and EGF-A domain of LDLR using the PDB code 3BPS (46). The pro-domain of PCSK9 is coloured from blue to red from the N- to the C-terminus. The catalytic domain is coloured gray, the EGF-A domain of is coloured yellow. The locations of various mutants are shown as sticks. The C-terminal domain of PCSK9 is not shown. C) Comparison between the structures of the Bacillus subtilis subtilisin (blue ribbon) and of the human PCSK9. The location of the I-48V mutant is shown as pink sticks. Images were produced using PYMOL.

Figure 4: PCSK9 processing is abolished by the double R104C V114A mutation.

Human immortalized hepatocytes were transfected with the plasmid pcDNA3.1 empty (control) or coding for wild type PCSK9 (WT), the loss-of-function variants S386A, R104C, V114A, or the double mutant R104C V114A. Proteins were extracted from the lysates of cell media and analysed by western blot using an anti-V5 antibody. Within cell lysates, the intensity of each band (proPCSK9 and PCSK9) was determined by densitometry and the percentage of maturation was calculated for each variant independently of each other, as the contribution of the lower band (PCSK9) to the sum of the signals obtained for both bands (proPCSK9 and PCSK9). A star indicates the band corresponding to the cleavage of PCSK9 by furin and PC5/6A(24).

Figure 5. LDL-binding capacity of EBV-transformed immortalized lymphocytes from carriers and a non carrier of the PCSK9 R104C V114A variant.

EBV-transformed lymphocytes from the proband (II.3), his daughter (III.1), both harbouring the PCSK9 R104C V114A variant, and the mother (II.4), who is a non carrier, were incubated with ^{125}I -labelled LDL at 4°C in order to measure the quantity of LDLR present at the cell surface. Bars represent the mean $\pm$ SD, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

TABLES

Table 1 Clinical and biological characteristics in carriers of the R104C/V114A PCSK9 mutant and in their relatives.

	Individuals				
	II.1	II.2*	II.3*	II.4	III.1*
Age (years)	51	37	49	48	29
Sex	M	F	M	F	F
BMI (kg/m ²)	ND	ND	28.8	21.0	22.9
Total serum cholesterol (mg/dl)	167	152	100	235	143
LDLC (mg/dl)	93	57	16	140	44
HDLC (mg/dl)	57	81	75	82	83
Triglycerides (mg/dl)	84	71	49	68	71
ApoA1 (mg/dl)	141	218	188	203	226
ApoB (mg/dl)	72	52	25	87	44
ApoB/apoA1	0.51	0.24	0.13	0.43	0.19
ApoC2 (mg/l) [N:14-54]	nd	nd	62	44	48
ApoC3 (mg/l) [N:66-171]	nd	nd	155	89	135
ApoE (mg/l) [N:25-53]	nd	nd	34	51	35
Lp(a) (g/l)	nd	nd	<0.12	<0.12	<0.12
Fasting plasma glucose (mmol/l)	5.4	4.8	7.0	4.5	5.2
HbA1c (%)	5.4	4.8	5.6	ND	ND
ASAT (multiple of the upper limit of the normal range)	0.67	0.51	0.93	0.88	0.74
ALAT (multiple of the upper limit of the normal range)	0.85	0.37	0.74	0.64	0.66

BMI, body mass index, Apo, apolipoprotein, LDLC, low density lipoprotein associated cholesterol, HDLC, high density lipoprotein associated cholesterol, Lp(a), lipoprotein a,

HbA1c, glycated haemoglobin A1c, ASAT, aspartate amino transferase, ALAT, alanine amino transferase. * Carrier of the R104C/V114A amino acid substitution.

Table 2 Lipoprotein kinetic parameters in carriers of PCSK9 R104C/V114A mutation and controls.

		<i>VLDL</i>			<i>IDL</i>				<i>LDL</i>		
	TPR	PR	FCR	CR	PR	PRd	FCR	CR	PR	PRd	FCR
II.3	0.55	0.39	0.71	0.32	0.24	0.07	0.79	0.10	0.12	0.09	0.044
III.1	1.13	0.82	0.87	0.65	0.67	0.10	1.22	0.30	0.34	0.19	0.047
Controls											
Mean	0.60	0.43	0.38	0.33	0.47	0.06	0.51	0.31	0.43	0.11	0.025
SD	0.31	0.15	0.18	0.15	0.14	0.04	0.17	0.17	0.13	0.11	0.008

TPR Total Production Rate in mg/kg/h, PR production rate, PRd direct production rate.

FCR Fractional catabolic rate in h^{-1} , CR, conversion rate in h^{-1}

Cf. methods and supplementary figure 1 for more explanation on the model used for rate constant calculations.

Figure 1

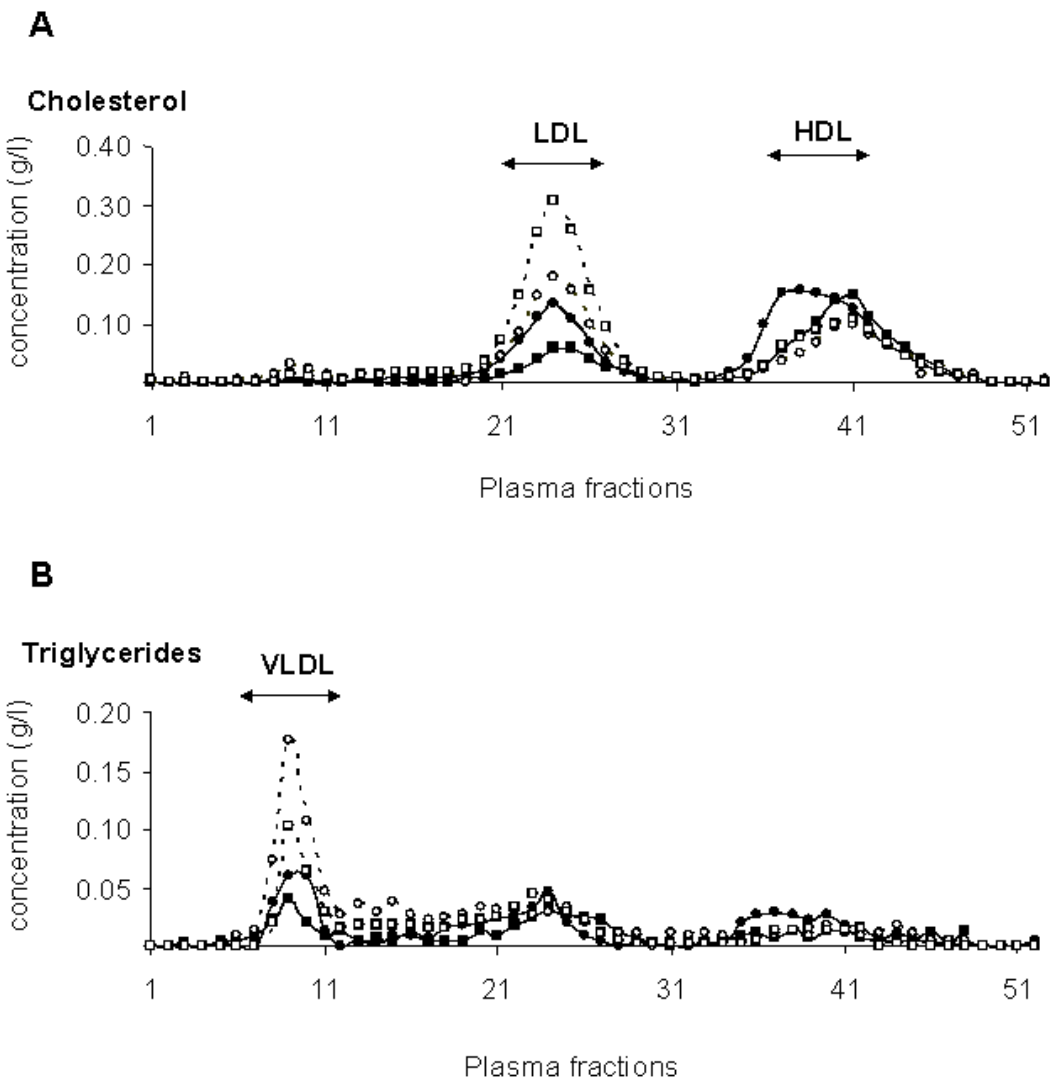


Figure 2

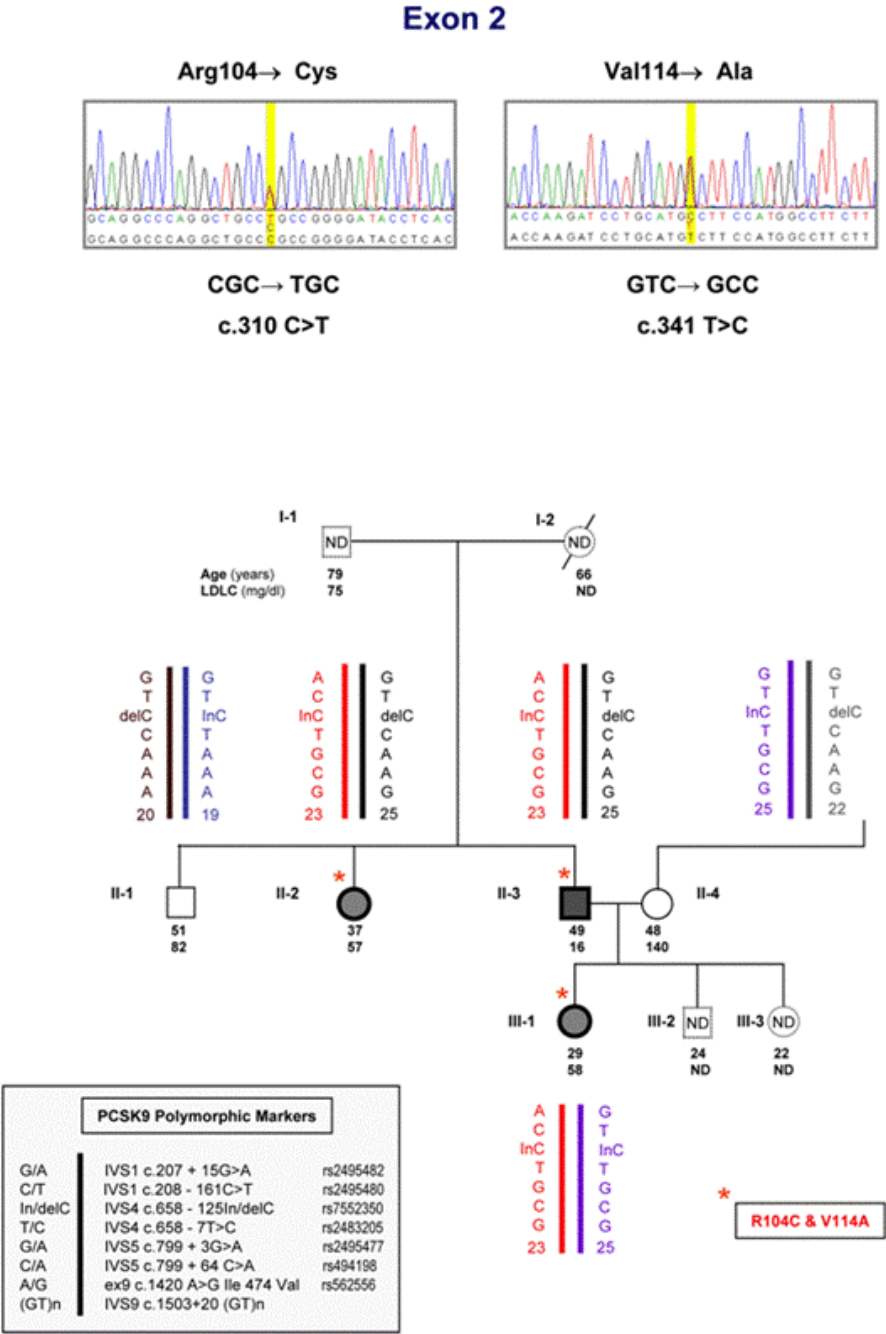


Figure 3

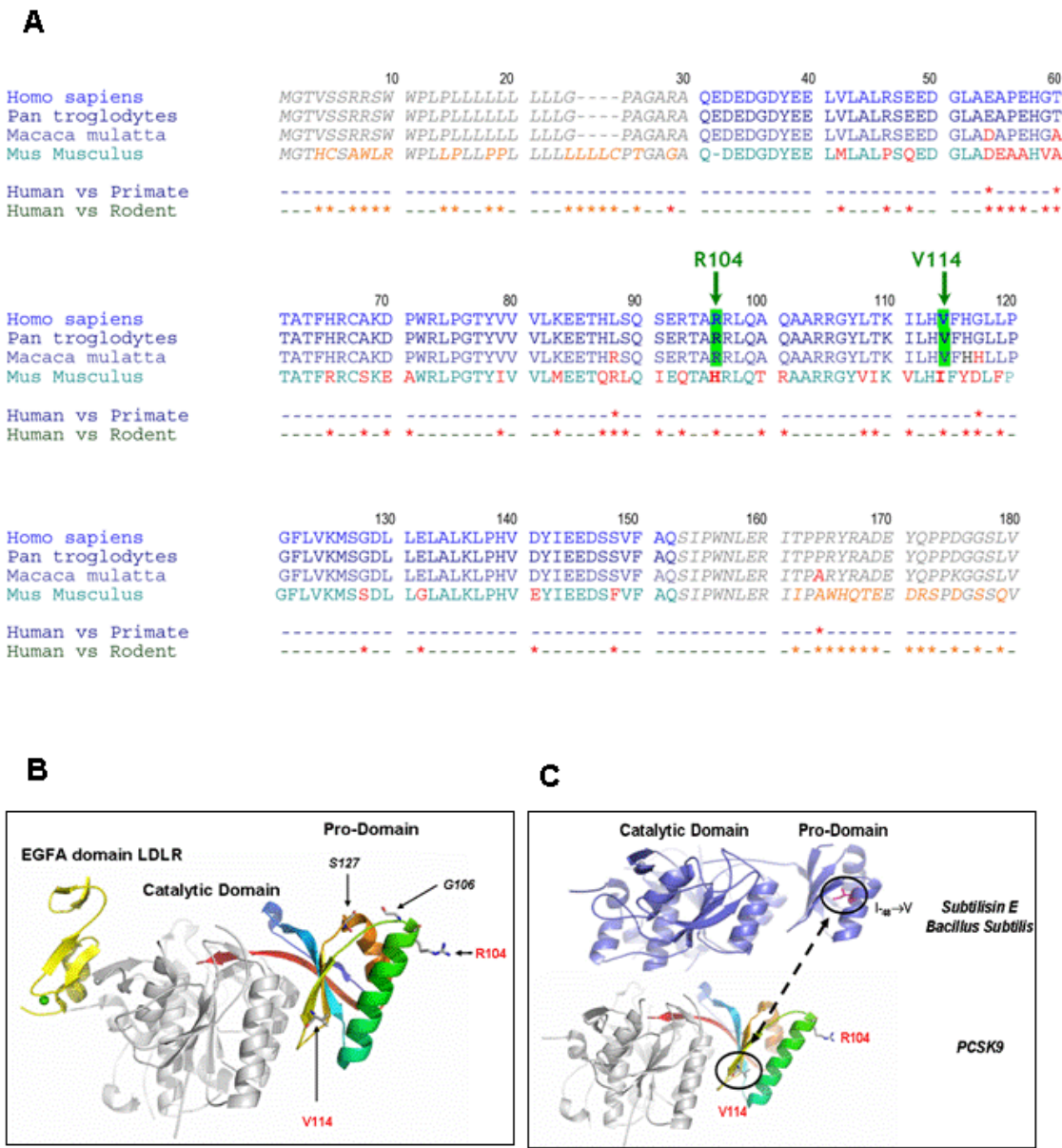
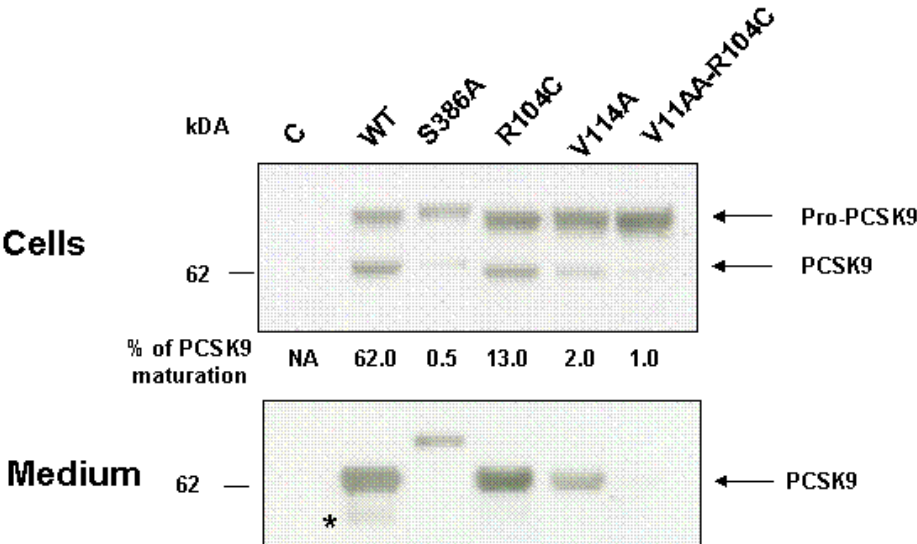
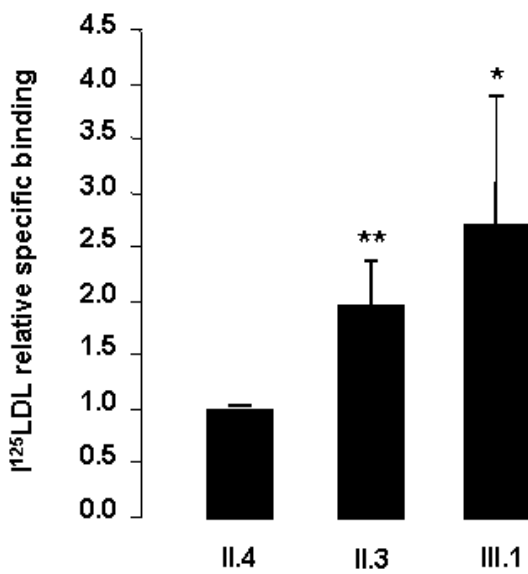


Figure 4



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 5



Perspectives et conclusion générale

Au travers des différentes études exposées dans cette thèse, nous avons pu aborder différents aspects liés à PCSK9 (i) l'étude des mécanismes de sa régulation par PPAR α , (ii) la quantification de son activité autocatalytique endogène, (iii) la caractérisation de son expression dans des modèles animaux de maladies métaboliques liés à l'insuline. Ces travaux peuvent être mis en perspective avec les stratégies d'inhibition de PCSK9 actuellement développées.

Une des stratégies vise à inhiber la synthèse de la protéine PCSK9 en agissant sur la transcription du gène ou sur la dégradation des ARNm. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce point grâce à l'étude de la répression de PCSK9 par PPAR α . Les résultats obtenus nous ont permis de « disséquer » le mécanisme par lequel les fibrates régulent PCSK9 et de mettre ainsi en évidence une inhibition du promoteur de PCSK9 et l'activation de la furine et PC5/6A -deux pro-protéines convertases inactivant PCSK9-. Au delà de PCSK9, cette étude a également permis d'identifier une nouvelle famille d'enzymes régulée par les fibrates : les proprotéines convertases, et ouvrir de nouvelles perspectives quant au rôle de PPAR α dans le métabolisme des lipides. *In vitro* cette inhibition de PCSK9 par les fibrates se traduit par une amplification de l'efficacité des statines de 30%. Sans en constituer une preuve directe, cela suggère que l'administration concomitante de statine et de fibrates devrait avoir un effet bénéfique sur la baisse du LDL-c via une diminution des concentrations circulantes de PCSK9. Cependant, en clinique les effets des fibrates sur le cholestérol restent souvent limités et l'association aux statines ne révèle pas d'effet additif spectaculaire. Nous proposons l'hypothèse qu'il existe *in vivo* un mécanisme inhibiteur de l'effet des fibrates sur le LDL-c. Identifier celui-ci, est une des perspectives qu'ouvre cette thèse.

J'ai également exposés ici une autre étude à laquelle j'ai participé (cf. page 114). Il s'agit de la répression de PCSK9 par un autre récepteur nucléaire : FXR (Langhi *et al.*, 2008). Cette étude montre tout comme pour la répression par PPAR α , une diminution de l'expression de PCSK9 ainsi qu'une potentialisation de l'effet des statines sur l'activité du LDLR *in vitro* (cf. *schéma de la régulation de PCSK9 Figure 26*).

L'utilisation des acides nucléiques pour inhiber la synthèse de PCSK9 semble prometteuse. En effet, une première étude basée sur l'injection d'oligonucléotides anti-sens, ciblant spécifiquement PCSK9, chez des souris hypercholestérolémiques, montre une diminution de 38% et 57 % respectivement de la concentration plasmatique en LDL-c et cholestérol total (Graham *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente menée chez des primates -non humains- où l'inhibition de plus de 70% du transcrit de PCSK9 par des SiRNA était associée à une réduction de 60% de la concentration en LDL-c (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2008).

Récemment il a également été mis en évidence par une autre équipe une diminution de l'expression de PCSK9 (ARNm et protéine) par la berbérine (Cameron *et al.*, 2008). Il s'agit d'une molécule connue pour ses propriétés anti-adipogénique et inhibitrice de la synthèse lipidique (*cf. schéma de la régulation de PCSK9 Figure 26*). Le mécanisme de répression de PCSK9 n'est cependant pas décrit dans cette étude.

Nos travaux sur la caractérisation de l'activité autocatalytique de PCSK9 sont à mettre en perspective avec la stratégie d'inhibition de l'autoclivage, qui devrait se traduire par une absence d'interaction avec le LDLR. Nous avons dans un premier temps validé un test de mesure de l'activité autocatalytique de PCSK9 par divers méthodes : (i) utilisation d'hépatocytes de souris invalidées pour PCSK9, (ii) ou d'hépatocytes humains traités par des Si-RNA dirigés contre PCSK9 (iii) validation de la spécificité du site de clivage par MALDI TOF. Par la suite, nous avons fait une démonstration d'application de ce test sur des variants de PCSK9 (F216L, D374Y, S386A, S127R). La structure cristallographique montre que PCSK9 et son prodomaine restent liés l'un à l'autre de manière non covalente et sont sécrétés ensemble. L'extrémité C-terminale du prodomaine bloquerait l'accès à un quelconque substrat de PCSK9 au site catalytique (Piper *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2007). Or, nous sommes parvenus à détecter une activité autocatalytique de PCSK9 dans le milieu de culture des cellules. Les analyses par western blot excluent qu'une quantité appréciable de proPCSK9 soit sécrétée par la cellule ou « relarguée » par les cellules mortes. Ce résultat suggère donc que le prodomaine de l'enzyme est plus flexible que prévu. Est-ce le cas *in vivo* ? Malheureusement notre test ne semble pas spécifique à PCSK9 lorsqu'il est appliqué au plasma et nous ne pouvons donc répondre à la question. La stratégie d'inhibition de l'autoclivage de proPCSK9 implique l'emploi de drogues pénétrant dans le réticulum endoplasmique via la voie endocytotique ou de sécrétion rétrograde. Elle n'apparaît donc pas comme la plus simple.

Une autre stratégie thérapeutique vise à prévenir l'interaction de PCSK9 avec le LDLR et vise essentiellement la forme circulante. Après la découverte de l'effet chaperonne de PCSK9 sur le LDLR, cette stratégie est apparue comme la plus rationnelle. Une étude publiée récemment propose l'utilisation de peptides synthétiques de l'EGF-A pour inhiber la liaison de PCSK9 au LDLR et *a fortiori* diminuer la dégradation de ce dernier (Shan *et al.*, 2008).

D'autres stratégies existent, qui ne font pour l'instant pas l'objet de publications, par exemple l'emploi d'anticorps dirigés contre PCSK9 neutralisant la protéine dans le plasma.

En conclusion, les résultats exposés dans ce manuscrit nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la transcription de PCSK9 et d'identifier des répresseurs du gène. Nous avons également mis en évidence un rôle central de PPAR α dans

la régulation des PCs impliquées dans le métabolisme des lipides. Enfin nous avons pour la première fois démontré que l'activité autocatalytique de PCSK9 d'origine intracellulaire ou sécrétée pouvait être mesurée grâce à un peptide fluorogénique correspondant au site de clivage naturel de pro-PCSK9. De nombreuses questions demeurent, en particulier *in vivo*, quelles sont les contributions relatives des formes intracellulaires et circulantes de PCSK9 à la dégradation du LDLR? En relation avec la présence de PCSK9 dans le cerveau, la déficience totale de PCSK9 est-elle profitable à long terme, chez le sujet âgé ? PCSK9 influence-t-elle sur la sensibilité aux virus qui utilisent le LDLR comme « porte d'entrée » dans le foie ? Reste une énigme : pourquoi l'évolution a-t-elle sélectionné PCSK9 ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, and Boileau C (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, **34**, 154-156.
2. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, and Konrad RJ (2007) Serum Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Is Correlated Directly with Serum LDL Cholesterol. *Clin Chem*, **53**, 1814-1819.
3. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, Trillard M, Devillers M, Luc G, Krempf M, Reznik Y, Girardet JP, Fredenrich A, Junien C, Varret M, Boileau C, Benlian P, and Rabes JP (2005) Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, **26**, 497.
4. Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F, and Thomas G (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J*, **16**, 1508-1518.
5. Aranda A and Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, **81**, 1269-1304.
6. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, and Staels B (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 717-726.
7. Beckett D (2001) Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *Journal of Molecular Biology*, **314**, 335-352.
8. Bedi M, Niesen M, and Lopez D (2008) Inhibition of squalene synthase upregulates PCSK9 expression in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **470**, 116-119.
9. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie AD, Rader DJ, Boileau C, Brissette L, Chretien M, Prat A, and Seidah NG (2004) NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: ZYMOGEN CLEAVAGE AND EFFECTS ON THE LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) RECEPTOR AND LDL CHOLESTEROL. *J Biol Chem*, **279**, 48865-48875.
10. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, and Seidah NG (2006) The Proprotein Convertase (PC) PCSK9 Is Inactivated by Furin and/or PC5/6A: FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF NATURAL MUTATIONS AND POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS. *J Biol Chem*, **281**, 30561-30572.
11. Berge KE, Ose L, and Leren TP (2006) Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
12. Brown MS and Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**, 34-47.

13. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, and Hayden MR (2006) Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*, **116**, 1052-1062.
14. Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, and Leren TP (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*.
15. Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, Leren TP, and Berge KE (2008) Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis*.
16. Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, Zhang Y, Staybrook KR, Suen C, Otto KA, Miller AR, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan TP, Jiang XC, Burris TP, Eacho PI, and Etgen GJ (2003) Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 1131-1136.
17. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, and Staels B (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*, **7**, 53-58.
18. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, and Hobbs HH (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, **37**, 161-165.
19. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., and Hobbs HH (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, **354**, 1264-1272.
20. Costantini C, Ko MH, Jonas MC, and Puglielli L (2007) A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J*, **407**, 383-395.
21. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, Staels B, and Krempf M (2006) Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*, **281**, 6211-6218.
22. Costet P, Krempf M, and Cariou B (2008) PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*, **33**, 426-434.
23. Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, and Pineau T (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem*, **273**, 29577-29585.
24. Costet P, Luo Y, Wang N, and Tall AR (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*, **275**, 28240-28245.
25. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, and Qiu X (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 413-419.

26. Desvergne B and Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**, 649-688.
27. Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, and Mayne J (2008) PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J*, **275**, 3480-3493.
28. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, and Prat A (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1454-1459.
29. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, and Fazio S (2008) Self-Association of Human PCSK9 Correlates with Its LDLR-Degrading Activity. *Biochemistry*, **47**, 1631-1639.
30. Fasano T, Cefalu AB, Di LE, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L, Valenti V, Bonardi R, Guardamagna O, Averna M, and Tarugi P (2007) A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 677-681.
31. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, Butler D, Charisse K, Dorkin R, Fan Y, Gamba-Vitalo C, Hadwiger P, Jayaraman M, John M, Jayaprakash KN, Maier M, Nechev L, Rajeev KG, Read T, Rohl I, Soutschek J, Tan P, Wong J, Wang G, Zimmermann T, de Fougerolles A, Vornlocher HP, Langer R, Anderson DG, Manoharan M, Kotliansky V, Horton JD, and Fitzgerald K (2008) Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 11915-11920.
32. Frohnert BI, Hui TY, and Bernlohr DA (1999) Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem*, **274**, 3970-3977.
33. Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, and Staels B (1999) Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol*, **13**, 400-409.
34. GOFMAN JW, LINDGREN FT, and ELLIOTT H (1949) Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem*, **179**, 973-979.
35. Goto D, Okimoto T, Ono M, Shimotsu H, Abe K, Tsujita Y, and Kuwano M (1997) Upregulation of low density lipoprotein receptor by gemfibrozil, a hypolipidemic agent, in human hepatoma cells through stabilization of mRNA transcripts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2707-2712.
36. Gotto AM, Jr., Pownall HJ, and Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*, **128**, 3-41.
37. Govindan MV, Devic M, Green S, Gronemeyer H, and Chambon P (1985) Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, **13**, 8293-8304.

38. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, and Kuipers F (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, **277**, 34182-34190.
39. Grozdanov PN, Petkov PM, Karagyozev LK, and Dabeva MD (2006) Expression and localization of PCSK9 in rat hepatic cells. *Biochem Cell Biol*, **84**, 80-92.
40. Grundy SM and Vega GL (1987) Fibric acids: effects on lipids and lipoprotein metabolism. *Am J Med*, **83**, 9-20.
41. Grundy SM, Vega GL, Yuan Z, Battisti WP, Brady WE, and Palmisano J (2005) Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). *Am J Cardiol*, **95**, 462-468.
42. Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ, Turpin G, and Chapman MJ (1996) Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **16**, 763-772.
43. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, and Spraggon G (2007) The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 14604-14609.
44. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, and Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **318**, 635-641.
45. Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, and Grimaldi PA (2003) Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, **1633**, 43-50.
46. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, and Burnett JR (2007) The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*, **193**, 445-448.
47. Horton JD, Goldstein JL, and Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**, 1125-1131.
48. Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2007) Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, **32**, 71-77.
49. Huang Z, Zhou X, Nicholson AC, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, and Han J (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *Br J Pharmacol*, **155**, 596-605.
50. Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, and Groop L (2001) The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia*, **44**, 1148-1154.
51. JACOBSON HI, GUPTA GN, FERNANDEZ C, HENNIX S, and JENSEN EV (1960) Determination of tritium in biological material. *Arch Biochem Biophys*, **86:89-93.**, 89-93.

52. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, and Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, **383**, 728-731.
53. Jin W, Wang X, Millar JS, Quertermous T, Rothblat GH, Glick JM, and Rader DJ (2007) Hepatic Proprotein Convertases Modulate HDL Metabolism. *Cell Metabolism*, **6**, 129-136.
54. Jonas MC, Costantini C, and Puglielli L (2008) PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep*, **9**, 916-922.
55. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesaniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, and Laakso M (2005) Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*, **366**, 1849-1861.
56. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, and Hobbs HH (2006) A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*, **78**, 410-422.
57. Kourimate S, Le May C, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, Nguyen P, Krempf M, Cariou B, and Costet P (2008) Dual Mechanisms for the Fibrate-mediated Repression of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *J Biol Chem*, **283**, 9666-9673.
58. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, and Deisenhofer J (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 1820-1825.
59. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, and Horton JD (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*, **116**, 2995-3005.
60. Lalanne F, Lambert G, Amar MJ, Chetiveaux M, Zair Y, Jarnoux AL, Ouguerram K, Friburg J, Seidah NG, Brewer HB, Jr., Krempf M, and Costet P (2005) Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res*, **46**, 1312-1319.
61. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, Patel S, Sullivan DR, Cohn JS, Rye KA, and Barter PJ (2008) Plasma PCSK9 Concentrations Correlate with LDL and Total Cholesterol in Diabetic Patients and Are Decreased by Fenofibrate Treatment. *Clin Chem*, **54**, 1038-1045.
62. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, Krempf M, and Costet P (2006) Fasting Induces Hyperlipidemia in Mice Overexpressing Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9: Lack of Modulation of Very-Low-Density Lipoprotein Hepatic Output by the Low-Density Lipoprotein Receptor. *Endocrinology*, **147**, 4985-4995.
63. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, and Cariou B (2008) Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Letters*, **582**, 949-955.

64. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, Suen KF, Trauger JW, Spraggon G, Lesley SA, Liao G, Yowe D, and Harris JL (2007) Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J*, **406**, 203-207.
65. Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, and Grimaldi PA (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J*, **17**, 2299-2301.
66. Lusson J, Benjannet S, Hamelin J, Savaria D, Chretien M, and Seidah NG (1997) The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem J*, **326**, 737-744.
67. Maxwell KN and Breslow JL (2004) Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7100-7105.
68. Maxwell KN, Fisher EA, and Breslow JL (2005) Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2069-2074.
69. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, and Breslow JL (2003) Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*, **44**, 2109-2119.
70. Mayer G, Hamelin J, Asselin MC, Pasquato A, Marcinkiewicz E, Tang M, Tabibzadeh S, and Seidah NG (2008) The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J Biol Chem*, **283**, 2373-2384.
71. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kaefer N, Gyamera-Acheampong C, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, and Ooi TC (2007) Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**, 451-456.
72. McNutt MC, Lagace TA, and Horton JD (2007) Catalytic Activity Is Not Required for Secreted PCSK9 to Reduce Low Density Lipoprotein Receptors in HepG2 Cells. *J Biol Chem*, **282**, 20799-20803.
73. McPherson R and Gauthier A (2004) Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol*, **82**, 201-211.
74. Nakayama K (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*, **327**, 625-635.
75. Naoumova RP, Tosi I, Patel D, Neuwirth C, Horswell SD, Marais AD, van HC, and Soutar AK (2005) Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2654-2660.

76. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, DiStefano PS, Wood A, and Bingham B (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*, **420**, 55-67.
77. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, and Krempf M (2004) Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1448-1453.
78. Owen GI and Zelent A (2000) Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 809-827.
79. Pandit S, Wisniewski D, Santoro JC, Ha S, Ramakrishnan V, Cubbon RM, Cummings RT, Wright SD, Sparrow CP, Sitlani A, and Fisher TS (2008) Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **49**, 1333-1343.
80. Park SW, Moon YA, and Horton JD (2004) Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol Chem*, **279**, 50630-50638.
81. Peet DJ, Janowski BA, and Mangelsdorf DJ (1998) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 571-575.
82. Piper DE, Jackson S, Liu Q, Romanow WG, Shetterly S, Thibault ST, Shan B, and Walker NPC (2007) The Crystal Structure of PCSK9: A Regulator of Plasma LDL-Cholesterol. *Structure*, **15**, 545-552.
83. Pisciotto L, Oliva CP, Cefalu AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Patel D, Averna M, Tarugi P, Calandra S, and Bertolini S (2005) Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*.
84. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, and Seidah NG (2008) The Proprotein Convertase PCSK9 Induces the Degradation of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and Its Closest Family Members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*, **283**, 2363-2372.
85. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, Wang X, Beyer TP, Bensch WR, Li W, Ehsani ME, Lu D, Konrad RJ, Eacho PI, Moller DE, Karathanasis SK, and Cao G (2007) Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*, **48**, 1488-1498.
86. Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagate A, He J, Perdomo G, Tse T, Jiang Y, and Dong HH (2007) PPAR α mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E421-E434.
87. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, and Horton JD (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5374-5379.
88. Robyr D, Wolffe AP, and Wahli W (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol*, **14**, 329-347.

89. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, and Deisenhofer J (2002) Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*, **298**, 2353-2358.
90. Scamuffa N, Calvo F, Chretien M, Seidah NG, and Khatib AM (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J*, **20**, 1954-1963.
91. Schmidt RJ, Zhang Y, Zhao Y, Qian YW, Wang H, Lin A, Ehsani ME, Yu X, Wang G, Singh J, Su EW, Li S, Konrad RJ, and Cao G (2008a) A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *DNA Cell Biol*, **27**, 183-189.
92. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, and Cao G (2008b) Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **370**, 634-640.
93. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, and Auwerx J (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, **270**, 19269-19276.
94. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, and Chretien M (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 928-933.
95. Seidah NG, Khatib AM, and Prat A (2006) The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol Chem*, **387**, 871-877.
96. Seidah NG and Prat A (2007) The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*, **85**, 685-696.
97. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, and Prat A (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**, 1111-1125.
98. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, and Hedrick JA (2008) PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **375**, 69-73.
99. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, and Fruchart JC (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, **98**, 2088-2093.
100. Staels B and Fruchart JC (2005) Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, **54**, 2460-2470.
101. Sullivan MP, Cerda JJ, Robbins FL, Burgin CW, and Beatty RJ (1993) The gerbil, hamster, and guinea pig as rodent models for hyperlipidemia. *Lab Anim Sci*, **43**, 575-578.
102. Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, and Soutar AK (2005) Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*, **14**, 1161-1169.

103. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, and Adeli K (2000) Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction in Insulin Resistance. EVIDENCE FOR ENHANCED LIPOPROTEIN ASSEMBLY, REDUCED INTRACELLULAR ApoB DEGRADATION, AND INCREASED MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN A FRUCTOSE-FED HAMSTER MODEL. *J Biol Chem*, **275**, 8416-8425.
104. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, Skolnick MH, Hopkins PN, Hunt SC, and Shattuck DM (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*, **114**, 349-353.
105. Troisieme rapport du NCEP (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*, **106**, 3143.
106. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, and Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, **113**, 159-170.
107. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, and Clarke SD (1999) Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*, **274**, 23577-23583.
108. Yoshikawa T, Shimano H, memiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, and Yamada N (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol*, **21**, 2991-3000.
109. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, and Prat A (2008) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*, **48**, 646-654.
110. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, and Hobbs HH (2008) Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 0806312105.
111. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2007) Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to Epidermal Growth Factor-like Repeat A of Low Density Lipoprotein Receptor Decreases Receptor Recycling and Increases Degradation. *J Biol Chem*, **282**, 18602-18612.
112. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2006) Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*, **79**, 514-523.
113. Zhong M, Benjannet S, Lazure C, Munzer S, and Seidah NG (1996) Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Lett*, **396**, 31-36.

114. Zhou A, Webb G, Zhu X, and Steiner DF (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem*, **274**, 20745-20748.

PCSK9 : régulation et implication dans le syndrome métabolique

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) est une serine protéase, jouant un rôle important dans la régulation des niveaux de cholestérol circulant. Les mutations gains de fonctions de *PCSK9* sont associées à une hypercholestérolémie autosomale dominante due à une élévation des concentrations en Low Density Lipoprotein associées au cholestérol (LDLc). A l'inverse, des mutations perte de fonction de *PCSK9*, sont associées à une diminution de ces concentrations et à une réduction de 88% du risque d'apparition de maladies coronariennes. Dans le réticulum endoplasmique, Pro-PCSK9 subit un autoclivage indispensable à sa maturation et à sa sécrétion. *PCSK9* circulante se lie au domaine EGF-A du récepteur aux LDL (LDLR) et entraîne sa dégradation lysosomale. Tout comme le *LDLR*, *PCSK9* est positivement régulé par les statines via le Sterol Responsive element Binding Protein -2 (SREBP2). Les statines sont très utilisées en clinique pour leurs effets hypocholestérolémiants, ajouter des inhibiteurs de *PCSK9* pourrait améliorer leur efficacité.

Le premier objectif a été de caractériser la régulation négative de *PCSK9* par le récepteur nucléaire Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (PPAR α) et ses agonistes synthétiques : les fibrates. Les résultats obtenus *in vitro* sur des lignées d'hépatocytes humains révèlent que l'activation de PPAR α réprime la transcription de *PCSK9* -via une répression de son promoteur- supprime son activation par les statines, et potentialise l'effet des statines sur l'activité du LDLR. De plus, ces résultats révélèrent que la furine et PC5/6A - deux protéines convertases qui dégradent *PCSK9*- sont également régulées positivement par PPAR α . Au-delà de *PCSK9*, cette étude a permis d'identifier une nouvelle famille d'enzyme régulée par les fibrates : les pro-protéines convertases.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a porté sur la mise au point d'un test fluorométrique de dosage de l'activité autocatalytique de *PCSK9*. La spécificité de notre approche a été de considérer non pas la protéine recombinante purifiée, qui semble dépourvue d'activité pour une raison inconnue, mais la forme endogène des hépatocytes. Après avoir validé ce test sur des hépatocytes primaires de souris *PCSK9*^{-/-}, je l'ai appliqué à l'étude de divers mutants de *PCSK9*.

Enfin, suite aux travaux du laboratoire sur la régulation de *PCSK9* par l'insuline, j'ai également caractérisé l'expression de *PCSK9* dans divers modèles animaux de diabète et d'insulinorésistance.

PCSK9 est une cible thérapeutique sérieuse pour diminuer le LDL-c. D'après ces résultats, l'inhibition transcriptionnelle de *PCSK9* par les fibrates semble être très prometteuse. Cependant, en clinique les fibrates sont préférentiellement utilisés pour leurs propriétés hypotriglycéridémiantes, puisque leurs effets sur le cholestérol restent limités. Existerait-il *in vivo* un mécanisme inhibiteur de cette voie? L'identifier serait une des perspectives qu'ouvre cette thèse.

Mots clés : *PCSK9*, *LDLR*, *Hypercholestérolémie familiale*, *PPAR α* , *Proprotéines convertases*, *fibrates*, *hépatocytes primaires*.

PCSK9: regulation and implication in the metabolic syndrome

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) is a member of the serine protease family. Gain of function mutations within *PCSK9* are associated with dominant forms of familial hypercholesterolemia. Inversely, humans harbouring loss of function mutations have a significant plasma LDLc reduction and a 88% decrease of the risk of coronary heart disease. In the endoplasmic reticulum Pro-*PCSK9* undergoes an autocatalytic cleavage that is crucial for its secretion. Then, this secreted protein binds to the EGF-A domain of the LDLR and targets it to the lysosomes rather than to the cell surface.

Both *PCSK9* and the *LDLR* are up-regulated by statins via SREBP2. Using *PCSK9* inhibitors may optimize the effects of this hypocholesterolemic drug.

The first aim of my thesis was to investigate *in vitro* the mechanisms of *PCSK9* repression by the fibrates which are PPAR α synthetic agonists. Activation of PPAR α down-regulates *PCSK9* transcription at the promoter level and increase the expression of two others Proprotein convertases: furin and PC5/6A which are known to degrade *PCSK9*. Fibrates counteracts *PCSK9* induction by statins and amplifies the effects of this hypocholesterolemic drugs on the LDLR activity.

The second part of my studies was based on measuring the endogenous cleavage activity of *PCSK9*, using a fluorogenic peptide corresponding to the cleavage site of Pro-*PCSK9*. After validation of the specificity of this assay on mice primary hepatocytes from *PCSK9*^{-/-}, I applied it to the test of several *PCSK9* variants.

The final part of my studies dealt about the characterisation of *PCSK9* expression in diabetic and insulin resistant animal models.

PCSK9 is an attractive therapeutic target for lowering plasma LDLc levels. This study clearly showed that *PCSK9* transcriptional inhibition by fibrates might be envisaged in combination with statins. However, *in vivo*, in humans, the fibrates are rather known for their hypotriglyceridemic properties. The limited effect of fibrates on lowering LDLc might be explained by a counteracting pathway. Identifying this pathway is one of the promising perspectives of this thesis.

Key words: *PCSK9*, *LDLR*, *Familial hypercholesterolemia*, *PPAR α* , *Proprotein convertases*, *fibrates*, *primary hepatocytes*.

Sanae KOURIMATE

INSERM U915-CHU Hotel Dieu- 3ème Nord, 1. pl. Alexis Ricordeau, 44093 Nantes