

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2009

N°151

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Endocrinologie, Diabétologie et Maladies

Métaboliques

par

Isabelle BENOIT

Née le 12 juillet 1979 à CHAUMONT

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2009

**Les mutations « perte de fonction » de PCSK9 : une
nouvelle cause d'hypobétalipoprotéinémie familiale.**

Analyse de 3 cas

Président : Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Bertrand
CARIOU

COMPOSITION DU JURY

Président du jury :

Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU

Membres du jury

Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU

Monsieur le Professeur Michel KREMPF

Madame le Docteur Lucy CHAILLOUS

Monsieur le Docteur Philippe COSTET

ABBREVIATIONS

Ac: Anticorps

ABCA1: ATP binding cassette A1

ADH : Autosomal Dominant Hypercholesterolemia

AG : Acide gras

ApoA/ apoB: Apolipoprotéine A/ apolipoprotéine B

CETP: Cholesterol Ester Transfert Protein

CT: cholestérol total

ER-ERGIC: Endoplasmic Reticulum-Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate
Compartment

HDL: High Density Lipoprotein

HMGCoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A

HSPG: Heparanes sulfates protéoglycanes

IRM: Imagerie par résonance magnétique

KO: Knock-Out

LCAT: Lecithine Cholestérol Acyl Transférase

LDL: Low Density Lipoprotein

LDLC: LDL cholestérol

LDLR: LDL-Récepteur

LH : Lipase Hépatique

LP : Lipoprotéine

LPL : Lipoprotéine Lipase

MTP: Microsomal Triglyceride transfer Protein

NARC-1: Neural Apoptosis Regulated Convertase-1

PPAR: Peroxysome proliferator-activated receptor

PCSK9: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9

PLTP: Phospholipid Transfert Protein

SRE: Sterol Regulatory Element

SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Proteins

TG: Triglycéride

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

SOMMAIRE

I.	Table des figures	5
II.	Table des tableaux	5
III.	Introduction: rappel sur le métabolisme des lipoprotéines	7
	1. Structure et classification des lipoprotéines (LP)	7
	a. Composition générale.....	7
	b. Les apolipoprotéines.....	7
	c. Classification des LP.....	9
	2. Métabolisme des LP	10
	a. Acteurs.....	11
	b. Métabolisme des LP riches en TG	12
	i. Les chylomicrons.....	12
	ii. Les VLDL.....	13
	c. Voie de retour du cholestérol.....	14
	Hypobétalipoprotéinémies primaires (HBL)	17
	1. Abétalipoprotéinémie (ABL) (OMIM 200100)	19
	2. La maladie de rétention des chylomicrons (CRD) (OMIM 246700) ou maladie d'Anderson	21
	3. Hypobétalipoprotéinémie familiale (FHBL) (OMIM 107730)	22
IV.	PCSK9	24
	1. PCSK9 : nature et fonction	24
	a. Structure et expression de PCSK9	24
	b. PCSK9 et métabolisme des LDL.....	26
	i. PCSK9 : un inhibiteur endogène du LDLR.....	26
	ii. Mécanisme d'action	29
	c. Action sur la production hépatique des VLDL	30
	d. Régulation de l'expression de PCSK9	30
	2. PCSK9 et niveau de cholestérol : les données cliniques	32
	a. PCSK9 et hypercholestérolémie	33
	b. PCSK9 et hypocholestérolémie.....	33

c.	<i>PCSK9 et maladies cardio-vasculaires.....</i>	34
d.	<i>PCSK9 et hypobétalipoprotéinémie</i>	35
e.	<i>Dosage circulant de PCSK9 et corrélation clinique.....</i>	35
V.	<i>Cas cliniques</i>	37
1.	<i>Cas n°1</i>	37
a.	<i>Présentation clinique</i>	37
b.	<i>Bilan lipidique</i>	39
c.	<i>Analyse génétique</i>	41
d.	<i>Analyses cellulaire et moléculaire.....</i>	43
2.	<i>Cas n°2</i>	47
a.	<i>Présentation clinique</i>	47
b.	<i>Bilan lipidique et analyse génétique</i>	48
3.	<i>Cas n° 3</i>	49
a.	<i>Présentation clinique</i>	49
b.	<i>Bilan lipidique et analyse génétique</i>	50
VI.	<i>Discussion.....</i>	51
1.	<i>Aspect génétique.....</i>	51
a.	<i>Cas n°1 et impact sur le métabolisme du CL.....</i>	51
b.	<i>Cas n°2 et 3.....</i>	53
2.	<i>Mutation perte de fonction de PCSK9 et comorbidités.....</i>	53
a.	<i>Atteinte hépatique, malabsorption et HBL</i>	53
b.	<i>Atteinte cardiovasculaire et HBL.....</i>	54
c.	<i>PCSK9 et maladies neurodégénératives.....</i>	55
3.	<i>PCSK9 et diabète</i>	55
VII.	<i>Conclusion</i>	58
VIII.	<i>Bibliographie</i>	60

ANNEXE

I. Table des figures

Figure 1: Représentation schématique d'une lipoprotéine.....	7
Figure 2 : Principales apolipoprotéines et leurs fonctions.....	8
Figure 3 : Composition chimique des LP	10
Figure 4 : Schéma général du métabolisme des LP riches en TG.....	12
Figure 5 : Voie exogène.....	13
Figure 6 : Voie endogène	14
Figure 7 : Voie de retour du CL	15
Figure 8 : Schéma général du transport du cholestérol.....	16
Figure 9 : Maturation de PCSK9.....	25
Figure 10 : Structure cristallographique de PCSK9	25
Figure 11 : Synthèse et rôle du LDLR	27
Figure 12 : Liaison LDLR et PCSK9	27
Figure 13: Effets de PCSK9 sur le LDLR.....	28
Figure 14: Régulation de PCSK9.....	32
Figure 15: Principales mutations gain ou perte de fonction	32
Figure 16: Arbre généalogique	40
Figure 17: Mutations R104C et V114A	41
Figure 18 : Structure cristallographique et localisation des 2 mutations	42
Figure 19 : Analyse génétique dans la famille	43
Figure 20 : Western-blot sur les lysats cellulaires.....	45
Figure 21 : Western-blot sur les milieux de culture.....	45
Figure 22 : Effets des mutations sur la forme sauvage de PCSK9	46
Figure 24 : Arbre généalogique	48
Figure 25 : Arbre généalogique	50

II. Table des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des FHBL	18
Tableau 2 : Données biologiques initiales	38
Tableau 3 : Vitamines liposolubles et échographie hépatique.....	39
Tableau 4 : Analyses biologiques du propositus et de sa famille.....	40
Tableau 5 : Analyses biologiques	47

Tableau 6 : Vitamines liposolubles et échographie hépatique	48
Tableau 7 : Analyses biologiques	50

III. Introduction: rappel sur le métabolisme des lipoprotéines

1. Structure et classification des lipoprotéines (LP)

a. Composition générale

Les LP assurent le transport plasmatique des lipides, des vitamines liposolubles (A, D, E, K), de certaines hormones et de diverses autres molécules.

Elles sont composées d'un cœur hydrophobe, contenant essentiellement des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol (CL), recouvert en surface par une monocouche amphiphile, constituée principalement de phospholipides (PL), de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines. (Figure 1)

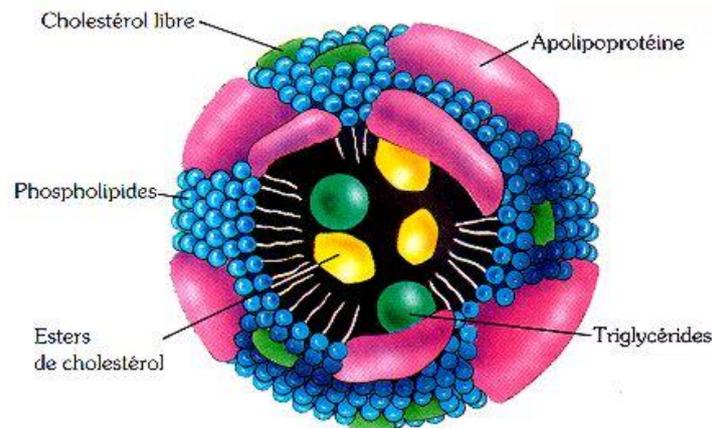


Figure 1: Représentation schématique d'une lipoprotéine

b. Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines assurent la cohésion structurale des LP, mais ce sont aussi des cofacteurs enzymatiques et des ligands de récepteurs spécifiques. Une quinzaine d'apolipoprotéines sont actuellement connues (Figure 2).

L'apolipoprotéine B (apoB) présente plusieurs particularités : contrairement aux autres apolipoprotéines qui sont solubles, l'apoB est très hydrophobe. Elle n'est donc pas échangeable et va rester liée à la même particule pendant tout son parcours métabolique. De plus, un seul exemplaire d'apoB est présent sur une LP

alors qu'il peut y avoir plusieurs apolipoprotéines A, C ou E. Enfin, l'apoB est synthétisée sous forme d'apoB100 dans le foie et d'apoB48 dans l'intestin. Le gène de l'apoB, situé sur le chromosome 2, code pour un ARNm identique dans le foie et l'intestin. Cependant, dans les entérocytes, cet ARNm va subir des modifications post-transcriptionnelles qui vont engendrer la formation d'un codon STOP et conduire à la synthèse de la protéine d'apoB48 ne contenant que les 2152 premiers acides aminés de l'apoB100 (soit 48%). L'apoB est présente dans différentes LP : les VLDL, les IDL, les LDL et tout particulièrement dans les LDL petites et denses. Habituellement, plus de 90 % de la quantité totale d'apoB dans le sang se trouve dans les LDL ; c'est pourquoi il y a une forte corrélation positive entre l'apoB et le LDL cholestérol (LDLC).

L'apolipoprotéine A-I (apoA-I) est l'apolipoprotéine majeure des particules HDL et joue un rôle central dans le transport inverse du CL.

Nom	Distribution	Tissu	Fonctions
A-I	Chylo, HDL	Foie, intestin	Structure Activateur LCAT Efflux cholestérol
B-48	Chylomicrons	Intestin	Structure Synthèse/sécrétion Chylo Ligand B48R
B-100	VLDL, IDL, LDL	Foie	Structure Synthèse/sécrétion VLDL Ligand LDL-R
C-I	Chylo, VLDL	Foie, (intestin)	Inhibiteur CETP
C-II	Chylo, VLDL	Foie, (intestin)	Activateur LPL
C-III	Chylo, VLDL	Foie, (intestin)	Inhibiteur LPL
E	Chylomicrons, VLDL, IDL, HDL	Foie, cerveau, macrophage	Ligand LDL-R et LRP

Figure 2 : Principales apolipoprotéines et leurs fonctions

c. Classification des LP

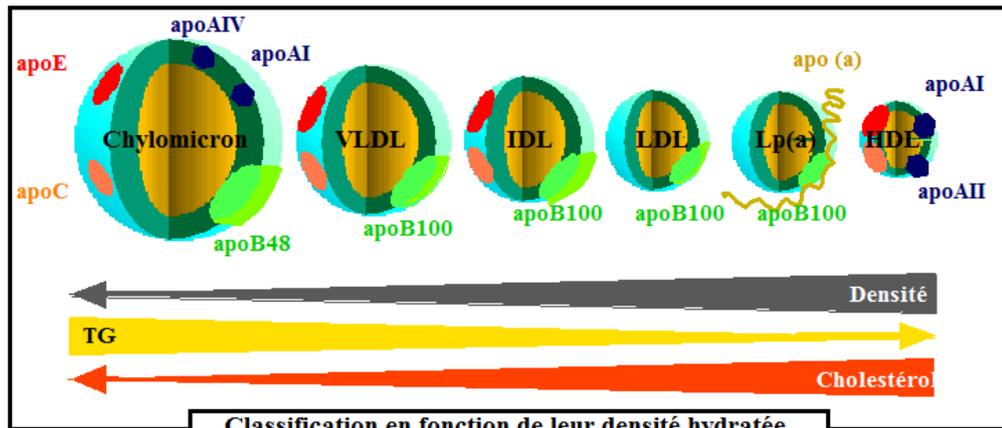
On distingue 5 populations de LP, classées en fonction de leur taille et de leur densité, les LP les moins denses étant les plus riches en TG (Figure 3).

Les *chylomicrons* sont les LP les plus larges, synthétisées par l'entérocyte et transportent les TG d'origine alimentaire.

Les *VLDL* (Very Low Density Lipoprotein) et *IDL* (Intermediate Density Lipoprotein) sont des LP riches en TG. Les VLDL sont sécrétées par l'hépatocyte et contiennent environ 60% de TG d'origine endogène. L'hydrolyse de ces TG va donner naissance aux IDL, des LP de plus petites tailles.

Les *LDL* (Low Density Lipoprotein) représentent le produit final de la cascade métabolique VLDL-IDL-LDL. Elles transportent le CL vers les cellules périphériques. L'internalisation des LDL se fait principalement grâce à la reconnaissance de l'apoB100 par le récepteur aux LDL.

Les *HDL* (High Density Lipoprotein) sont sécrétées par le foie. Elles captent le CL libre au niveau des cellules périphériques via le transporteur ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter A1) et permettent son retour au foie.



	Classification en fonction de leur densité hydratée				
	Chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité g/ml	<1,006	0,95 - 1,006	1,006 – 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,210
Proportion CE/Tg	1/19	1/5	1/3,5	1/0,23	1/0,22
Mobilité électrophorétique	aucune	pré-β	pré-β lent	β	α
Principales apos	B48, E, C	B100, E, C	B100, E, C	B100	AI, AII, C

Figure 3 : Composition chimique des LP

Les LP sont donc des particules dynamiques en constante évolution grâce aux transferts lipidiques et aux échanges d'apolipoprotéines entre elles.

2. Métabolisme des LP

On distingue 3 voies principales dans le métabolisme des LP.

1. L'intestin permet l'absorption des lipides alimentaires qui vont être métabolisés en chylomicrons. Ces particules vont contribuer à la voie exogène ou *voie entéro-hépatique des lipides*.
2. Le foie va synthétiser et sécréter les VLDL, constituant une deuxième voie métabolique, dite *voie endogène*.
3. Enfin, la dernière voie est celle du *transport inverse du cholestérol*, permettant son retour des tissus périphériques vers le foie.

a. Acteurs

Le métabolisme des LP est complexe et fait intervenir différents acteurs dont 3 enzymes principales : la lipoprotéine lipase (LPL), la lipase hépatique (LH) et la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), et 3 protéines de transfert : la cholestérol ester transfert protein (CETP), la phospholipid transfert protein (PLTP) et la microsomal triglycerides transfert protein (MTP).

La *LPL* est synthétisée principalement au niveau du tissu adipeux et du muscle strié. Elle est ensuite sécrétée dans la circulation et se lie aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) situés à la surface des cellules endothéliales capillaires. Elle permet l'hydrolyse des TG des VLDL et des chylomicrons en AGL et en glycérol. Ces AG libérés seront stockés par le tissu adipeux ou utilisés par les tissus périphériques ou bien encore réutilisés pour la synthèse hépatique des VLDL. L'apoCII est un cofacteur essentiel pour l'activité de cette enzyme alors que l'apoCIII en est un inhibiteur.

La *LH*, de structure proche de la LPL, est synthétisée par le foie et va rester liée aux HSPG des cellules endothéliales hépatiques. Elle agit comme une phospholipase, mais hydrolyse également les TG. Elle permet la transformation des IDL en LDL.

La *LCAT*, synthétisée par le foie, va s'associer aux particules HDL circulantes et permettre l'estérification du CL. Son activité participe donc à la constitution du noyau lipidique hydrophobe, transformant les particules pré β HDL en particules α HDL

La *MTP* est une protéine de transfert indispensable pour l'assemblage et la sécrétion des LP riches en TG (chylomicrons et VLDL) puisqu'elle va stabiliser l'apoB à un stade précoce lors de son entrée dans le réticulum endoplasmique.

La *CETP* est une glycoprotéine plasmatique synthétisée dans différents tissus comme le foie, le tissu adipeux et la rate. Elle favorise l'échange de CL estérifié et de TG entre les HDL, les LDL et les LP riches en TG ; ainsi, ceci génère un flux net de CL estérifié des HDL vers les VLDL.

La *PLTP* facilite le transport des phospholipides depuis les LP riches en TG vers les HDL.

b. Métabolisme des LP riches en TG

Les mécanismes de synthèse des chylomicrons par les entérocytes et des VLDL par les hépatocytes présentent des similitudes. L'apoB est incorporée aux LP dans le réticulum endoplasmique sous le contrôle de la MTP. Ces LP vont ensuite subir des étapes de maturation, être sécrétées et soumises à des transformations intravasculaires (Figure 4).

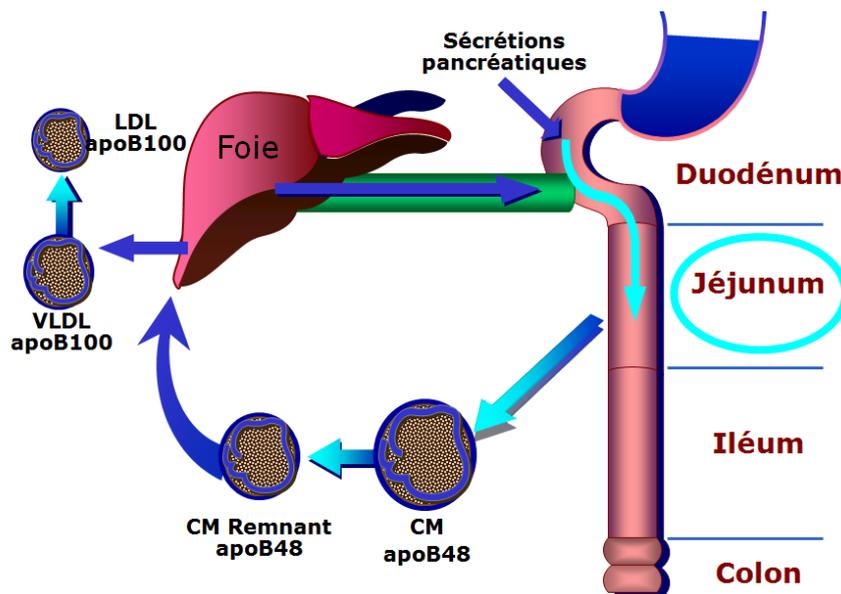


Figure 4 : Schéma général du métabolisme des LP riches en TG

i. Les chylomicrons

En période post-prandiale, les lipides alimentaires sont absorbés au niveau du jéjunum, puis vont être intégrés dans des LP synthétisées au sein de l'entérocyte : les chylomicrons. Ces particules ont une demi-vie très courte, de l'ordre de quelques minutes. Elles sont constituées majoritairement de TG, et contiennent également du CL, des phospholipides, et des apolipoprotéines : apoB48, apoA1 et apoAIV. Elles vont ensuite être sécrétées dans la lymphe mésentérique pour rejoindre la circulation sanguine où elles vont acquérir l'apoE et les apoC1, CII, et CIII à partir d'échange avec les HDL. L'acquisition de l'apoCII permet l'activation de la LPL qui va hydrolyser les chylomicrons et donc libérer des AG, captés par les cellules avoisinantes. Ces étapes conduisent à la formation de chylomicrons de petite taille ayant perdu 90% de leurs TG : les chylomicrons remnants. Ces particules vont être captées par le foie

grâce à la liaison de l'apoE au LRP (LDL-receptor related protein) ou au LDLR (récepteur des LDL) puis vont être dégradés. Le cholestérol libéré sera alors intégré dans de nouvelles lipoprotéines synthétisées par le foie (VLDL) ou excrété dans les canalicules biliaires (Figure 5).

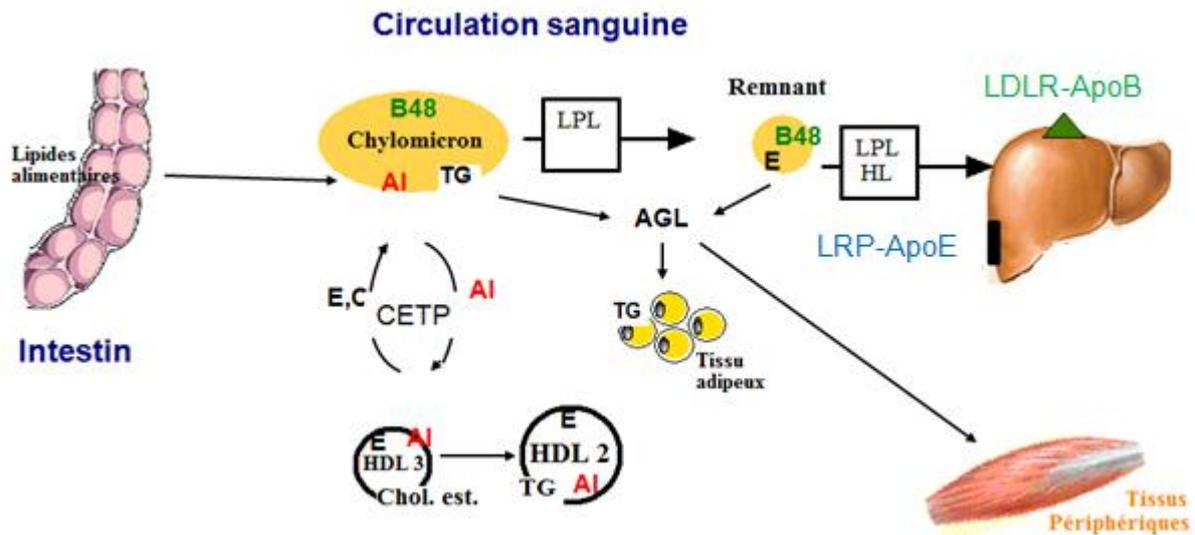


Figure 5 : Voie exogène

ii. Les VLDL

Elles sont synthétisées par le foie et leur production est stimulée par les AGI libérés soit après un repas riche en graisses, soit à jeun par le tissu adipeux. Elles contiennent principalement des TG, mais aussi du CL, les apoB100 et E. Durant leur métabolisme, elles vont subir l'action de la LPL. L'hydrolyse progressive des TG s'accompagne du transfert de PL et d'apoC aux HDL. Les VLDL vont, par ailleurs, acquérir des esters de CL sous l'action de la CETP. Après formation transitoire de particules IDL, la combinaison des activités de la LPL et de la CETP conduit à la formation des LDL. À la différence des VLDL et IDL, les LDL contiennent en surface uniquement l'apoB100.

Tout au long de la cascade VLDL-IDL-LDL, les LP peuvent être soustraites de la circulation par interaction avec des récepteurs cellulaires spécifiques, localisés soit au niveau des hépatocytes (récepteur des LDL, récepteur LRP), soit au niveau des tissus périphériques (récepteur des LDL, récepteur des VLDL, récepteur LRP,...). La reconnaissance des LP par leurs récepteurs cellulaires peut se faire par l'apoE (cas des VLDL), ou par l'apoB100 (cas des IDL et LDL) (Figure 6).

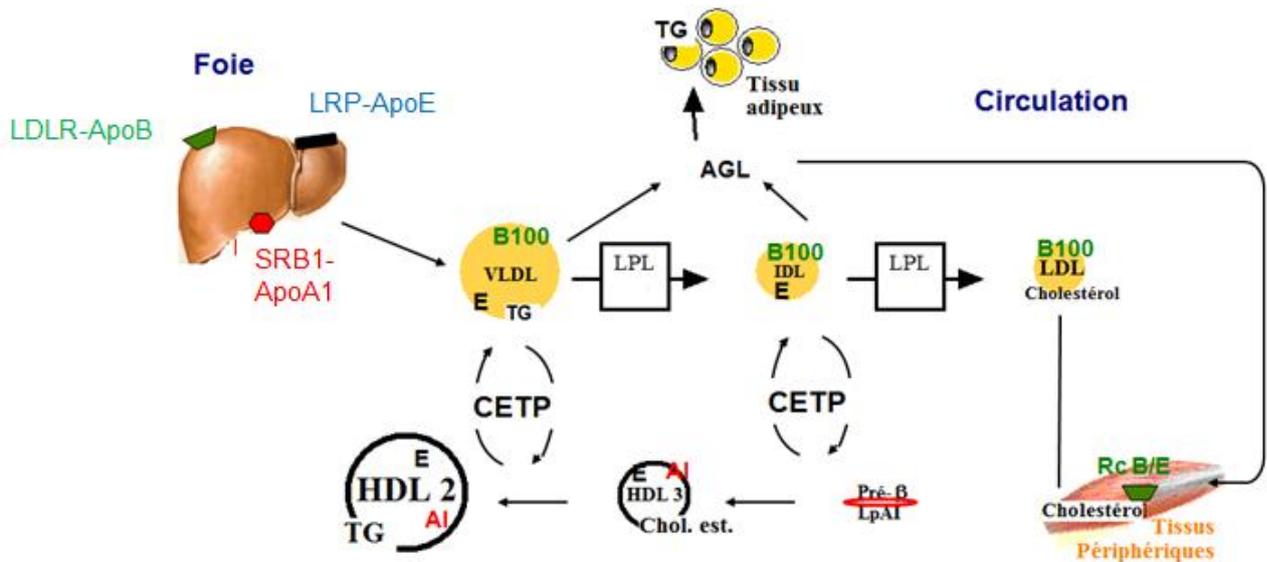


Figure 6 : Voie endogène

c. Voie de retour du cholestérol

Alors que les tissus périphériques peuvent acquérir du CL, soit par synthèse *de novo*, soit par le biais de l'endocytose et de l'hydrolyse des LP, ils sont en revanche pour la plupart incapables de le cataboliser. Le foie est le principal organe capable d'éliminer le cholestérol excédentaire de l'organisme.

Ce sont les HDL qui assurent le transport du CL extrahépatique vers le foie, où il est soit recyclé, soit éliminé dans la bile. Cette voie joue un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose.

Les HDL sont divisées en 2 sous populations selon leur migration électrophorétique: les sous-fractions majoritaires avec une mobilité α et celles, minoritaires, avec une migration similaire aux VLDL, en pré β . Les pré β HDL ou HDL natives sont constituées principalement d'apoAI et de PL et sont considérées comme les principaux accepteurs du CL cellulaire. Elles sont sécrétées par le foie et l'intestin et vont capter le CL libre des tissus périphériques. C'est le transporteur ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1) qui va participer à l'efflux cellulaire du CL vers les HDL. Ensuite, l'estérification du CL à la surface des pré β HDL par la LCAT entraîne le transfert du CL vers le centre de la particule (formation de HDL3 puis HDL2). Le CL estérifié des HDL2 va ensuite être délivré au foie, soit directement, soit aux particules riches en TG par l'intermédiaire de la CETP. Le CL estérifié peut aussi être capté de manière sélective à partir des HDL2 grâce au récepteur SR-B1 (Scavenger

Recepteur de classe I) à la surface des hépatocytes. Sous l'influence de la LH, les HDL2 peuvent de nouveau donner naissance aux HDL3 et aux HDL natives.

Dans l'hépatocyte, le CL des HDL est métabolisé par une voie extralysosomale; il est dirigé directement vers les canalicules biliaires et constitue la principale source du CL biliaire (Figure 7).

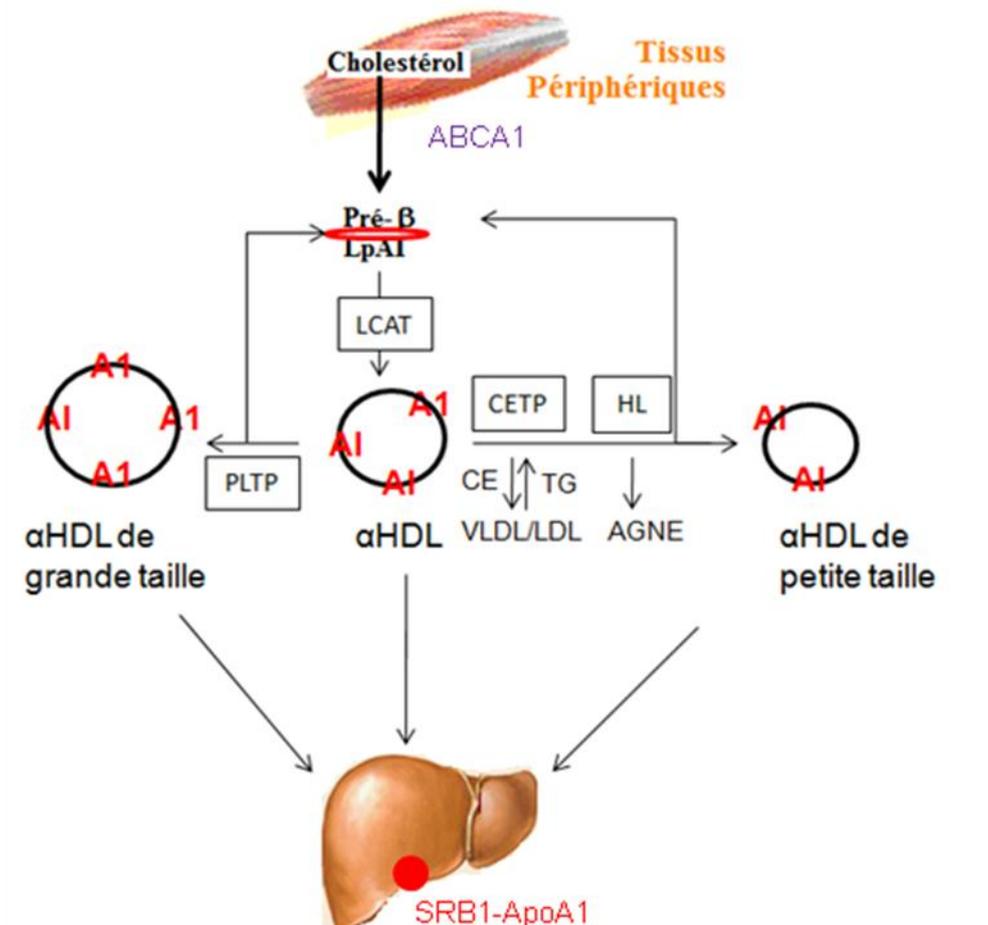


Figure 7 : Voie de retour du CL

L'ensemble de ces voies métaboliques est résumé dans la figure 8.

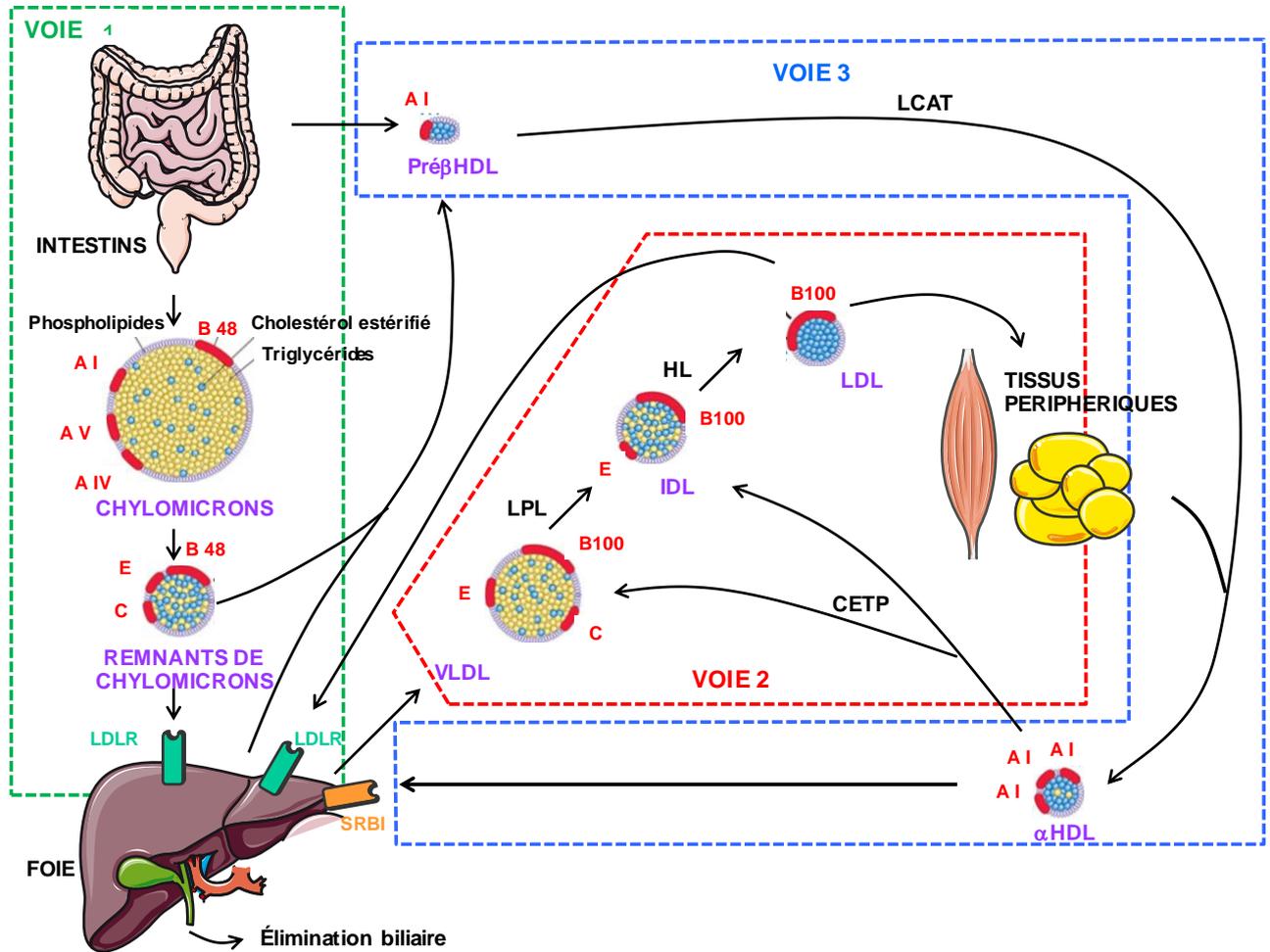


Figure 8 : Schéma général du transport du cholestérol.

Voie 1 : Voie entéro-hépatique. Voie 2 : Voie endogène d'apport aux tissus périphériques.
Voie 3 : Voie de retour.

IV. Hypobétalipoprotéinémies primaires (HBL)

Les HBL sont définies par des concentrations plasmatiques de CT, de LDLC et/ou d'apoB inférieures au 5^{ème} percentile, c'est-à-dire inférieures à 1,5 g/l, 0,7 g/l et 0,5 g/l respectivement ^{1, 2}. La prévalence dans la population générale est estimée entre 0,1 et 1,9% ^{3, 4}. Les causes d'HBL primaires sont l'abétalipoprotéinémie, la maladie de rétention des chylomicrons et l'hypobétalipoprotéinémie familiale. Les principales caractéristiques de ces pathologies sont résumées dans le tableau 1.

	Mode de transmission	Gène candidat	Anomalies biochimiques principales	Signes cliniques
FHBL	Autosomique dominant	apoB non lié à apoB	diminution des LDL et apo B de 30%	homozygote / signes neurologiques stéatorrhée,
				hétérozygote composite acanthocytose stéatose hépatique
				hétérozygote asymptomatique +/- stéatose hépatique
ABL	Autosomique récessif	MTP	diminution des LDL et apo B de 50%	asymptomatique
CRD	Autosomique récessif	SARA2	absence de LP contenant apo B absence de LP contenant apo B48	stéatorrhée, rétinite pigmentaire stéatose hépatique acanthocytose troubles neurologiques stéatorrhée, retard de croissance

Tableau 1 : Principales caractéristiques des FHBL

1. Abétalipoprotéinémie (ABL) (OMIM 200100)

L'ABL est une pathologie génétique autosomique récessive rare puisque la prévalence est évaluée à 1/100 000.

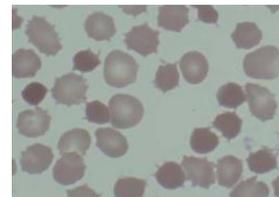
Elle se caractérise par des mutations du gène codant pour la sous-unité de la MTP (localisé sur le chromosome 4), qui est nécessaire à l'assemblage et à la sécrétion des LP contenant l'apoB. Plus de 33 mutations ont été décrites à ce jour⁵⁻⁷.

La présentation clinique est hétérogène. Les sujets atteints ont une malabsorption sévère des lipides conduisant à des taux extrêmement bas de CL et de TG. Les concentrations plasmatiques des vitamines liposolubles (A, D, E, K) sont effondrées, notamment la vitamine E puisque son transport plasmatique dépend exclusivement des LP contenant l'apoB.

La symptomatologie gastro-intestinale est dominée par une stéatorrhée dont l'intensité dépend du contenu alimentaire en lipides. Les manifestations hépatiques sont secondaires à une stéatose : élévation des transaminases et hépatomégalie. En effet, l'étude histologique de biopsies hépatiques a mis en évidence des signes marqués de stéatose chez les patients porteurs d'ABL⁸⁻¹¹. Le mécanisme physiopathologique de la stéatose s'explique par l'incapacité des hépatocytes à sécréter les VLDL conduisant donc à l'accumulation de TG intrahépatiques. L'évolution vers la cirrhose a été rapportée chez seulement quelques patients¹².

Les anomalies neurologiques apparaissent pendant la 1^{ère} ou la 2^{ème} décennie, touchant à la fois le système nerveux central et périphérique. Les premiers signes sont la perte des réflexes ostéotendineux, puis surviennent une altération progressive de la proprioception, un syndrome cérébelleux et une faiblesse musculaire¹³.

Sur le plan hématologique, on note la présence d'acanthocytes (hématies avec de nombreux spicules) (voir photo ci-contre), qui représentent souvent plus de 50% de la population des érythrocytes. Une anémie peut être présente, secondaire à un déficit en fer et folates, dus à la malabsorption des graisses¹⁴.



Les troubles de la coagulation, principalement l'allongement du TP sont causés par le déficit en vitamine K et quelques cas de saignements gastrointestinaux ont été rapportés⁸.

L'atteinte ophtalmologique est variable et le mécanisme physiopathologique est mal connu. L'anomalie la plus fréquente est la dégénérescence rétinienne pigmentée. La plupart des patients présentent une altération de la vision nocturne et des couleurs. La rétinopathie évolue lentement et peut conduire à une baisse d'acuité visuelle. Le fond d'œil révèle une pigmentation atypique de la rétine ¹⁵.

Enfin, il semble que la fertilité soit préservée : en effet, avec ces taux effondrés de CL, on pourrait s'attendre à une diminution de la synthèse des hormones stéroïdes et notamment des hormones sexuelles et donc à une baisse de la fertilité. Cependant, la survenue spontanée de grossesse a été décrite à plusieurs reprises ¹⁵⁻¹⁷, indiquant donc qu'en l'absence de LDLC, le HDLC est suffisant à la synthèse des hormones stéroïdes.

Le traitement repose sur des modifications alimentaires en préconisant un régime pauvre en graisses qui va réduire la stéatorrhée, associé à une supplémentation vitaminique. Il est nécessaire de donner de fortes doses de vitamines E (2400 à 12000 UI par jour) pour obtenir des concentrations plasmatiques d'au mieux 30% de la limite inférieure des normes. Il en est de même pour la vitamine A puisque ce sont de fortes doses (100-400 UI/kg/j) qui permettront de restaurer des concentrations normales. Les données sur les effets à long terme de la substitution vitaminique sont limitées. Néanmoins, l'initiation précoce (avant l'âge de 2 ans) d'un traitement par vitamines A et E prévient l'atteinte rétinienne à 10 ans de suivi ¹⁸. L'apport en vitamine E est associé à une amélioration des signes neurologiques chez les patients âgés et à une possible prévention de l'atteinte neurologique si la supplémentation est débutée tôt (avant l'âge de 16 mois) ^{19, 20}. Les apports de vitamines D, K, de fer et folates doivent être évalués individuellement.

2. La maladie de rétention des chylomicrons (CRD) (OMIM 246700) ou maladie d'Anderson

Il s'agit d'une maladie autosomique récessive extrêmement rare, puisque une quarantaine de cas ont été rapportés dans le monde. Les mutations responsables concernent le gène SARA2 codant pour la protéine Sarb1, impliquée dans le transport vésiculaire intracellulaire des chylomicrons ²¹. Cette protéine est une GTPase qui participe à l'assemblage de manteaux de COP (coat protein) intervenant dans le transport depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Les entérocytes ne peuvent pas sécréter les chylomicrons dans la lymphe et sont donc saturés en lipides.

Sur le plan biologique, la maladie d'Anderson se caractérise par l'absence de LP contenant l'apoB48 et l'absence de détection de chylomicrons après un repas riche en graisses ⁹⁸; les LP contenant l'apoB100 sont présentes mais en quantité diminuées.

Les signes cliniques débutent dans l'enfance. Les sujets atteints présentent une malabsorption des graisses se traduisant par une stéatorrhée et un retard de croissance.

Comme pour l'ABL, le traitement consiste en un régime pauvre en graisses et enrichi en vitamines liposolubles.

3. Hypobétalipoprotéinémie familiale (FHBL) (OMIM 107730)

L'hypobétalipoprotéinémie familiale est une maladie autosomique dominante dont la fréquence de la forme hétérozygote est évaluée à 1/500-1/1000. Les formes homozygotes ou hétérozygotes composites sont excessivement rares.

Sur un plan génétique, les mutations les mieux caractérisées sont celles concernant le gène de l'apoB (situé sur le chromosome 2) et une soixantaine de mutations, principalement faux-sens et non-sens, ont été décrites à ce jour. Elles conduisent à la production de formes tronquées d'apoB, qui sont dénommées selon la taille de la protéine, pouvant aller de l'apoB2 à l'apoB89 (c'est à dire 2% à 89% de la forme complète de l'apoB)²². Les formes d'une taille inférieure à l'apoB 29/30 ne sont pas détectées dans le plasma et représentent environ 1/3 des mutations^{23, 24}.

Cependant dans 44 à 64% des FHBL^{24, 25}, aucune mutation de l'apoB n'est retrouvée. Un locus de susceptibilité situé sur le chromosome 3p21 a été incriminé dans certaines familles²⁶⁻²⁸ et récemment, un nouveau candidat a été identifié : PCSK9, dont les caractéristiques seront détaillées ultérieurement.

Les patients porteurs de *mutations homozygotes ou hétérozygotes composites* du gène de l'apoB présentent des caractéristiques clinico-biologiques très proches des patients porteurs d'ABL. Les taux de LDLC et d'apoB sont effondrés et les signes cliniques débutent dans l'enfance, associant un retard de croissance, une stéatorrhée et une stéatose hépatique²⁵.

Les *patients hétérozygotes* peuvent être asymptomatiques ou présenter des manifestations cliniques mineures. Alors que l'on s'attendrait à ce que les concentrations plasmatiques d'apoB et de LDLC soient diminuées de 50% du fait de la présence d'un allèle normal, les taux sont en fait réduits d'environ 70-75%. Ceci s'explique par une diminution des niveaux de production de ces formes tronquées et une élimination plus rapide²⁹⁻³². Ces deux éléments semblent être influencés par la longueur de la forme tronquée: plus l'apoB est courte, plus les niveaux de production sont réduits et plus l'élimination plasmatique est rapide³³.

La principale manifestation clinique chez ces patients hétérozygotes est l'atteinte hépatique : les mutations du gène de l'apoB sont responsables d'une altération de la sécrétion des VLDL conduisant à une accumulation de TG hépatiques. La prévalence de la stéatose hépatique chez ces patients est donc augmentée ; la mesure du contenu hépatique en graisses par imagerie par résonance magnétique (IRM) hépatique met en évidence une augmentation d'environ 3 à 5 fois par rapport aux contrôles ^{34, 35}. Cependant, il n'y a pas d'étude permettant de prédire l'évolution de la stéatose en maladie hépatique plus sévère (stéatohépatite, fibrose ou cirrhose).

Par contre, il est important de souligner que les formes de FHBL non liées à l'apoB (locus de susceptibilité 3p21 et mutations PCSK9) ne semblent pas induire de pathologie hépatique, probablement car le mécanisme physiopathologique est différent ^{36, 37}.

Enfin, il est licite de penser qu'en raison de taux de LDLC bas, les patients porteurs de FHBL sont protégés des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, aucune étude clinique sur la prévalence des maladies cardiovasculaires dans cette population n'a été réalisée, hormis une étude récente mettant en évidence que l'épaisseur intima-média carotidienne est significativement réduite chez les patients présentant une FHBL par rapport à des témoins appariés sur le sexe et l'IMC ³⁸.

Par ailleurs, le rôle du HDLC sur le risque cardiovasculaire n'est pas parfaitement élucidé. L'hyperalphalipoprotéïnémie se caractérise par une augmentation du HDLC et est associée au syndrome dit « de longévité ». Dans la population japonaise, ce syndrome a pour origine un déficit génétique en CETP et les sujets atteints ont une fréquence de coronaropathie plus faible que des sujets normolipidémiques et un âge moyen de décès supérieur de 10 ans à la moyenne nationale japonaise ³⁹. Toutefois, des travaux récents ont fait état d'un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux chez des sujets hyperalphalipoprotéïnémiques ⁴⁰. Ces données cliniques montrent donc une relation paradoxale entre les niveaux de HDLC et le risque de maladie cardiovasculaire, ceci nécessitera des explorations complémentaires.

V. PCSK9

Ce sont les recherches génétiques dans le cadre des hypercholestérolémies familiales à transmission autosomique dominante (ADH) qui sont à l'origine de la découverte de PCSK9. L'ADH fait partie des maladies génétiques les plus fréquentes, touchant 1 sujet sur 500 dans sa forme hétérozygote et est la conséquence de mutations de gènes codant le récepteur des LDL (79,1%) ou de son ligand l'apoB100 (5,5%)⁴¹. Mais, jusqu'en 1999, il restait une partie non négligeable de patients présentant une ADH sans mutation du LDLR ou de l'apoB100. Par analyse de liaison dans ces familles, un nouveau locus a été identifié⁴². C'est finalement en 2003, par technique de clonage positionnel qu'a pu être identifié le 3^{ème} gène impliqué dans l'ADH : PCSK9⁴³. Par la suite, il a été montré que les mutations gain de fonction sont à l'origine d'une hypercholestérolémie alors que les mutations perte de fonction sont associées à une diminution des taux de LDLC. Nous allons détailler plus particulièrement ce gène afin de mieux comprendre son implication dans le métabolisme du CL.

1. PCSK9 : nature et fonction

a. Structure et expression de PCSK9

PCSK9, initialement appelée Narc1 (neural apoptosis-regulated convertase 1) est le 9^{ème} membre de la famille des proprotéines convertases. Chez le rat adulte, PCSK9 est exprimée dans le foie, l'intestin grêle et à un moindre niveau dans les reins, les poumons, la rate, les testicules et le thymus⁴⁴.

PCSK9 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 75 kDa (pro-PCSK9) comprenant 3 domaines : un prodomaine, un domaine catalytique, et un domaine C-terminal (Figure 9). Après sa synthèse, PCSK9 va subir un auto-clivage dans le réticulum endoplasmique, libérant partiellement le prodomaine. En effet, contrairement aux autres protéines convertases, PCSK9 ne subit pas de deuxième clivage et le prodomaine N-terminal va rester associé à la forme mature de 60kDa⁴⁴ au niveau du domaine catalytique et va servir de protéine chaperonne pour le transport de PCSK9 au travers de sa voie de sécrétion^{44, 45}.

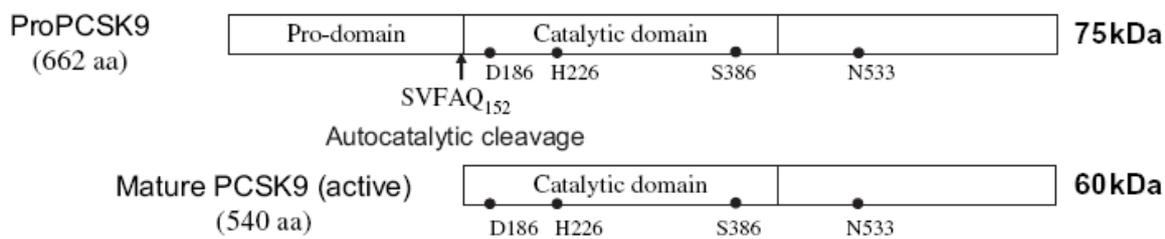


Figure 9 : Maturation de PCSK9

PCSK9 va ensuite subir des modifications post-traductionnelles (glycosylations et phosphorylations principalement) dont le rôle reste encore à définir puisque ces modifications ne sont pas nécessaires à la sécrétion de PCSK9 ⁴⁶.

Enfin, PCSK9 est sécrétée par le foie dans la circulation sanguine et plusieurs équipes ont actuellement développé des tests ELISA afin de mesurer les niveaux circulants de PCSK9 (*cf infra*).

De plus, des études cinétiques ont été réalisées chez la souris : l'injection d'une forme purifiée de PCSK9 à des concentrations physiologiques a permis de mettre en évidence que la demi-vie de PCSK9 est d'environ 5 minutes et que 90% de la protéine circulante est éliminée par le foie dans les 15 minutes suivant l'injection ⁴⁷.

La structure cristallographique de PCSK9, décrite en 2007, a permis de mieux caractériser les particularités de cette enzyme (Figure 10). En effet, elle comprend une triade catalytique conformément aux autres proprotéines convertases mais s'en distingue par le fait que le prodomaine bloque l'accès au site catalytique ⁴⁸.

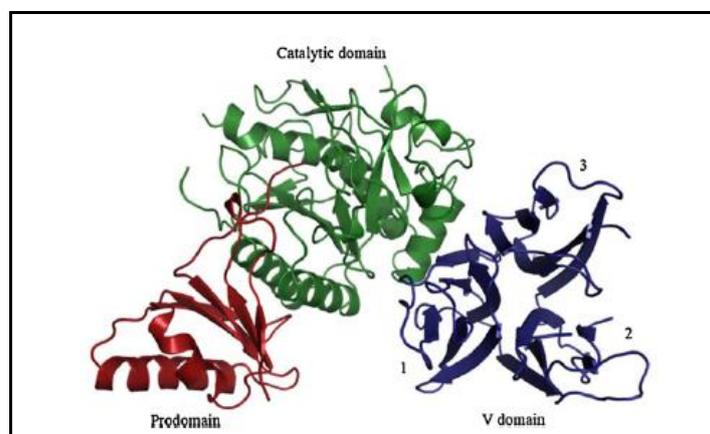


Figure 10 : Structure cristallographique de PCSK9

b. PCSK9 et métabolisme des LDL

i. PCSK9 : un inhibiteur endogène du LDLR

Le LDLR joue un rôle important dans l'homéostasie du CL, en favorisant la capture hépatique des particules de LDLC, et ainsi le catabolisme du CL. Une perte de fonction du LDLR s'accompagne d'un défaut de clairance des LDL conduisant à des hypercholestérolémies familiales. Après sa synthèse, le LDLR subit une étape de maturation (i.e. glycosylation) au niveau de l'appareil de Golgi. Par la suite, le LDLR migre à la membrane cellulaire au niveau de puits tapissés de clathrine où il peut capter les LDL circulantes, via une interaction avec le domaine extracellulaire EGF-A (Epidermal Growth Factor-like repeat A). L'internalisation par endocytose des complexes LDL/LDLR nécessite l'interaction avec une protéine adaptatrice : ARH (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia). Sous l'effet du pH acide, le complexe se dissocie au niveau des endosomes. Le CL libéré est dégradé dans les lysosomes ; alors que le LDLR va, lui, être recyclé à la surface cellulaire (Figure 11).

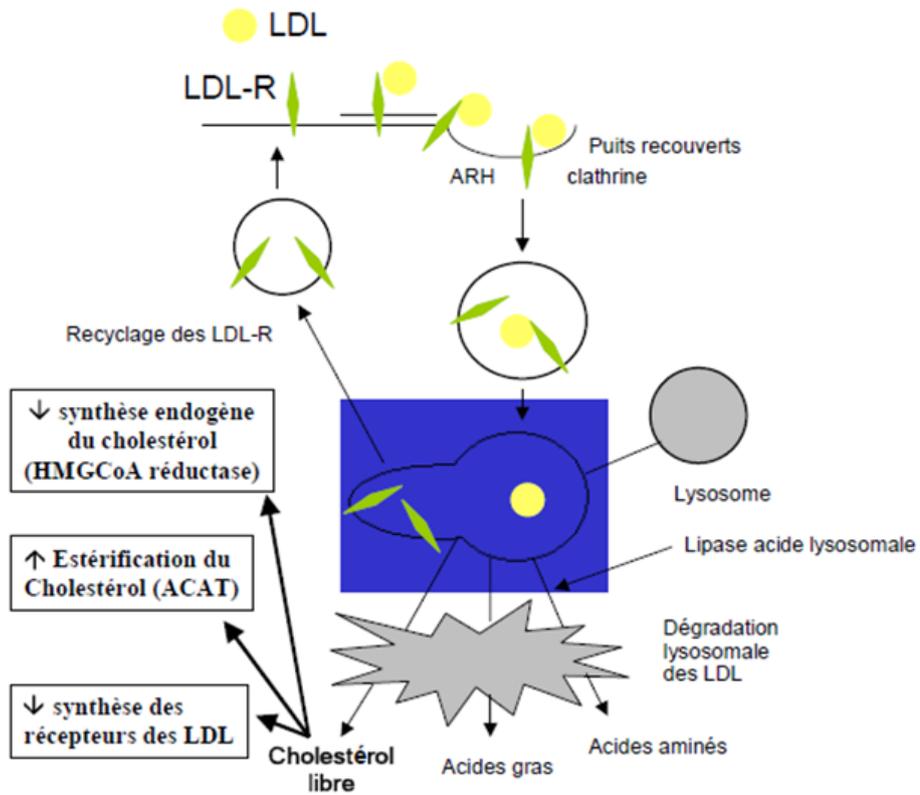


Figure 11 : Synthèse et rôle du LDLR

PCSK9 va perturber cette voie métabolique : après sa sécrétion, le domaine N-terminal de PCSK9 va se lier au domaine extracellulaire EGF-A du LDLR (Figure 12)

49

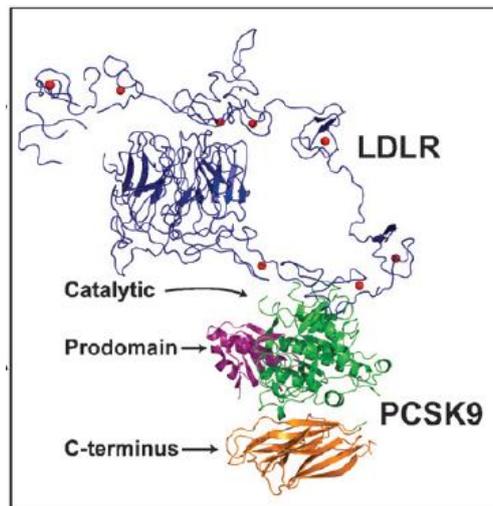


Figure 12 : Liaison LDLR et PCSK9

PCSK9 va ensuite agir comme une protéine chaperonne (*cf infra*). Le complexe PCSK9-LDLR-LDLC est dirigé vers la voie lysosomale, empêchant ainsi le recyclage membranaire du LDLR et conduisant ainsi à sa dégradation⁵⁰ (Figure 13).

Différentes études ont confirmé ce lien entre PCSK9 et les niveaux d'expression du LDLR hépatique. Ainsi chez les patients porteurs de la mutation hypercholestérolémiante (« gain de fonction ») S127R, on constate une diminution de 35% du nombre de LDLR à la surface de lymphocytes immortalisés⁵¹. A l'inverse, les souris dont le gène de PCSK9 a été invalidé sont hypocholestérolémiques (CL total diminué de 48%) et le nombre de LDLR à la surface des hépatocytes est augmenté de 2,8 fois par rapport aux souris sauvages⁵².

PCSK9 agit sur le LDLR de manière post-transcriptionnelle : elle augmente la dégradation du récepteur sans en affecter l'expression. En effet, la surexpression adénovirale de PCSK9 chez la souris induit une diminution de l'expression protéique du LDLR hépatique, sans que les niveaux d'ARNm ne soient modifiés^{45, 53}.

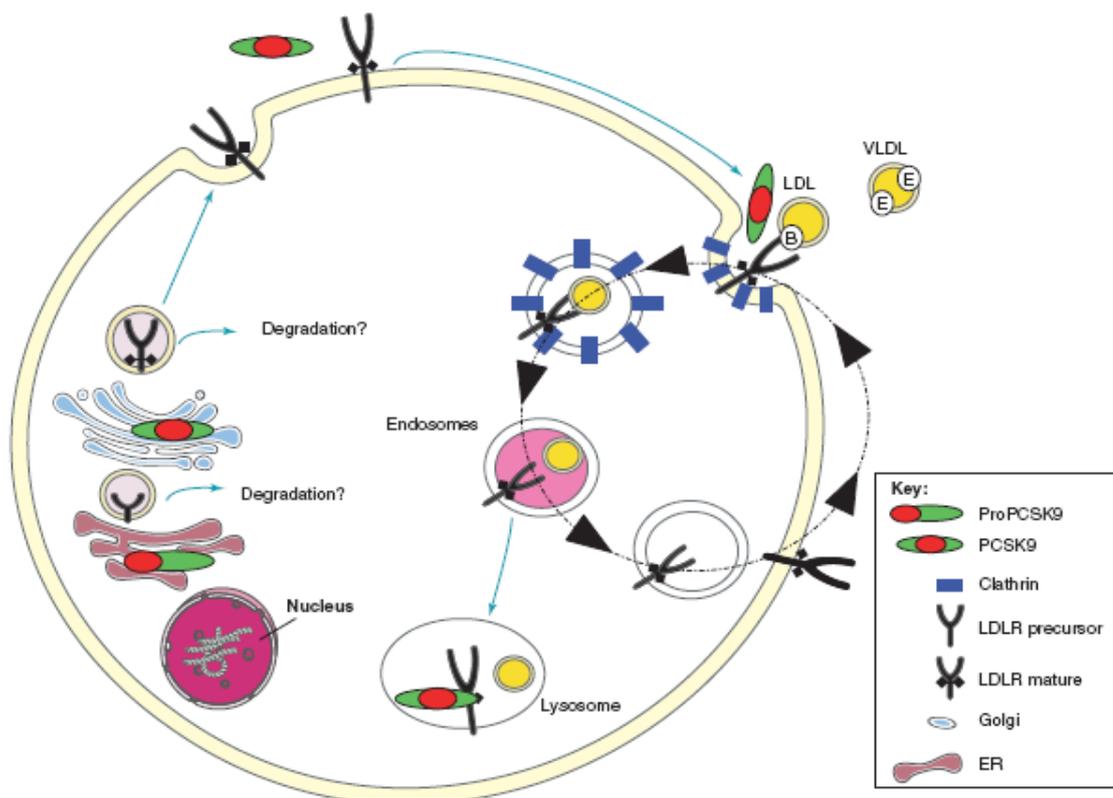


Figure 13: Effets de PCSK9 sur le LDLR

D'après Costet et al, TIBS 2008

ii.Mécanisme d'action

Le mode d'action précis par lequel PCSK9 module l'expression du LDLR reste encore incomplètement élucidé. Il existe notamment 2 mécanismes possibles, le premier intracellulaire et le second concerne l'action extracellulaire de la protéine circulante.

Les premières données impliquant la *forme sécrétée* de PCSK9 proviennent d'études *in vitro* : l'apport d'un milieu de culture de cellules surexprimant PCSK9 à des cellules hépatomateuses HepG2 entraîne une diminution du nombre de LDLR à leur surface membranaire ⁵⁴. Ceci a ensuite été confirmé *in vivo* avec des expériences de parabiose, qui ont consisté à relier les systèmes circulatoires d'une souris sauvage et d'une souris transgénique surexprimant la forme humaine de PCSK9. Il en résulte que la quantité de LDLR s'effondre chez les souris sauvages après la parabiose, s'accompagnant d'une augmentation des niveaux de LDLC ⁵⁴. De même, l'infusion continue de PCSK9 recombinante chez des souris sauvages entraîne une diminution de la quantité de LDLR hépatique, atteignant 90% dans les 2 heures suivant l'injection de la plus forte concentration (32 µg/h) ⁴⁷.

Concernant cette action extracellulaire de PCSK9, l'activité autocatalytique ne semble pas essentielle à la dégradation du LDLR. En effet, il a été montré qu'ajouter un mutant de PCSK9 catalytiquement inactif (mutation perte de fonction D374Y) à des cultures cellulaires d'hépatocytes réduit le nombre de LDLR aussi efficacement que la forme sauvage ⁵⁵. De même, *in vivo*, une diminution similaire de la quantité de LDLR hépatiques est obtenue après injection soit de PCSK9 avec un domaine catalytique inactif, soit de PCSK9 sauvage ⁴⁷. Ainsi, ces données suggèrent que PCSK9 n'aurait pas d'activité catalytique sur le LDLR et jouerait donc le rôle d'une protéine chaperonne en dirigeant le LDLR vers la voie lysosomale pour y être dégradé.

Toutefois, il n'est pas exclu que *la forme intracellulaire* de PCSK9 puisse jouer un rôle dans la dégradation du LDLR. En effet, certaines mutations gain de fonction de PCSK9 (S127R) s'accompagnent d'une hypercholestérolémie, alors même que ces variants ne sont pas sécrétés ^{51, 56}.

c. Action sur la production hépatique des VLDL

Un autre aspect, plus controversé du rôle fonctionnel de PCSK9, concerne son impact sur la synthèse hépatique d'apoB et des VLDL.

Cette hypothèse provient d'études cinétiques menées au sein du laboratoire chez des patients porteurs de la mutation gain de fonction S127R qui ont mis en évidence une forte augmentation de la production de l'apoB100 des VLDL⁵⁷. De plus, la surexpression adénovirale de PCSK9 dans le foie de souris entraîne une surproduction hépatique de VLDL et d'apoB100 lors du jeûne prolongé⁵⁸. Récemment, il a été mis en évidence que les concentrations post-prandiales de TG sont fortement diminuées après un gavage à l'huile d'olive chez les souris invalidées pour PCSK9 comparativement aux souris sauvages⁵⁹.

Des études cliniques sont venues conforter ces résultats puisqu'il semble exister une corrélation entre les concentrations de TG et de PCSK9⁶⁰. L'action de PCSK9 sur la production d'apoB100 et de VLDL reste cependant encore à caractériser et pourrait être liée au type de mutation⁶¹ ou à des conditions physiopathologiques particulières.

d. Régulation de l'expression de PCSK9

Il a initialement été montré que les niveaux de CL intervenaient dans la régulation de l'expression de PCSK9 : un excès de CL en réprime l'expression alors qu'inversement sa déplétion dans les milieux de culture la stimule^{52, 58}. Cette régulation est médiée par deux facteurs de transcription : SREBP-1a et SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein) qui sont activés par une déplétion en CL intracellulaire. Il a d'ailleurs été montré que PCSK9 possède un domaine de réponse aux stérols (SRE) dans son promoteur^{62, 63}.

D'autres facteurs interviennent dans la régulation de PCSK9 et notamment le statut nutritionnel: les niveaux d'expression sont diminués de 50% au cours du jeûne et restaurés après réalimentation. Des études *in vitro* ont montré une régulation de PCSK9 par l'insuline et non pas par le glucose. Ces données ont été confirmées *in vivo* par des techniques de clamp euglycémique hyperinsulinémique chez la souris mettant en évidence un doublement de l'expression de PCSK9 en réponse à l'infusion d'insuline. Les mécanismes moléculaires sous-jacents impliquent le facteur

de transcription SREBP1c qui va interagir avec le domaine SRE contenu dans le promoteur de PCSK9⁶³.

Les statines, principale classe d'hypocholestérolémiant, inhibent l'HMGCoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase), enzyme impliquée dans la biosynthèse du CL et vont augmenter l'expression des LDLR à la surface des hépatocytes. De façon contre-intuitive, l'expression de PCSK9 est aussi induite par les statines, ce qui va entraîner une diminution du nombre des LDLR à la surface cellulaire. PCSK9 apparaît ainsi comme un frein à l'action hypolipémiante des statines. Ceci se confirme chez les souris invalidées pour le gène de PCSK9 qui présentent une réponse plus importante au traitement par statine (avec une augmentation du nombre de LDLR)⁵². Des résultats comparables ont été mis en évidence chez l'homme : 25 patients suivis pour une hypercholestérolémie familiale ont été sélectionnés en raison de leur bonne réponse au traitement par statine (diminution d'au moins 60% du cholestérol total sous statine). L'enquête génétique révèle que 3 de ces patients (8,8%) présentent une mutation perte de fonction de PCSK9⁶⁴. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de PCSK9 pourrait potentialiser l'action hypocholestérolémiante des statines.

Au cours du jeûne, le récepteur nucléaire PPAR α est activé pour favoriser notamment l'oxydation des AG. Le fénofibrate, un agoniste synthétique de PPAR α (Peroxisome proliferator activated receptor α), réprime l'expression de PCSK9⁶⁵. En effet, l'administration de ce traitement à des souris entraîne une réduction de 50% de l'expression hépatique de PCSK9. Ces données ont été confirmées chez l'homme où il a été observé une diminution des niveaux de PCSK9 circulant (-8,5%) dans une cohorte de patients diabétiques traités par fénofibrate⁶⁶. Néanmoins, une étude récente vient nuancer ces résultats : l'utilisation de fénofibrate chez 22 patients dyslipidémiques augmente significativement les concentrations plasmatiques de PCSK9 (+25%)⁶⁷. Les résultats discordants de ces études peuvent être expliqués par une absence de standardisation du dosage de PCSK9 circulant et par le fait que les populations étudiées soient différentes.

LXR est un autre récepteur nucléaire impliqué dans l'homéostasie lipidique. Des agonistes LXR (Liver X receptor) vont agir via la voie SREBP1c et augmenter les niveaux d'expression de PCSK9⁶³.

Enfin, PCSK9 est très exprimé dans l'iléon, un site majeur de recapture des acides biliaires. L'acide chénodésoxycholique, un des acides biliaires les plus abondants

diminue l'expression de PCSK9 dans des lignées cellulaires d'hépatocytes humains, potentiellement via l'activation du récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor) ⁶⁸.

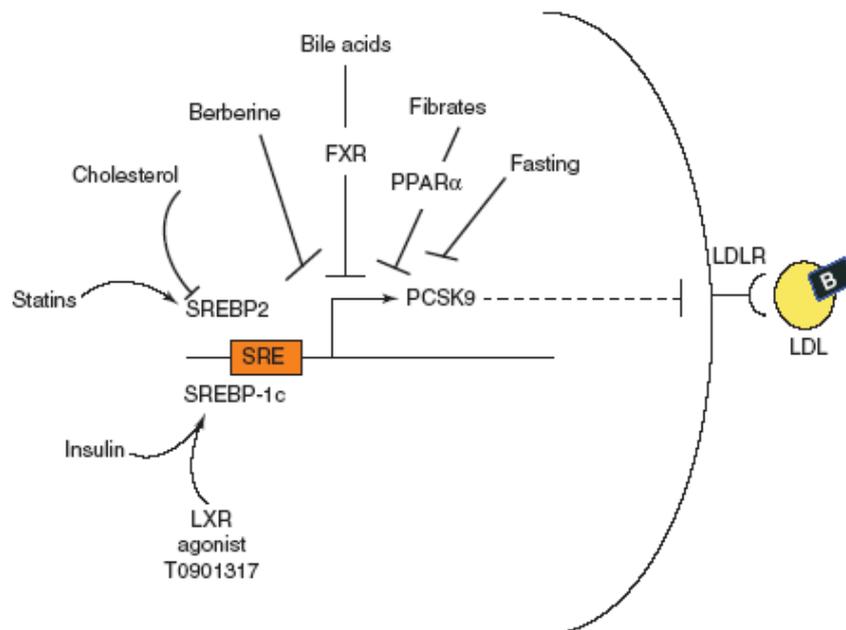


Figure 14: Régulation de PCSK9

D'après Costet et al, TIBS 2008

2. PCSK9 et niveau de cholestérol : les données cliniques

A l'heure actuelle, une quarantaine de variants de PCSK9 ont été décrits : les mutations gain de fonction responsables d'hypercholestérolémie sont rares ; à l'inverse, les mutations perte de fonction, plus fréquentes, réduisent le LDLC pour atteindre dans les formes homozygotes des concentrations extrêmement basses, sans effet délétère associé. Les principales mutations sont représentées dans la figure 15.

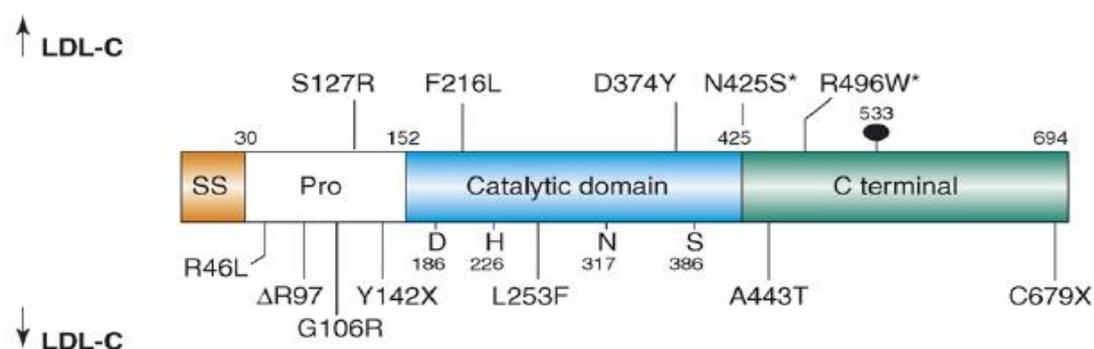


Figure 15: Principales mutations gain ou perte de fonction

D'après Horton J et al, TIBS, 2006

a. PCSK9 et hypercholestérolémie

En 2003, 2 mutations de PCSK9 ont été identifiées dans 3 familles françaises présentant une ADH : S127R dans l'exon 2 et F216L dans l'exon 4 ⁴³. D'autres mutations ont ensuite été identifiées et certaines peuvent être associées à des mutations du LDLR, les niveaux plasmatiques de LDL cholestérol (LDLC) sont alors augmentés de 50% par rapport aux sujets possédant une mutation sur un seul des 2 gènes ⁶⁹.

b. PCSK9 et hypocholestérolémie

Cohen et al ont recherché dans la cohorte américaine de la Dallas Heart Study (DHS) des mutations de PCSK9 chez les sujets présentant des valeurs de LDLC inférieures à 0,58 g/L. Cette cohorte de 3543 sujets est multiethnique puisqu'elle regroupe 52% d'afro-américains, 29% d'américains d'origine européenne, 17% d'hispaniques et 2% d'autres ethnies, et avait pour but d'étudier l'impact de l'origine ethnique sur la survenue des complications cardiovasculaires. L'analyse a été réalisée chez 128 sujets et il a ainsi pu être identifié 2 mutations non-sens à l'état hétérozygote: Y142X situé dans l'exon 3 qui entraîne une délétion des 4/5 restants de la protéine et C679X avec comme conséquence une protéine tronquée de 14 acides aminés. La mutation Y142X est retrouvée chez 0,4% des afro-américains et dans aucun autre groupe ethnique. La mutation C679Y est mise en évidence chez 1,4% des afro-américains et très rarement (< 0,1%) chez les américains d'origine européenne. Ces mutations s'accompagnent d'une baisse du LDLC de 40% mais il est intéressant de souligner que tous les sujets porteurs d'une de ces mutations ne sont pas hypocholestérolémiques ⁷⁰.

Dans une autre étude, le gène de PCSK9 a été séquencé chez les sujets de la DHS ayant des niveaux de LDLC inférieurs au 5^{ème} percentile. 3 mutations faux-sens ont été associées à une réduction des niveaux de LDLC de 3,5% à 30% : L253F, A443T chez les sujets de race blanche et R46L chez les sujets de race noire ³⁷. Les variants R46L et A443T ont été associés à une baisse du LDLC dans d'autres populations, mais là encore ils ont aussi été identifié chez des sujets normo ou hypercholestérolémiques ^{37, 64, 71, 72}.

Ces différences phénotypiques sont vraisemblablement à rapporter à l'association à des facteurs environnementaux ou génétiques influençant les taux de CL^{37, 43, 73}.

D'autres mutations ont été identifiées: G106R chez une famille norvégienne⁶⁴; T771, V114A, A522 et P616L dans une population de Sicile⁷¹; Q219E, A239D, G452D, S668R et R93C dans une population japonaise⁷⁴.

Plusieurs mutations perte de fonction de PCSK9 ont donc été authentifiées dans différentes populations avec des fréquences variables selon l'origine ethnique. Ces mêmes mutations peuvent, par ailleurs, être présentes chez des sujets normo ou hypercholestérolémiques.

c. PCSK9 et maladies cardio-vasculaires

Les patients ayant une *mutation gain de fonction* de PCSK9 ont un phénotype clinique similaire à celui des patients avec hypercholestérolémie familiale en rapport avec une mutation du LDLR ; ils sont donc à haut risque de présenter des accidents cardiovasculaires précoces.

Les *mutations perte de fonction*, faux-sens et non-sens, entraînent une diminution du taux de LDLC et pourraient donc avoir un effet protecteur vis-à-vis de la survenue de maladies cardiovasculaires. L'étude de l'impact des variants perte de fonction de PCSK9 sur l'incidence des événements coronariens a été réalisée sur une période de 15 ans dans la cohorte ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities). Cette cohorte est constituée de 3363 sujets noirs et 9523 blancs âgés de 45 à 64 ans, issus de 4 communautés américaines. Les variations non-sens (Y142X et C679X) retrouvées avec une fréquence de 2,6% chez des sujets noirs sont associées à une réduction des taux de LDLC de 28% et des événements coronariens de 88%. Le variant R46L, présent chez 3,2% des sujets blancs est, lui, associé à une diminution du LDLC de 15% et des événements coronariens de 47%⁷⁵. Ces mutations semblent aussi associées à une diminution du risque de développer une athérosclérose carotidienne : l'épaisseur intima-média est réduite chez les sujets porteurs d'une mutation par rapport aux contrôles⁷⁵.

d. PCSK9 et hypobétalipoprotéinémie

Les mutations de PCSK9 peuvent être responsables d'hypocholestérolémie sévère chez les porteurs homozygotes ou hétérozygotes composites. Peu de cas ont été rapportés dans la littérature avec des taux très abaissés de LDLC : une patiente originaire du Zimbabwe, homozygote pour la mutation C679X, présente un taux de LDLC de 0,15 g/l ⁷⁶. Une deuxième patiente, d'origine afro-américaine a des taux de LDLC de 0,14 g/l. Elle est porteuse d'une mutation hétérozygote composite (mutation Y142X et délétion c.290_292delGCC) empêchant le clivage autocatalytique et la sécrétion de PCSK9 ⁷⁷.

Ces patients ne présentent pas d'autres atteintes cliniques, notamment pas de stéatose hépatique. Au cours de la DHS, la stéatose hépatique a été évaluée par la mesure du contenu hépatique en TG par IRM et aucune différence n'a été mise en évidence chez les sujets avec ou sans mutation de PCSK9 ³⁷. Les hypocholestérolémies secondaires à des mutations de PCSK9 semblent dénuées de comorbidités, au contraire des autres formes d'HBL. Jusqu'à présent, les mutations n'ont été associées qu'à des perturbations du métabolisme du CL. Cependant, il a été mis en évidence que PCSK9 est impliqué dans le développement du système nerveux ⁷⁸ et que son inactivation entraîne des anomalies du développement neuronal chez les embryons de zébrafish mais pas chez la souris ^{52, 78}. De plus, PCSK9 est certes exprimé dans le foie, l'intestin, le système nerveux, mais aussi dans le rein et d'autres pathologies en rapport avec ces mutations pourraient être mises à jour dans le futur.

e. Dosage circulant de PCSK9 et corrélation clinique

Plusieurs équipes ont cherché à mesurer les niveaux plasmatiques de PCSK9, notamment en utilisant une technique ELISA avec des Ac dirigés contre la forme mature de PCSK9. Les résultats rapportés diffèrent : une première équipe a rapporté des concentrations de 50 à 600 ng/ml (médiane de 200 ng/ml) ⁵⁴, pour deux autres, les niveaux circulants variaient de 11 à 115 ng/ml ⁷⁹, et de 0,1 à 9,3 µg/ml ⁶⁶. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la nature et la spécificité des Ac utilisés pour le dosage, mais aussi par le type de population étudiée.

Récemment, les niveaux plasmatiques de PCSK9 ont été mesurés dans la cohorte de la DHS. Les concentrations varient d'un facteur 100 : de 33 à 2988 ng/ml, sans que les auteurs n'apportent d'explications claires à ces importants écarts. La concentration médiane est de 487 ng/ml ; elle est significativement plus élevée chez les femmes. De plus, il a été mis en évidence que les niveaux de PCSK9 sont corrélés à la concentration de LDLC mais de façon assez modeste : les variations de PCSK9 expliquent seulement 7% de variations des niveaux de LDLC (ou, exprimé différemment, une augmentation de 100 ng/ml des niveaux de PCSK9 est associée à une augmentation du LDLC de 0,45 g/l chez les femmes et de 0,32 g/L chez les hommes). D'autres facteurs sont corrélés avec les niveaux plasmatiques de PCSK9 : niveaux de TG, insuliniémie et glycémie ; en effet, le diabète est associé à des niveaux plasmatiques de PCSK9 plus élevés. Chez les patients présentant une mutation perte de fonction, les taux de PCSK9 sont réduits significativement, validant bien la technique de dosage ⁶⁰.

Enfin, un nouvel Ac dirigé contre PCSK9 a été développé pour un test ELISA permettant de mesurer à la fois la forme mature et la forme clivée par la furine. Ce test a été réalisé chez 254 volontaires sains et 200 sujets hypercholestérolémiques. Les concentrations de la population témoin sont en moyenne de 90 ng/ml (35,3-225,2 ng/ml) et sont corrélées avec les niveaux de CL total, de LDLC, de TG et de glycémie à jeun. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la concentration de PCSK9 chez les patients traités par statines, et encore plus marquée chez ceux traités à la fois par statines et ezetimibe ⁸⁰.

VI. Cas cliniques

Nous allons illustrer le lien entre mutations perte de fonction de PCSK9 et hypobétalipoprotéinémie en décrivant 3 cas cliniques. Le premier cas correspond une hypocholestérolémie sévère pour lesquels des analyses complémentaires *in vitro* et *in vivo* ont pu être réalisées. Les 2 cas suivants présentent eux aussi une HBL, mais la description sera uniquement phénotypique.

1. Cas n°1

a. Présentation clinique

Mr D, né le 26/02/1958, a été pris en charge initialement en décembre 2005 pour une découverte de diabète sur une décompensation cétosique. Les premières analyses réalisées sont résumées dans le tableau 2. Le bilan lipidique met en évidence une hypocholestérolémie franche avec un CT total à 0,66g/l et l'ensemble du bilan sera détaillé ultérieurement.

Les antécédents de Mr D sont marqués par différentes interventions chirurgicales: kyste du genou, transposition tibiale antérieure, hernie inguinale. Il est chauffeur livreur, ne fume pas.

L'examen clinique est normal, Mr D mesure 1m70 pour 82kg, soit un indice de masse corporel (IMC) à 27kg/m².

	Initial	Normes
Glycémie à jeun (mmol/l)	9,4	4 à 6
HbA1c (%)	11,5	< 6 %
Créatininémie (µmol/l)	78	44 à 80
BH		
Bilirubine totale (µmol/l)	11	0 à 17
Bilirubine libre (µmol/l)	4	0 à 14
ASAT (µkat/l)	0,27	0 à 0,6
ALAT (µkat/l)	0,18	0 à 0,7
GGT (µkat/l)	0,64	0 à 1
Phosphatase alcaline (µkat/l)	0,76	0,9 à 2,15
Bilan pancréatique		
Lipase (µkat/l)	0,62	0 à 1
Bilan lipidique		
CT (g/l)	0,66	< 2,2
LDLC (g/l)	0,07	< 1,9
HDLC (g/l)	0,39	> 0,40
TG (g/l)	0,96	< 1,5

Tableau 2 : Données biologiques initiales

Concernant le diabète, le mode de découverte est une hyperglycémie avec cétose (présence de corps cétoniques à la bandelette urinaire : 3 croix d'acétonurie). Il est intéressant de noter qu'en février 2005, la glycémie à jeun était à 1,01 g/L.

Un bilan étiologique est alors réalisé. Les anticorps anti GAD sont à 0,1 U/ml (0-1); anti IA2 <0,5 kU/l (seuil 1 kU/l) ; anti insuline <1% (<5,5%) ; l'absence de marqueur d'autoimmunité est donc peu en faveur d'un diabète de type 1. En faveur d'un diabète de type 2, on note un surpoids puisque l'IMC est à 27 avec une répartition androïde des graisses (tour de taille à 92,5 cm) et un antécédent de diabète de type 2 chez son frère. Concernant les autres étiologies: le bilan martial est normal (coefficient de saturation à 7%), éliminant une hémochromatose et le scanner abdominal ne retrouve pas de pancréatopathie, ni d'hépatopathie.

Sur le plan thérapeutique, une insulinothérapie sous-cutanée en 4 injections basal/bolus est instaurée avec un équilibre glycémique rapidement obtenu permettant même l'arrêt de l'insulinothérapie ; ce qui renforce le diagnostic de diabète de type 2. Sous régime seul, l'HbA1c est à 6,5%. Actuellement, il est traité par une monothérapie (sitagliptine, Januvia® 100mg/j) avec un contrôle glycémique satisfaisant.

b. Bilan lipidique

Le bilan initial a permis de mettre en évidence un taux extrêmement bas de cholestérol total à 0,66g/l avec un LDLC effondré à 0,07g/l reconstrôlé à 0,16 g/l. Le HDLC est à 0,39g/L et les TG à 0,96g/l

✓ *Conséquences cliniques*

Mr D a eu un développement normal avec une croissance staturo-pondérale satisfaisante. Il ne présente pas de trouble du transit, notamment pas de diarrhée. Sur le plan biologie, le bilan hépatique est normal (Tableau 2). L'échographie abdominale retrouve une hépatomégalie modérée et hyperéchogène, faisant évoquer une stéatose.

Le dosage des vitamines liposolubles met en évidence un taux normal de vitamine A et E. Il existe une carence en vitamine D mais ceci est fréquent dans la population générale. La vitamine K est effondrée mais Mr D ne présente aucun signe de coagulopathie, et ceci fait donc suspecter un problème au cours de l'acheminement du prélèvement ou lors du dosage (Tableau 3).

Vitamine A (mg/l)	0,8	0,4 à 0,9
Vitamine D (ng/ml)	24	30 à 60
Vitamine E (mg/l)	7,7	7 à 14
Vitamine K (ng/l)	<20	150 à 900
Echographie abdominale	Hépatomégalie stéatosique	

Tableau 3 : Vitamines liposolubles et échographie hépatique

✓ *Arbre généalogique*

Ces données ont donc amené à réaliser une enquête familiale. L'arbre généalogique est résumé dans la figure 16.

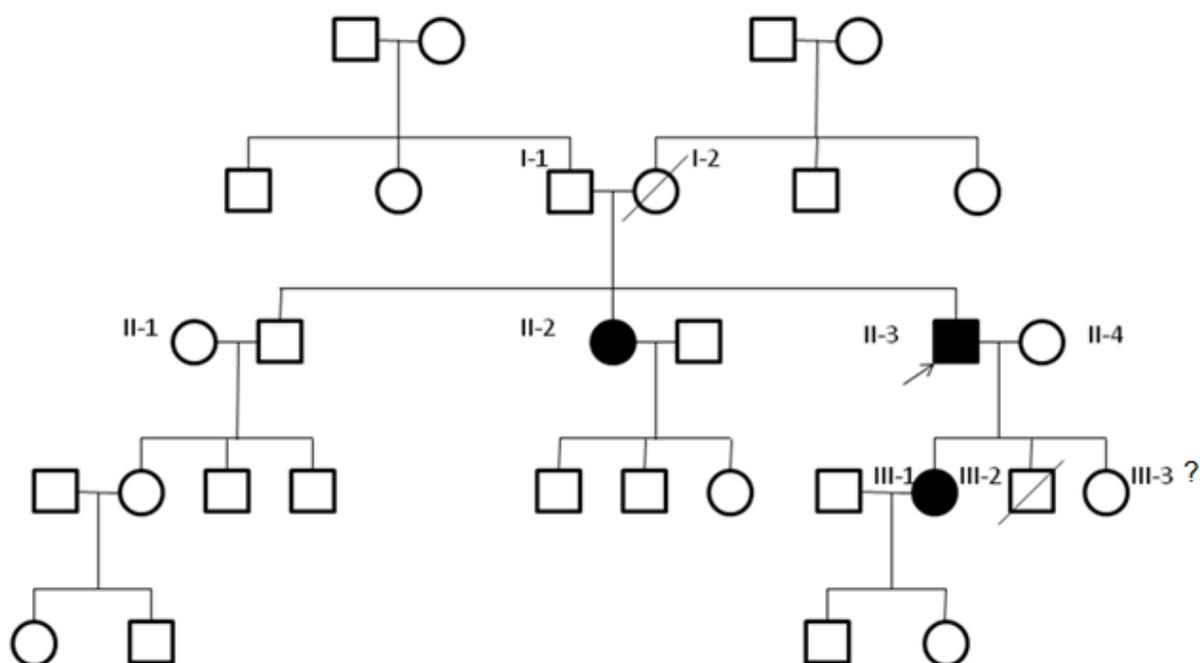


Figure 16: Arbre généalogique

Sa sœur (II-2) et une de ses filles (III-1) présentent de même des niveaux bas de LDLC : 0,37 g/l pour sa sœur et 0,44 g/l pour sa fille. Son fils est décédé suite à un accident et sa deuxième fille n'était pas disponible pour les investigations.

Les résultats biologiques sont résumés dans le tableau 4.

	II1	II2*	II3*	II4	III1*
Age (ans)	51	37	49	48	29
Sexe	M	F	M	F	F
IMC (kg/m ²)	ND	ND	28,8	21	22,9
CT (g/l)	167	152	100	235	143
LDLC (g/l)	93	57	16	140	58
HDLC (g/l)	57	81	75	82	83
TG (g/l)	84	71	49	68	71
Apo A1	141	218	188	203	226
Apo B	72	52	25	87	44
Apo B/ApoA1	0,51	0,24	0,13	0,43	0,19
Glycémie à jeun (mmol/l)	5,4	4,8	7	4,5	5,2
HbA1c (%)	5,4	4,8	5,6	ND	ND
ASAT *	0,67	0,51	0,93	0,88	0,74
ALAT *	0,85	0,37	0,74	0,64	0,66

*: multiple de la limite supérieure des valeurs normales
 ND: Non Déterminé

Tableau 4 : Analyses biologiques du propositus et de sa famille

c. Analyse génétique

L'analyse génétique du propositus, réalisée au laboratoire de génétique de Saint-Antoine (Dr Pascale Benlian), retrouve deux mutations faux-sens R104C et V114A de l'exon 2 du gène de PCSK9, qui sont localisées sur le même allèle (Figure 17). L'analyse des SNP (Single Nucleotid Polymorphism) et des microsatellites a permis de confirmer que ces 2 mutations se situent sur le même bras d'ADN. L'électrophorèse de l'AN a permis d'éliminer une délétion importante du locus de PCSK9. Le gène de l'apoB a été analysé et aucune mutation n'a été authentifiée (Pr Tarugi, Modène, Italie).

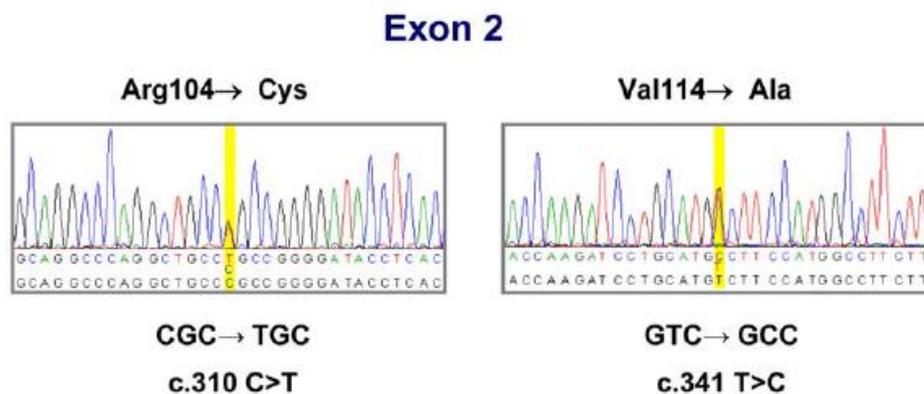


Figure 17: Mutations R104C et V114A

La localisation de ces 2 mutations dans la structure cristallographique de PCSK9 a permis de mettre en lumière leur impact potentiel ; la cristallographie a été effectuée en collaboration avec Raphael Guerois (CEA) et est représentée dans la figure 18.

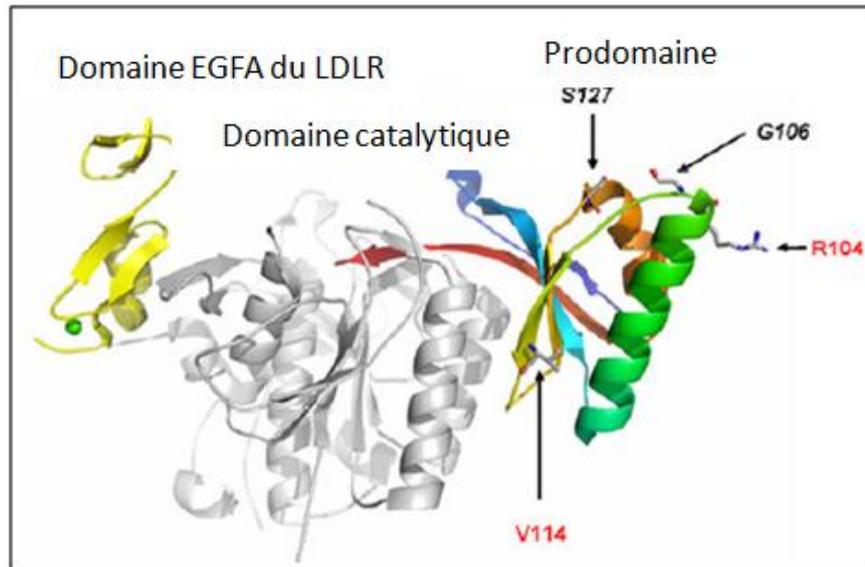


Figure 18 : Structure cristallographique et localisation des 2 mutations

Ces 2 mutations se situent dans le prodomaine, à distance du site catalytique. La mutation R104C est plutôt dans la partie hydrosoluble alors que la mutation V114A se situe dans le cœur hydrophobe du prodomaine. A l'inverse, la position externe de la mutation R104C peut faire envisager l'hypothèse d'une interaction potentielle avec un troisième partenaire modifiant l'interaction PCSK9-LDLR.

Cette analyse a été ensuite réalisée chez les autres membres de la famille. Sa sœur et sa fille présente la même double mutation (Figure 19). De plus, il est important de souligner que les analyses de microsatellites ont permis de mettre en évidence que le propositus et sa sœur possèdent le même allèle controlatéral.

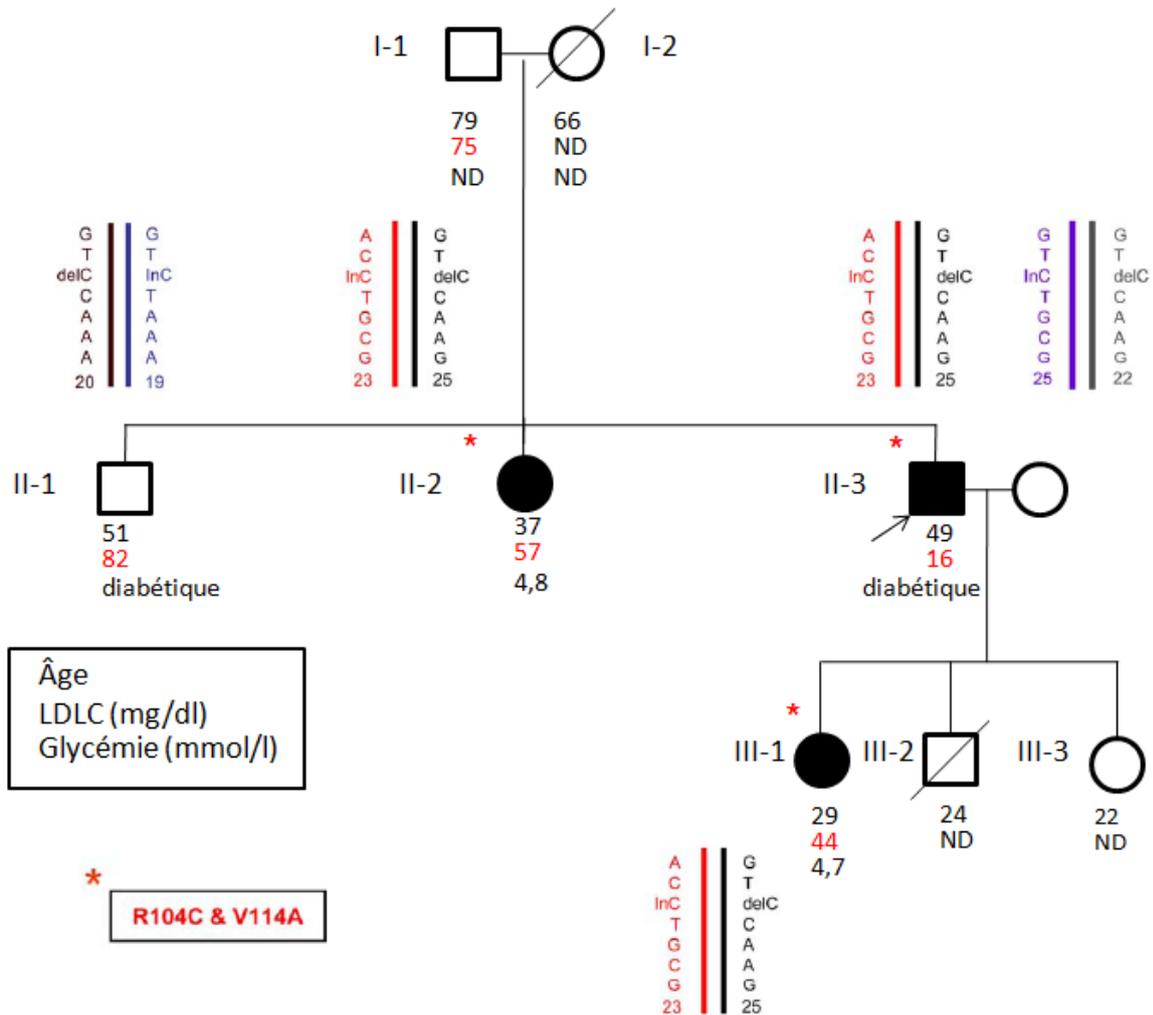


Figure 19 : Analyse génétique dans la famille

d. Analyses cellulaire et moléculaire

Des analyses complémentaires ont été réalisées au sein du laboratoire INSERM U915.

✓ Matériel et méthodes

Analyses in vitro :

1. Afin d'évaluer l'effet de ces 2 mutations sur la maturation et la sécrétion de PCSK9, des hépatocytes humains immortalisés (IHH) ont été transfectés avec des plasmides contenant différentes mutations de PCSK9 (*cf. infra*). Les protéines ont ensuite été extraites et quantifiées par la technique de western-blot.

2. Ensuite, l'intérêt s'est porté sur le fait que PCSK9 est à des niveaux indétectables chez le propositus alors que la double mutation se situe sur le même allèle. L'hypothèse est que cette double mutation agirait comme un dominant négatif sur l'allèle sauvage. Des IHH ont donc été co-transfectés avec à la fois la forme sauvage de PCSK9 et les différentes mutations de PCSK9.

Analyses in vivo: études cinétiques de l'apoB100.

Pour rappeler brièvement, l'apoB100 est la principale LP des LDL et des VLDL. Le métabolisme de l'apoB100 a été évalué en perfusant un acide aminé (la leucine) marquée avec un isotope stable (le deutérium). Ces analyses ont été réalisées après 12 heures de jeûne et les patients sont restés à jeun tout au long des 14 heures de l'infusion de leucine marquée. Des prélèvements veineux ont été effectués avant l'injection et après ; à 15, 30, 45 minutes, 1, 1,5, 2 et 2,5 heures puis toutes les heures sur une durée totale de 14 heures.

Les LP ont été séparées par ultracentrifugation et l'apoB100 a été isolée par migration électrophorétique sur gel. Les acides aminés obtenus par hydrolyse ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse.

Le calcul des taux de production et de catabolisme est réalisé à l'aide du ratio traceur/tracé grâce à une modélisation mathématique.

✓ *Résultats in vitro*

L'effet des mutations R104C et V114A sur la maturation et la sécrétion de PCSK9 ont été étudiées in vitro. Ces mutants ont été transfectés dans des IHH, ainsi que la forme sauvage de PCSK9 et le mutant catalytiquement inactif S386A, servant donc respectivement de contrôles positif et négatif.

Concernant la maturation de PCSK9, l'analyse en western-blot des lysats cellulaires provenant des hépatocytes transfectés par du PCSK9 sauvage retrouve deux bandes à 73 et 64 kDa correspondant à la forme pro-PCSK9 et à la forme mature ; de même, les cellules transfectées avec la forme mutée S386A expriment uniquement la forme pro-PCSK9. En comparant aux niveaux d'expression de la forme sauvage, l'activité autocatalytique du mutant R104C est diminuée et celle du

mutant V114A est abolie. Enfin, la combinaison des 2 mutations abolit complètement le clivage autocatalytique, de façon comparable à la mutation S386A (Figure 20).

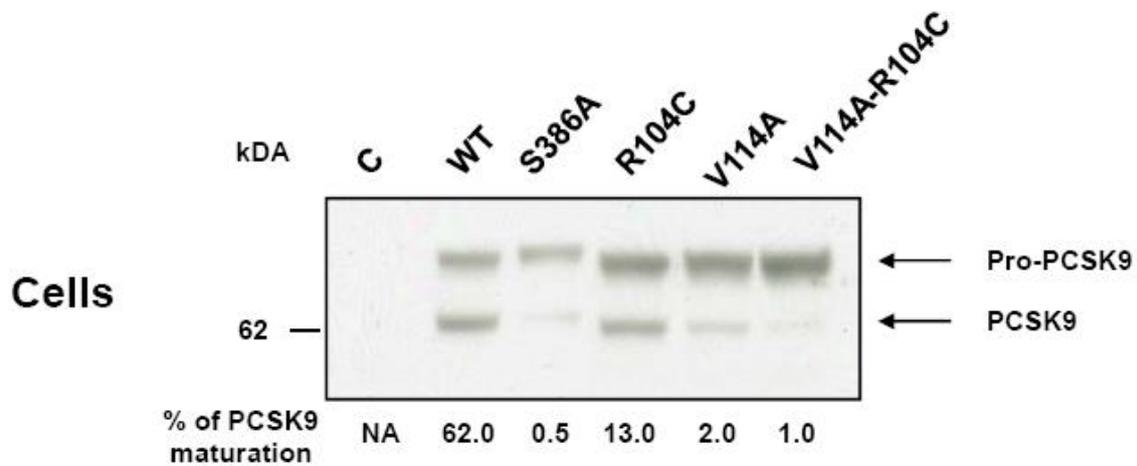


Figure 20 : Western-blot sur les lysats cellulaires

Les mêmes analyses ont été réalisées sur les milieux de culture afin de mesurer l'effet des mutations sur la sécrétion de PCSK9. Les cellules exprimant le mutant catalytiquement inactif S386A sécrètent la forme non clivée de PCSK9. En comparaison de la forme sauvage, la mutation R104C réduit modestement la sécrétion alors que la mutation V114A la diminue de façon plus importante. La combinaison de ces 2 mutations résulte en une absence de détection de PCSK9 dans le milieu (Figure 21).

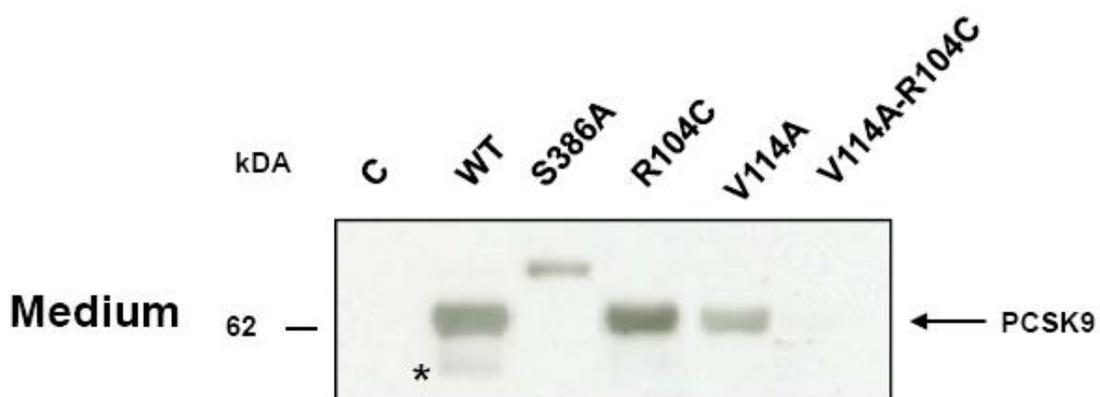


Figure 21 : Western-blot sur les milieux de culture

Ces résultats indiquent donc que l'association des 2 mutations conduit à un défaut de maturation et de sécrétion *in vitro* de PCSK9.

Par la suite, la co-expression de la forme sauvage de PCSK9 et des différentes mutations ont permis de montrer que la double mutation agit comme un dominant négatif sur l'allèle sauvage. En effet, individuellement, les mutations R104C et V114A n'ont pas d'effet sur la maturation ou la sécrétion de la forme sauvage de PCSK9. Par contre, la double mutation modifie la sécrétion de PCSK9 (Figure 22).

A noter que les mêmes expériences ont été réalisées avec les mutations perte de fonction S386A et gain de fonction S127R et D374Y : aucune de ces mutations n'altère la maturation ou la sécrétion de la forme sauvage de PCSK9, soulignant bien la particularité de cette double mutation.

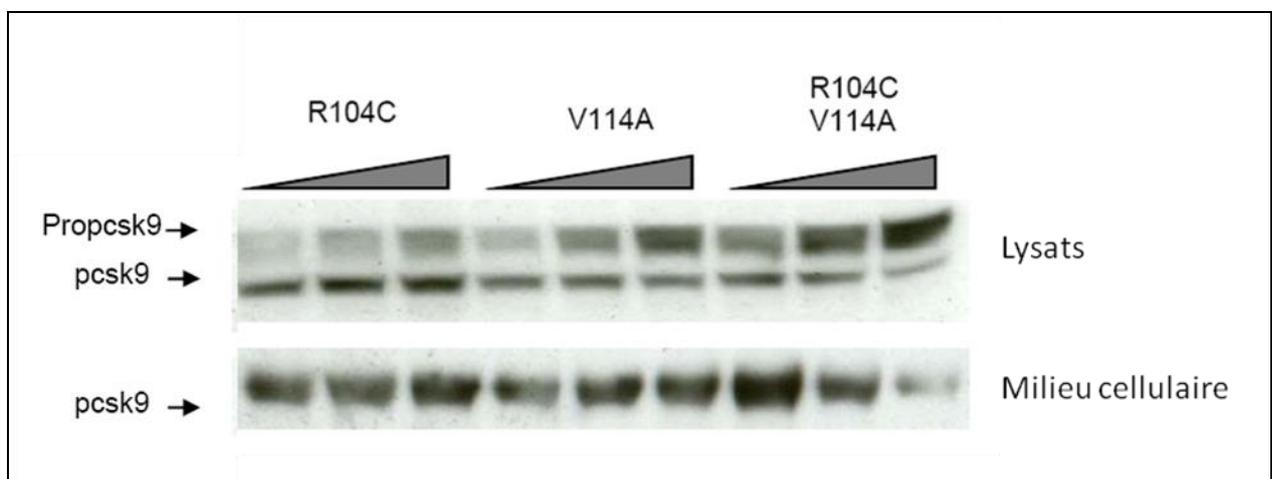


Figure 22 : Effets des mutations sur la forme sauvage de PCSK9

✓ Résultats *in vivo*

Des études de cinétiques concernant les LP contenant l'apoB100 ont ensuite été menées afin de montrer que la double mutation R104C/V114A altère le métabolisme des LDL *in vivo*. Ces analyses ont été réalisées chez le propositus (II-3) et sa fille (III-1), ainsi que chez 11 sujets contrôles âgés de 34 ± 12 ans avec un IMC de $26 \pm 4,4$ kg/m².

Pour le propositus, la production d'apoB100 est réduite d'environ 25% par rapport aux témoins ; ceci étant en rapport avec une moindre incorporation d'apoB100 dans les VLDL. Le taux de catabolisme de ces LP est supérieur à celui des contrôles, particulièrement pour les LDL (augmentation de 256%).

Pour sa fille (III-1), la production d'apoB100 est augmentée de 88% par rapport aux sujets témoins avec une proportion d'apoB100 dans chaque LP similaire aux

contrôles. Comme pour le sujet III-1, le taux de catabolisme est augmenté pour les VLDL, IDL et LDL (+88%).

Ces données indiquent que les niveaux bas de LDLC associés à l'inactivation de PCSK9 sont la conséquence d'une augmentation du catabolisme des particules à ApoB, et notamment du LDLC, secondaire à une probable augmentation des niveaux d'expression du LDLR hépatique.

2. Cas n°2

a. Présentation clinique

Mr Z, né le 01/10/1943 présente une hypocholestérolémie avec un cholestérol total à 0,81g/l, ce bilan sera détaillé ci-après.

Parmi ses antécédents, on note une hypertension artérielle, un diabète de type 2 depuis 2004.

L'examen clinique est sans particularité.

Concernant le diabète : il est connu depuis 2004, avec sur le plan des complications, une neuropathie débutante. Son traitement actuel comprend une bithérapie (metformine, Glucophage® 850 X3 et glimépiride, Amarel® 6mg) avec un équilibre métabolique insatisfaisant puisque l'HbA1c est à 7,9%.

	Biologie	Normes
HbA1c (%)	7,9	< 6 %
Créatininémie (µmol/l)	80	62 à 106
BH		
ASAT (µkat/l)	0,36	0 à 0,6
ALAT (µkat/l)	0,33	0 à 0,7
GGT (µkat/l)	1,39	0 à 1
Phosphatase alcaline (µkat/l)	1,31	0,9 à 2,15
Bilan lipidique		
CT (g/l)	0,81	< 2,2
LDLC (g/l)	0,05	< 1,9
HDLC (g/l)	0,17	> 0,40
TG (g/l)	2,88	< 1,5

Tableau 5 : Analyses biologiques

b. Bilan lipidique et analyse génétique

✓ Bilan lipidique

Le bilan lipidique retrouve un CL total à 0,81 g/l avec un LDLC effondré à 0,05g/l. Le HDLC est à 0,17g/L et les TG sont à 2,88 g/l. L'apoB est à 0,53g/l et l'apoA1 est à 1,4g/l.

Le dosage des vitamines liposolubles met en évidence des taux de vitamine A, E et K normaux. Il existe une carence en vitamine D (Tableau 6).

Vitamine A (mg/l)	0,87	0,4 à 0,9
Vitamine D (ng/ml)	< 4	30 à 60
Vitamine E (mg/l)	15,5	7 à 14
Vitamine K (ng/l)	177	150 à 900
Echographie abdominale	Hépatomégalie stéatosique	

Tableau 6 : Vitamines liposolubles et échographie hépatique

✓ Analyse génétique

Ces analyses ont donc conduit à la réalisation d'un arbre généalogique (Figure 23)

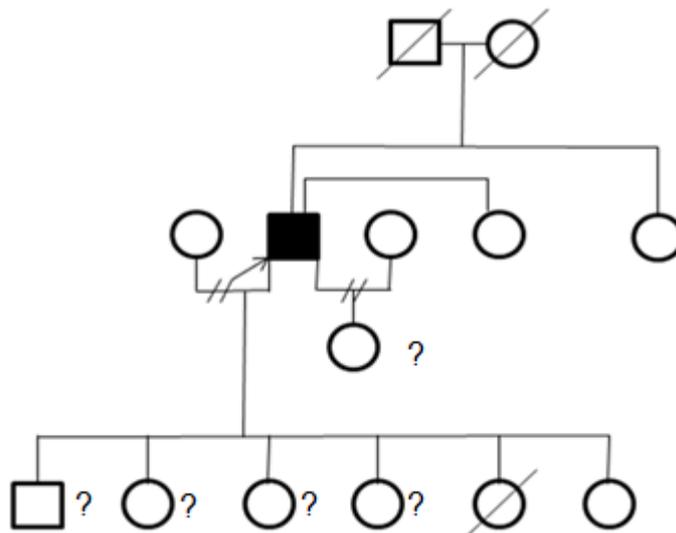


Figure 23 : Arbre généalogique

L'analyse génétique du propositus a mis en évidence une mutation hétérozygote de l'intron 6. La substitution nucléotidique est responsable de la création d'un site cryptique d'épissage. En effet, l'incorporation de 32 nucléotides introniques insérerait potentiellement 24 acides aminés anormaux générant un codon STOP en position

357. Ceci n'a pas été confirmé *in vitro* dans des hépatocytes jusqu'à présent (puisqu'il n'y a pas eu de transfection de la forme mutée).

Le séquençage du gène de l'apoB n'a pas mis en évidence de mutation.

Seulement la plus jeune de ses filles a pu être explorée : son bilan lipidique est normal et elle ne présente pas la mutation.

3. Cas n° 3

a. Présentation clinique

Mme R, née le 29/07/1941 au Portugal, présente une hypocholestérolémie avec un cholestérol total à 1,11g/l.

Parmi ses antécédents, on note une hépatite C connue depuis une dizaine d'années, initialement traitée par Ribavirine® et interféron, une hypertension artérielle traitée par valsartan, Tareg® 80mg/j et un diabète de type 2.

L'examen clinique est normal.

Concernant le diabète, il a été découvert en 1993 devant un syndrome cardinal et insulino-traité dès le diagnostic. Il s'agit d'un diabète de type 2 devant les arguments suivants : présence d'une obésité puisque son IMC est à 31 (1m55 et 74,9kg), d'un antécédent familial (une de ses sœurs est diabétique traitée par antidiabétiques oraux) et l'absence de marqueur d'autoimmunité (Ac antiGAD négatifs). Actuellement, son traitement comprend : Lantus 27 unités/j et Apidra 14 unités/j (2-6-6) associé à de la metformine, Glucophage® 500mg/j, l'HbA1c était à 7,9% en mars 2009. Le bilan des complications microangiopathiques est négatif hormis la présence d'une neuropathie sensitive débutante. Sur le plan macroangiopathique, la scintigraphie myocardique réalisée en 2008 retrouve une insuffisance coronaire débutante. Il n'y a pas de signe d'artériopathie des membres inférieurs et les index de pression systoliques sont à 1,22 à gauche et 1,43 à droite.

Les analyses biologiques sont résumées dans le tableau 7.

	Biologie	Normes
HbA1c (%)	7,7	< 6 %
Créatininémie (µmol/l)	60	44 à 80
BH		
ASAT (µkat/l)	0,92	0 à 0,6
ALAT (µkat/l)	1,1	0 à 0,7
GGT (µkat/l)	0,3	0 à 1
Phosphatase alcaline (µkat/l)	2,56	0,9 à 2,15
Bilan lipidique		
CT (g/l)	1,11	< 2,2
LDLC (g/l)	0,44	< 1,9
HDLC (g/l)	0,57	> 0,40
TG (g/l)	0,59	< 1,5

Tableau 7 : Analyses biologiques

b. Bilan lipidique et analyse génétique

✓ *Bilan lipidique*

Le bilan lipidique met donc en évidence un CT à 1,11 g/l avec un LDLC abaissé à 0,44 g/l. Le HDLC est à 0,57 g/L et les TG sont à 0,59 g/l. L'apoB est à 0,3 g/l et l'apoA1 à 1,5 g/l. Ces résultats ont amené à réaliser une enquête familiale. L'arbre généalogique est résumé dans la figure 24.

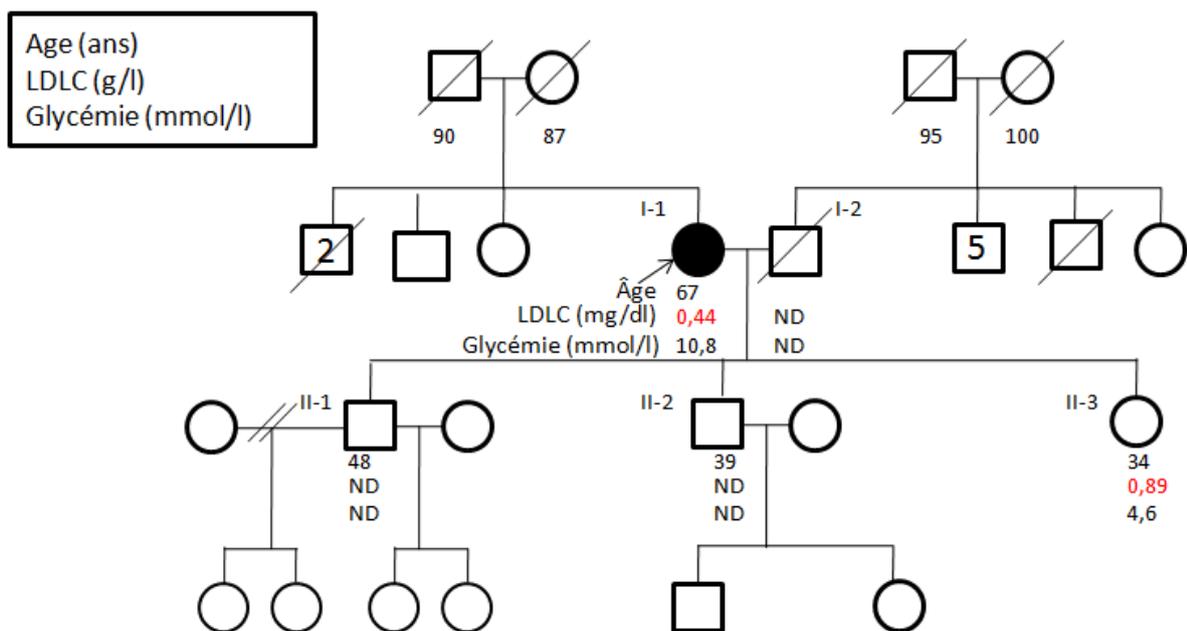


Figure 24 : Arbre généalogique

✓ Analyse génétique

L'analyse génétique met en évidence une mutation hétérozygote R237W au niveau de l'exon 5, dans le site catalytique.

Une de ses filles, normolipidémique, a bénéficié de l'analyse génétique, qui s'est avérée négative.

VII. Discussion

1. Aspect génétique

a. Cas n°1 et impact sur le métabolisme du CL

Le cas rapporté est donc celui d'une FHBL en rapport avec une double mutation de PCSK9 sur le même allèle: les porteurs de la mutation sont hétérozygotes R104C et V114A. Chacune de ces mutations a déjà été rapportée dans la littérature mais de façon individuelle. La mutation R104C a été décrite à l'état hétérozygote chez un individu hypercholestérolémique (LDLC à 1,92 g/l), originaire de la région d'Osaka ⁷⁴. La mutation V144A a été rapportée, elle aussi, à l'état hétérozygote chez un individu hypocholestérolémique (LDLC à 0,47 g/l), originaire de Sicile ⁷¹.

Ces 2 mutations sont donc rares et il s'agit du premier cas décrit les associant.

L'impact de cette double mutation sur le métabolisme du LDLC a été évalué grâce à des analyses *in vitro* et *in vivo*. Pour la première fois, des études de cinétiques des LP ont permis de montrer une accélération du catabolisme des LDL, *in vivo* chez l'homme, en rapport vraisemblablement avec une surexpression du LDLR hépatique. Les données ne sont pas aussi claires concernant la production des LP contenant l'apoB100 : cette production est diminuée chez le propositus, alors que chez sa fille, elle est augmentée. Une des explications proposée serait que les hormones sexuelles pourraient modifier la cinétique des LP : les estrogènes augmenteraient la production d'apoB100 alors que les androgènes l'atténueraient. Récemment 2 études cliniques ont rapportées que les niveaux circulants de PCSK9 sont corrélés à la concentration de TG ^{60, 80}. De plus, le statut diabétique du propositus pourrait modifier le catabolisme des LP. En effet, des études de cinétiques des LP ont

rapporté que le catabolisme des LP est diminué de 20 à 30% chez les sujets diabétiques^{81, 82}. Mais, il est important de noter qu'au cours de nos études de cinétiques, Mr D présentait un diabète très bien équilibré par régime seul puisque l'HbA1c était de 5,6%. De plus, malgré cette « normoglycémie », ses concentrations plasmatiques de LDLC sont restées extrêmement basses.

Un autre point à souligner est la différence phénotypique existant entre, d'une part, le cas index qui présente une hypocholestérolémie sévère et d'autre part, sa sœur et sa fille, porteuses de la même mutation, mais avec une hypocholestérolémie plus modérée. La première hypothèse avancée pour expliquer cette différence pourrait être la différence de production d'apoB100, diminuée chez le propositus et augmentée chez sa fille. Ces explorations cinétiques n'ont pas pu être réalisées chez la sœur du propositus et donc ne permettent pas de confirmer l'augmentation de production d'apoB100. La deuxième hypothèse serait qu'il existe une mutation non identifiée de PCSK9, qui empêcherait donc l'expression de PCSK9. Cette hypothèse ne semble pas plausible. En effet, le propositus et sa sœur ont le même génotype et les mêmes haplotypes parentaux, excluant donc la possibilité d'une mutation non identifiée de PCSK9 sur l'autre allèle. De plus, la sœur et la fille ont toutes les 2 une hypocholestérolémie modérée avec chacune un deuxième allèle différent. L'hypothèse de la présence d'une mutation sur l'autre allèle, qui altérerait l'expression de PCSK9 semble donc peu crédible. La troisième hypothèse serait que la double mutation pourrait agir comme un dominant négatif, inhibant la synthèse de PCSK9 par l'allèle non muté. Cela pourrait expliquer que cet allèle reste silencieux chez le propositus alors que sa fonction semble préservée chez sa sœur et sa fille. En effet, les études *in vitro* ont montré qu'en co-transfectant des IHH avec la forme sauvage de PCSK9 et les différents mutants, uniquement la double mutation R104C/V114A agissait comme un dominant négatif sur la sécrétion de PCSK9. Il existe différents exemples de pathologies humaines, avec des mutations agissant comme des dominants négatifs, où la pénétrance et l'expressivité sont différentes chez les porteurs hétérozygotes (exemple : mutation PPAR gamma⁸³). Le mécanisme moléculaire sous-jacent reste encore imprécis.

La double mutation R104C/V114A est donc le premier exemple d'une mutation perte de fonction de PCSK9 agissant comme un dominant négatif. Ce cas renforce l'intérêt

d'une inhibition de PCSK9 pour diminuer les taux de LDLC en augmentant leur clearance.

b. Cas n°2 et 3

Le cas n°2 présente une mutation hétérozygote de l'intron 6. La substitution nucléotidique est responsable de l'incorporation de 32 nucléotides introniques. Ceci pourrait donc insérer 24 acides aminés anormaux générant un codon STOP en position 357.

La mutation R237W identifiée dans le cas n°3 a déjà été décrite chez des sujets normolipidémiques⁵¹; elle n'a pas été rapportée au cours d'étude de populations hypercholestérolémiques^{43, 61, 69, 73}. Par contre, cette mutation a été retrouvée chez un patient norvégien présentant une hypocholestérolémie⁶⁴.

Il sera donc très intéressant de pouvoir réaliser des analyses complémentaires chez ces patients, et notamment des études cinétiques. En effet, la patiente du cas n°2 présente une mutation hétérozygote de PCSK9 associée à des concentrations plasmatiques de LDLC très basses. Ceci renforce donc l'intérêt des explorations car cela pourrait permettre de confirmer l'effet dominant négatif et l'implication potentielle d'un troisième partenaire dans l'interaction PCSK9-LDLR.

2. Mutation perte de fonction de PCSK9 et comorbidités

a. Atteinte hépatique, malabsorption et HBL

Au cours de l'ABL, de la maladie d'Anderson et des FHBL liées à des mutations de l'apoB, il existe une altération de la sécrétion des VLDL conduisant à une accumulation de TG intrahépatiques et donc à des lésions de stéatose hépatique. Récemment, 2 études ont permis de confirmer cette atteinte hépatique : le contenu de graisse hépatique, évaluée par IRM, est significativement plus élevé chez les sujets présentant une FHBL, par rapport aux sujets contrôles^{34, 35}. L'évolution et le pronostic de cette stéatose hépatique ne sont actuellement pas connus, aucune étude n'ayant été menée sur le long terme.

De plus, ces pathologies sont associées à une malabsorption des vitamines liposolubles (A, D, E et K)⁷⁷.

Concernant les FHBL liée à PCSK9, le mécanisme physiopathologique est différent. Aucun cas d'atteinte hépatique n'a été rapporté. Dans l'étude de la DHS, le contenu hépatique en TG a été évalué par IRM : les résultats obtenus sont similaires entre les sujets porteurs d'une mutation perte de fonction de PCSK9 et le reste de la population ³⁷. Dans les 3 familles décrites au cours de ce travail, le bilan hépatique est normal et l'échographie abdominale retrouve une probable stéatose hépatique chez 2 patients. Mais il faut souligner que tous nos sujets index sont diabétiques avec un surpoids ou une obésité, qui sont des facteurs favorisant la stéatose hépatique.

Actuellement, la malabsorption n'a jamais été rapportée chez des sujets porteurs d'une mutation de PCSK9. Les patients de nos 3 cas cliniques n'ont pas de symptomatologie évocatrice d'une malabsorption (croissance staturo-pondérale normale, pas de diarrhée) et ont des concentrations vitaminiques normales.

b. Atteinte cardiovasculaire et HBL

Les patients avec une HBL peuvent être assimilés à un modèle de « traitement hypocholestérolémiant intensif ». Les grandes études cliniques évaluant l'impact d'un traitement par statine sur le risque de survenue de maladie cardiovasculaire mettent en évidence un bénéfice net en faveur du groupe traité, ayant donc les niveaux de LDLC les plus bas. Peu d'études ont été menées chez les patients avec HBL. Une étude concernant des patients avec FHBL n'a pas pu mettre en évidence de différence sur l'épaisseur intima-média carotidienne ; la seule différence significative concernait l'épaisseur artérielle carotidienne qui était diminuée dans le groupe FHBL par rapport aux contrôles ³⁸.

Les sujets porteurs d'une mutation perte de fonction de PCSK9 présentent eux-aussi une hypocholestérolémie dès l'enfance et sont donc exposés toute leur vie à des concentrations de LDLC abaissées ⁸⁴. Plusieurs études ont démontré une réduction de la survenue de maladies cardiovasculaires chez les sujets porteurs de mutation perte de fonction de PCSK9 ⁷⁵.

c. PCSK9 et maladies neurodégénératives

Dans les neurones, la protéase BACE1 (β -site amyloid precursor protein APP-cleaving enzyme 1) est responsable la production de l'amyloïde β . La maladie d'Alzheimer, pathologie neurodégénérative, est fortement associée à l'accumulation de l'amyloïde β , qui s'agrège et forme des dépôts amyloïdes neurotoxiques dans le cerveau des patients ⁸⁵. Une équipe a démontré que BACE1 est acétylée au cours de sa maturation post-RE, et que seule la forme acétylée atteint la membrane cellulaire. La forme non acétylée est dégradée par un mécanisme intracellulaire, où PCSK9 pourrait être jouer un rôle : les souris invalidées pour PCSK9 présentent plus de protéines BACE1 dans le néocortex et une plus grande quantité d'amyloïde β ⁸⁶.

Il est très intéressant de mettre en parallèle que la mère du propositus du cas n°1 est décédée à l'âge de 66 ans d'une démence (maladie d'Alzheimer ?).

Ces données doivent, néanmoins, être pondérées par le fait qu'il n'a pas été décrit de cas de démence chez les sujets porteurs d'HBL secondaires à des mutations de PCSK9.

En conclusion, il semble que les FHBL liées à des mutations de PCSK9 soient dénuées des co-morbidités communément décrites au cours des autres HBL : absence de malabsorption et pas de stéatose hépatique. De plus, l'exposition tout au long de la vie à des concentrations réduites de LDLC est un facteur de protection cardiovasculaire. Concernant, la survenue de maladies neurodégénératives, les études doivent être poursuivies avant de pouvoir conclure.

C'est pourquoi se développent actuellement, dans le cadre des hypercholestérolémies, des inhibiteurs de PCSK9 en association au traitement par statines.

3. PCSK9 et diabète

Une des questions non résolues est le lien potentiel entre les mutations de PCSK9 et la survenue d'un diabète.

En effet, il est établi que l'exposition prolongée des cellules β à des concentrations élevées d'acides gras entraîne des modifications de l'expression de gènes du

métabolisme du glucose, ainsi qu'une augmentation de production des radicaux libres, ce qui induit une apoptose de la cellule β .

Récemment, des études expérimentales ont fait état d'un lien entre le métabolisme du CL et la fonction β cellulaire. Chez la souris, la surexpression de SREBP2 (facteur de transcription qui stimule la synthèse endogène de CL) spécifiquement dans la cellule β est donc responsable d'une augmentation des concentrations en CL dans les îlots. Ceci a comme conséquence principale de rendre ces souris diabétiques ⁸⁷. De même, il a été mis en évidence une altération de la sécrétion d'insuline dans les cellules β de souris hypercholestérolémiques (les souris invalidées pour l'apo-E) ⁸⁸.

Les concentrations intracellulaires en CL ne sont pas seulement régulées par la synthèse en CL mais également par son efflux. Le transporteur membranaire ABCA1 est impliqué dans le transport inverse du CL, puisqu'il permet l'efflux du CL de la cellule vers les HDL. Chez l'homme, les mutations homozygotes de ABCA1 sont responsables de la maladie de Tangier caractérisée par une incapacité à éliminer le CL cellulaire, et donc des niveaux bas de HDLC et un risque accru de maladies coronariennes ⁸⁹. A l'heure actuelle, il n'y a pas de donnée prouvant un lien entre cette maladie et le métabolisme glucidique. Néanmoins, il existe des polymorphismes de ABCA1 associés au diabète de type 2 dans plusieurs groupes ethniques ⁹⁰. *In vivo*, ABCA1 est détecté dans le pancréas entier à de faibles niveaux d'expression, mais il est fortement exprimé dans les îlots de Langerhans. En générant des souris invalidées pour ABCA1 spécifiquement dans la cellule β , il n'y a pas d'altération du métabolisme du CL : en effet, ces souris ont des concentrations plasmatiques de CL identiques aux souris sauvages. Par contre, ces souris développent une intolérance au glucose associée à des troubles de la sécrétion d'insuline *in vivo* (altération de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose des îlots). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle délétère de l'accumulation intracellulaire du cholestérol pour la sécrétion d'insuline ⁹⁰.

Chez l'homme, il existe très peu d'études cliniques attestant d'un lien entre le métabolisme du CL et la survenue d'un diabète. Quelques données proviennent d'une analyse post-hoc de l'étude WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) ⁹¹ : en effet, le traitement par la pravastatine diminue l'incidence du diabète de type 2 de 30%. Plus récemment l'étude JUPITER (Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin)

retrouve une augmentation de l'incidence des cas de diabète dans le groupe de patients traités pas rosuvastatine ⁹².

L'ensemble de ces données indique que la modification du contenu en CL de la cellule β influence la sécrétion d'insuline.

Concernant PCSK9, il est important de rappeler que sa synthèse est stimulée par l'insuline ⁶³. Par ailleurs, le LDLR, cible de PCSK9, est exprimé et fonctionnel dans la cellule β ^{93, 94}. Une étude a montré que l'expression de PCSK9 est effondrée dans un modèle de rat diabétique (diabète induit par la STZ) ⁹⁵. Chez l'homme, aucune donnée clinique ne lie les mutations de PCSK9 à un trouble de la glucorégulation. Néanmoins, très récemment, des études cliniques ont montré une corrélation positive entre les taux circulants de PCSK9 et la glycémie à jeun ⁶⁰.

La question de savoir si PCSK9 peut moduler indirectement la sécrétion d'insuline en altérant le métabolisme du CL reste actuellement sans réponse.

Les cas index de nos 3 familles sont tous diabétiques. Mais, il serait un peu rapide de conclure à un lien entre mutation perte de fonction de PCSK9 et survenue d'un diabète. Cette association semble plus vraisemblablement en rapport avec un biais de recrutement.

VIII. Conclusion

L'identification de PCSK9 a apporté de nouveaux éléments pour la compréhension de l'homéostasie du CL. Les données cliniques ont permis de démontrer que les sujets présentant des mutations perte de fonction de PCSK9 ont des concentrations plasmatiques de LDLC abaissées et sont protégés de la survenue de maladie cardiovasculaire. Par contre, les sujets ayant une mutation gain de fonction de PCSK9 sont hypercholestérolémiques avec un risque accru de maladies cardiovasculaires.

Les 3 cas cliniques décrits présentent tous une hypobétalipoprotéïnémie en lien avec une mutation de PCSK9. Des analyses *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées pour le sujet n°1 permettant de mieux caractériser l'impact de sa mutation sur le métabolisme du CL. Il est d'ailleurs très intéressant de souligner l'originalité de cette double mutation hétérozygote R104C/V114A qui semble agir comme un dominant négatif sur l'allèle sauvage. Ces analyses n'ont malheureusement pas pu être menées pour les 2 autres cas. Enfin, le fait que ces 3 cas soient diabétiques semble plutôt être la conséquence d'un biais de recrutement (via le service de diabétologie), même si quelques données d'études à la fois fondamentales et cliniques suggèrent un lien potentiel entre PCSK9 et diabète, qui nécessite d'être précisé par des études complémentaires.

Certes, les nombreuses études réalisées ces dernières années ont permis de mieux cerner l'implication de PCSK9 dans le métabolisme du CL. Cependant, il reste encore à explorer les autres rôles potentiels de PCSK9 ; même si l'absence de comorbidité chez les patients atteints est rassurant. Actuellement, différentes équipes travaillent entre autres sur le rôle de PCSK9 dans l'intestin ⁵⁹, son implication dans l'inflammation ⁹⁶, et dans le contrôle de certaines infections virales comme l'hépatite C ⁹⁷.

Enfin, l'ensemble de ces données ont permis de faire émerger une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des hypercholestérolémies. En effet, les statines en représentent actuellement le traitement de choix. Cette classe thérapeutique agit en augmentant la synthèse du LDLR et il a été montré qu'elle induisait l'expression de PCSK9. Ceci pourrait représenter un frein à l'action des statines et c'est pourquoi il

est légitime de penser qu'une association statines-inhibiteurs de PCSK9 pourrait potentialiser l'effet hypocholestérolémiant des statines.

IX. Bibliographie

1. Heiss G, Johnson NJ, Reiland S, Davis CE, Tyroler HA. The epidemiology of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels. The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. Summary. *Circulation*. 1980 Nov;62(4 Pt 2):IV116-36.
2. Contois JH, McNamara JR, Lammi-Keefe CJ, Wilson PW, Massov T, Schaefer EJ. Reference intervals for plasma apolipoprotein B determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem*. 1996 Apr;42(4):515-23.
3. Welty FK, Lahoz C, Tucker KL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ. Frequency of ApoB and ApoE gene mutations as causes of hypobetalipoproteinemia in the framingham offspring population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Nov;18(11):1745-51.
4. Linton MF, Farese RV, Jr., Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 1993 Apr;34(4):521-41.
5. Shoulders CC, Brett DJ, Bayliss JD, Narcisi TM, Jarmuz A, Grantham TT, et al. Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein. *Hum Mol Genet*. 1993 Dec;2(12):2109-16.
6. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, et al. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992 Nov 6;258(5084):999-1001.
7. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:663-97.
8. Collins JC, Scheinberg IH, Giblin DR, Sternlieb I. Hepatic peroxisomal abnormalities in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. 1989 Sep;97(3):766-70.
9. Suarez L, Valbuena ML, Moreno A, Santonja C, Gonzalez-Palacios F, Camarero C, et al. Abetalipoproteinemia associated with hepatic and atypical neurological disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1987 Sep-Oct;6(5):799-802.
10. Gharib H, Fairbanks VF, Bartholomew LG. Hepatic failure with acanthocytosis: association with hemolytic anemia and deficiency of erythrocyte glutathione peroxidase. *Mayo Clin Proc*. 1969 Feb;44(2):96-101.
11. Avigan MI, Ishak KG, Gregg RE, Hoofnagle JH. Morphologic features of the liver in abetalipoproteinemia. *Hepatology*. 1984 Nov-Dec;4(6):1223-6.
12. Braegger CP, Belli DC, Mentha G, Steinmann B. Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinaemia after liver transplantation. *Eur J Pediatr*. 1998 Jul;157(7):576-8.
13. Tanyel MC, Mancano LD. Neurologic findings in vitamin E deficiency. *Am Fam Physician*. 1997 Jan;55(1):197-201.
14. Sobrevilla LA, Goodman ML, Kane CA. DEMYELINATING CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASE, MACULAR ATROPHY AND ACANTHOCYTOSIS (BASSEN-KORNZWEIG SYNDROME). *Am J Med*. 1964 Nov;37:821-8.
15. Segal S, Sharma S. Ophthalmic problem. Vitamin A and vitamin E. *Can Fam Physician*. 2005 Aug;51:1079, 85-6.
16. Gaudet LM, MacKenzie J, Smith GN. Fat-soluble vitamin deficiency in pregnancy: a case report and review of abetalipoproteinemia. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006 Aug;28(8):716-9.

17. Illingworth DR, Connor WE, Miller RG. Abetalipoproteinemia. Report of two cases and review of therapy. *Arch Neurol*. 1980 Oct;37(10):659-62.
18. Chowers I, Banin E, Merin S, Cooper M, Granot E. Long-term assessment of combined vitamin A and E treatment for the prevention of retinal degeneration in abetalipoproteinemia and hypobetalipoproteinemia patients. *Eye*. 2001 Aug;15(Pt 4):525-30.
19. Kayden HJ. The genetic basis of vitamin E deficiency in humans. *Nutrition*. 2001 Oct;17(10):797-8.
20. Muller DP, Lloyd JK, Wolff OH. The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinemia and other disorders of fat absorption. *J Inher Metab Dis*. 1985;8 Suppl 1:88-92.
21. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):29-31.
22. Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jun;62(12):1372-8.
23. Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42(5-6):515-45.
24. Fouchier SW, Sankatsing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Alonso R, et al. High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J Med Genet*. 2005 Apr;42(4):e23.
25. Tarugi P, Averna M, Di Leo E, Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):e19-27.
26. Pulai JI, Neuman RJ, Groenewegen AW, Wu J, Schonfeld G. Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and non-linkage to the apoB gene in Caucasian families. *Am J Med Genet*. 1998 Feb 26;76(1):79-86.
27. Yuan B, Neuman R, Duan SH, Weber JL, Kwok PY, Saccone NL, et al. Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22. *Am J Hum Genet*. 2000 May;66(5):1699-704.
28. Neuman RJ, Yuan B, Gerhard DS, Liu KY, Yue P, Duan S, et al. Replication of linkage of familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p in six kindreds. *J Lipid Res*. 2002 Mar;43(3):407-15.
29. Parhofer KG, Barrett PH, Bier DM, Schonfeld G. Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein, Apo B-89, are cleared from human plasma more rapidly than Apo B-100-containing lipoproteins in vivo. *J Clin Invest*. 1992 Jun;89(6):1931-7.
30. Aguilar-Salinas CA, Barrett PH, Parhofer KG, Young SG, Tessereau D, Bateman J, et al. Apoprotein B-100 production is decreased in subjects heterozygous for truncations of apoprotein B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Jan;15(1):71-80.
31. Elias N, Patterson BW, Schonfeld G. Decreased production rates of VLDL triglycerides and ApoB-100 in subjects heterozygous for familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Nov;19(11):2714-21.
32. Elias N, Patterson BW, Schonfeld G. In vivo metabolism of ApoB, ApoA-I, and VLDL triglycerides in a form of hypobetalipoproteinemia not linked to the ApoB gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1309-15.
33. Parhofer KG, Barrett PH, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes. *J Lipid Res*. 1996 Apr;37(4):844-52.

34. Schonfeld G. Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *J Lipid Res.* 2003 May;44(5):878-83.
35. Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, Schonfeld G. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res.* 2004 May;45(5):941-7.
36. Yue P, Tanoli T, Wilhelm O, Patterson B, Yablonskiy D, Schonfeld G. Absence of fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia linked to chromosome 3p21. *Metabolism.* 2005 May;54(5):682-8.
37. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet.* 2006 Mar;78(3):410-22.
38. Sankatsing RR, Fouchier SW, de Haan S, Hutten BA, de Groot E, Kastelein JJ, et al. Hepatic and cardiovascular consequences of familial hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Sep;25(9):1979-84.
39. Moriyama Y, Okamura T, Inazu A, Doi M, Iso H, Mouri Y, et al. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med.* 1998 Sep-Oct;27(5 Pt 1):659-67.
40. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. Marked hyperalphalipoproteinemia caused by CETP gene mutation is not associated with longevity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Jun;17(6):1053-9.
41. Varret M, Abifadel M, Rabes JP, Boileau C. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 2008 Jan;73(1):1-13.
42. Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet.* 1999 May;64(5):1378-87.
43. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):154-6.
44. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4;100(3):928-33.
45. Lallanne F, Lambert G, Amar MJ, Chetiveaux M, Zair Y, Jarnoux AL, et al. Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res.* 2005 Jun;46(6):1312-9.
46. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. 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.* 2006 Oct 13;281(41):30561-72.
47. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res.* 2008 Jun;49(6):1303-11.
48. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 May;14(5):413-9.
49. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like

repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18602-12.

50. Costet P, Krempf M, Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*. 2008 Jul 29.

51. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):48865-75.

52. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 12;102(15):5374-9.

53. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 4;101(18):7100-5.

54. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):2995-3005.

55. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2007 Jul 20;282(29):20799-803.

56. Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*. 2004 Nov 26;279(48):50630-8.

57. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1448-53.

58. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, et al. 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*. 2006 Oct;147(10):4985-95.

59. Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 May;29(5):684-90.

60. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jul;94(7):2537-43.

61. Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 2005 May 1;14(9):1161-9.

62. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1454-9.

63. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*. 2006 Mar 10;281(10):6211-8.

64. Berge KE, Ose L, Leren TP. Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 May;26(5):1094-100.
65. Kourimate S, Le May C, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, et al. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11;283(15):9666-73.
66. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, et al. Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem.* 2008 Jun;54(6):1038-45.
67. Troutt JS, Alborn WE, Cao G, Konrad RJ. Fenofibrate treatment increases human serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) levels. *J Lipid Res.* 2009 Sep 8.
68. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008 Mar 19;582(6):949-55.
69. Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalu AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2006 Jun;186(2):433-40.
70. 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 Feb;37(2):161-5.
71. Fasano T, Cefalu AB, Di Leo E, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L, et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar;27(3):677-81.
72. Scartezini M, Hubbart C, Whittall RA, Cooper JA, Neil AH, Humphries SE. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men. *Clin Sci (Lond).* 2007 Dec;113(11):435-41.
73. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, Trillard M, Devillers M, Luc G, et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 2005 Nov;26(5):497.
74. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Yamamura T, et al. 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.* 2008 Jan;196(1):29-36.
75. 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 Mar 23;354(12):1264-72.
76. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis.* 2007 Aug;193(2):445-8.
77. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):514-23.
78. Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, Paquin J, Chitramuthu BP, Baranowski D, et al. Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem.* 2006 Aug;98(3):838-50.
79. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, et al. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem.* 2007 Oct;53(10):1814-9.

80. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, Jacques H, Hamelin J, Benjannet S, et al. A new method for measurement of total plasma PCSK9 - clinical applications. *J Lipid Res.* 2009 Jul 1.
81. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gambert P, Verges B. Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest.* 2000 Aug;30(8):685-94.
82. Ouguerram K, Magot T, Zair Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, et al. Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):332-7.
83. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):581-9.
84. Hallman DM, Srinivasan SR, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. Relation of PCSK9 mutations to serum low-density lipoprotein cholesterol in childhood and adulthood (from The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 2007 Jul 1;100(1):69-72.
85. Stockley JH, O'Neill C. The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem Soc Trans.* 2007 Jun;35(Pt 3):574-6.
86. Jonas MC, Costantini C, Puglielli L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep.* 2008 Jul 25.
87. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatah S, Kato T, Kumadaki S, Inoue N, et al. Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. *J Lipid Res.* 2008 Dec;49(12):2524-34.
88. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW. Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes.* 2007 Sep;56(9):2328-38.
89. Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:105-29.
90. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, VasANJI Z, et al. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):340-7.
91. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahan AD, Braund PS, Cheng S, et al. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J.* 2003 Oct;24(20):1833-42.
92. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet.* 2009 Apr 4;373(9670):1175-82.
93. Cnop M, Gruppig A, Hoorens A, Bouwens L, Pipeleers-Marichal M, Pipeleers D. Endocytosis of low-density lipoprotein by human pancreatic beta cells and uptake in lipid-storing vesicles, which increase with age. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):237-44.
94. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, et al. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):18368-75.
95. Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Feb 15;470(2):111-5.

96. Feingold KR, Moser AH, Shigenaga JK, Patzek SM, Grunfeld C. Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Sep 19;374(2):341-4.
97. Labonte P, Begley S, Guevin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 2009 Jul;50(1):17-24.
98. Kane JP, Havel JR. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B lipoproteins. *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. New York: Mc Graw Hill,1989:1164.

ANNEXE

PCSK9 Dominant Negative Mutant Results in Increased LDL Catabolic Rate and Familial Hypobetalipoproteinemia

Bertrand Cariou, Khadija Ouguerram, Yassine Zaïr, Raphael Guerois, Cédric Langhi, Sanae Kourimate, Isabelle Benoit, Cédric Le May, Constance Gayet, Khaldia Belabbas, Fabienne Dufemez, Maud Chétiveaux, Patrizia Tarugi, Michel Krempf, Pascale Benlian, Philippe Costet

P1-600

Objective—Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a central player in the regulation of cholesterol homeostasis, increasing the low-density lipoprotein (LDL) receptor degradation. Our study aimed at exploring the pathogenic consequences in vivo and in vitro of a PCSK9 prodomain mutation found in a family with hypobetalipoproteinemia (FHBL).

Methods and Results—A white 49-year-old diabetic man had profound FHBL (LDLC: 16 mg/dL) whereas his daughter and sister displayed a milder phenotype (LDLC 44 mg/dL and 57 mg/dL, respectively), all otherwise healthy with a normal liver function. A monoallelic *PCSK9* double-mutant R104C/V114A cosegregated with FHBL, with no mutation found at other FHBL-causing loci. A dose-effect was also found in FHBL relatives for plasma APOB and PCSK9 (very-low to undetectable in proband, ~50% decreased in sister and daughter) and LDL catabolic rate (256% and 88% increased in proband and daughter). Transient transfection in hepatocytes showed severely impaired processing and secretion of the double mutant which acted as a dominant negative over secretion of wild-type PCSK9.

Conclusion—These results show that heterozygous PCSK9 missense mutations may associate with profound hypobetalipoproteinemia and constitute the first direct evidence in human that decrease of plasma LDL concentrations associated to PCSK9 LOF mutations are attributable to an increased clearance rate of LDL. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:00-00.)

Key Words: PCSK9 ■ LDL ■ mutation ■ hypobetalipoproteinemia

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 (apoB) (ie, <5 percentile of the distribution in the population; for review see¹). HBL includes 3 inherited disorders: (1) familial hypobetalipoproteinemia (FHBL; OMIM 107730), (2) abetalipoproteinemia (ABL; OMIM 200100), and (3) chylomicron retention disease (CRD; OMIM 246700). The frequency of subjects with heterozygous FHBL has been estimated to be 1:5000; 1:1000.² FHBL heterozygotes are often asymptomatic or express mild clinical manifestations such as fatty liver disease and intestinal fat malabsorption.³ FHBL are often caused by *APOB* gene mutations.^{1,4} However, a substantial number of FHBL (varying to 36%¹ to 56%⁵ in the literature) do not harbor apoB mutations.

In the last 5 years, proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) has emerged as a crucial modulator of cholesterol

metabolism.⁶ PCSK9 is primarily expressed in the liver and the intestine. PCSK9 inhibits the LDL receptor (LDLR) pathway in a posttranscriptional manner.⁶ In human, PCSK9 was initially reported as the third gene causing autosomal dominant hypercholesterolemia, in addition to LDLR and *APOB* mutations.⁷ Indeed, *PCSK9* gain-of-function (GOF) mutations lead to increased plasma LDLC levels and premature atherosclerosis.^{7,8} In contrast, *PCSK9* loss-of-function (LOF) mutations are associated with low LDLC levels and protection against coronary diseases.^{9,10} To date, only 2 individuals fully deficient in PCSK9 have been identified with LOF mutations causing very low plasma LDLC (14 mg/dL and 15 mg/dL).^{11,12} 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.⁶

Received July 10, 2009; revision accepted September 9, 2009.

From INSERM, U915 (B.C., K.O., Y.Z., C.L., S.K., I.B., C.L.M., C.G., M.C., M.K., P.C.), Nantes, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'Institut du Thorax (B.C., K.O., Y.Z., C.L., S.K., I.B., M.C., M.K.), Nantes, France; Clinique d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, l'Institut du Thorax (B.C., Y.Z., M.K., P.C.), Nantes, France; Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, iBiTec-S (R.G.), CEA, Gif sur Yvette, France; APHP, Hôpital Saint-Antoine, Biochimie B, Laboratoire de Référence pour le Diagnostic Génétique des Maladies Rares (K.B., F.D., P.B.), Paris, France; UPMC Univ Paris 06, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire (P.B.), Paris, France; and the Department of Biomedical Sciences (P.T.), University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy.

AQ: 4

B.C. and K.O. contributed equally to this study.

Correspondence to Philippe Costet, IRTUN L'Institut du Thora-UMR915, 8, Quai Moncoussu BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France. E-mail Philippe.costet@univ-nantes.fr

© 2009 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.194191

1

<zjs;Original Article> • <zjss;> • <zdo;10.1161/ATVBAHA.109.194191>

In this study, we identified and characterized a novel PCSK9 LOF double mutant that acts as a dominant negative. By performing lipoprotein kinetics, we demonstrated for the first time that FHBL linked to PCSK9 deficiency is attributable to an increase of LDL clearance in human.

Subjects and Methods

For a complete "Subject and Methods" section please see the supplemental materials (available online at <http://atvb.ahajournals.org>).

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 No. 15/06 - BRD 06/3-E), including members of the proband's family and healthy normolipidemic controls studied by the same compartmental method.¹²

Results

Clinical Findings in the FHBL Proband and Relatives

The proband is a 49-year-old French white man who was initially hospitalized for the rapid-onset of an insulin-requiring diabetes-mellitus. He exhibited extremely low plasma LDLC levels (7 mg/dL) on admission and also at distance of diabetes onset (16 mg/dL). Abdominal ultrasonography showed a moderate liver steatosis. However, hepatic enzymes levels and liver function tests were not altered. There was neither history of diarrhea nor eye or neurological abnormalities related to any vitamin deficiency. To date, the etiology of the diabetes of the proband remains uncertain. HbA1C was initially increased at 11.5%. On admission, ketonuria (++++) was detected, evocative of a transient insulin-deficient state. However, islet-related autoantibodies (anti-GAD and anti-IA2) were negative, probably excluding autoimmune type 1 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 transiently treated with a basal-bolus insulin therapy regimen, and he is currently controlled (HbA1C=6.5%) under sitagliptin (100 mg/j) only. In accordance with a persistent endogenous insulin secretion, fasting plasma C-peptide levels were in the normal range. Proband's mother was deceased at 66 from dementia, whereas his father was healthy at age 79. His grandparents died at the age of 79, 87, 91, and 94 years, suggesting familial longevity.

Clinical and biological parameters were explored in fasted volunteer family members of the proband (II.3; Table 1). Circulating PCSK9 was undetectable in the proband. Both his sister (II.2) and his daughter (III.1) had much less plasma PCSK9 concentrations than the noncarrier II.4 and II.1 (respectively, 100 and 125 ng/mL, versus 216 and 435 ng/mL). For comparison, PCSK9 circulating concentration was determined in 10 normolipemic fasted controls (5 women and 5 men, 25.7±4.7 year old, total cholesterol: 173±3 mg/dL, LDLC: 96±2 mg/dL, HDLC: 62±1 mg/dL, TG: 72±2 mg/dL). Mean PCSK9 concentration was 238±80 ng/mL, representing approximately twice as much as deter-

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, y	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	58
HDLC, mg/dl	57	81	75	82	83
Triglycerides, mg/dl	84	71	49	68	71
PCSK9, ng/ml	435	100	Und.	216	125
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 indicates 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; Und, undetected; nd, not determined. *Carrier of the R104C/V114A amino acid substitution.

mined for II.2 and III.1. More information on proband's relatives is presented as supplemental Results.

A fast protein liquid chromatography performed on plasma from mutation-carriers II.3 and III.1 is presented as supplemental Figure I and confirms low level of LDLC in these subjects. Gel-electrophoresis analysis of apoB-rich lipoprotein fractions isolated by ultracentrifugation did not reveal any abnormal apoB isoform in the proband and his daughter.

Genotypic Findings in the Proband and Family

The proband was heterozygous for two PCSK9 missense mutations R104C and V114A in exon 2 (Figure 1A). Both mutations were absent from 600 and 300 chromosomes from French hypercholesterolemic patients and normolipidemic blood donors, respectively. Cosegregation analysis (Figure 1B) revealed that FHBL relatives II.2 and III.1 were also heterozygous for both mutations, whereas normolipidemic relatives were noncarriers of these mutations. Haplotyping informative single nucleotide polymorphism (SNP) and mic-

AQ: 1

TI

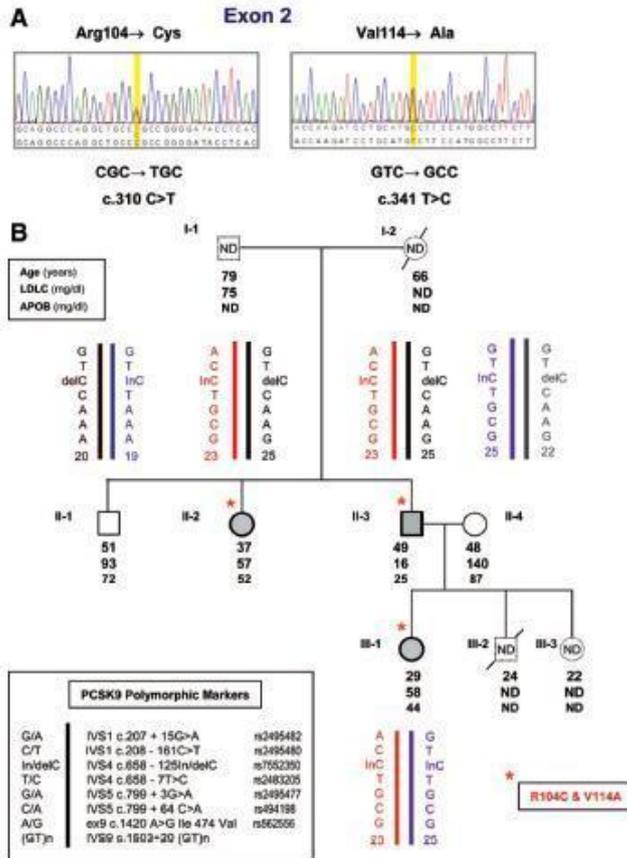


Figure 1. Genotypic findings and cosegregation analysis in the HBL family. A, DNA sequence chromatogram (Gensearch output) centered on PCSK9 mutations found in FHBL proband. Exon 2 reference sequence is shown in black letters (bottom line), patient sequence is colored according to PHRED base-calling (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. Subjects represented by dotted-line symbols filled with "ND" were not available for genetic studies. Age (years) and plasma LDLC, apoB concentrations (mg/dL) is indicated below symbols (ND indicates 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 colored in red.

AQ: 3

rosatellite at the PCSK9 locus confirmed that both mutations were allelic and 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). The PCSK9 proximal promoter and 5'-UTR DNA sequences matched the reference wild-type genomic sequence. Extensive analysis of the APOB coding and splicing sequences in the family did not reveal any pathogenic mutation causing FHBL. Analysis of common polymorphisms excluded segregation of any APOB haplotype with FHBL in the family (see supplemental Figure II). Extensive DNA sequencing of similar regions and proximal promoter at the LDLR locus was normal. All family members were carriers of the E3E3 genotype of APOE.

Computed Estimation of Mutation Functionality
Computed estimation of functional changes induced by the R104C and V114A mutations, although discrepant when each mutation was considered alone, suggested a potential deleterious effect induced by the double mutant (see supplemental

Methods). Indeed, the presence of 2 adjacent DNA changes would generate a mutant protein harboring 2 amino acid substitutions within a 10-aa stretch of the PCSK9 prodomain, which is highly conserved in 3 primate species (see supplemental Figure III). In contrast, the L483V conservative genetic variation found in the normolipidemic spouse (II.4) and FHBL daughter (III.1) was consistently estimated as neutral by 4 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 (supplemental Figure IVA). PCSK9 is composed of 3 domains, the N-terminal domain corresponding to the prodomain known to inhibit the proteolytic activity of the enzyme, the catalytic domain itself, and a C-terminal domain adopting a 3 6-stranded β-sheet adipokine resistin-like structure. Both point mutations are located in the prodomain, remote from the catalytic site of the enzyme. R104 is rather solvent exposed, whereas V114 is part of the hydrophobic core of the prodomain suggesting that this mutation may decrease the stability of the prodomain.

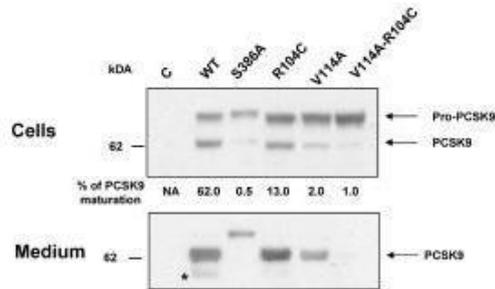


Figure 2. PCSK9 processing is abolished by the double R104C/V114A mutation. Human immortalized hepatocytes were transfected with the plasmid pcDNA3.1 empty (control) or coding for wild-type PCSK9 (WT), the loss-of-function variants S386A, R104C, V114A, or the double mutant R104C/V114A. Proteins were extracted from cell lysates or media and analyzed 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.¹⁷

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 prodomain. Notably, a previous study showed that a conservative mutation from Ile to Val (I-48V) in the hydrophobic core of the prodomain of *Bacillus subtilis* subtilisin could change the structure and specificity of the active folded enzyme by altering the folding process.¹⁴ A remarkable feature of the V114A mutation is that it affects the same region of the prodomain hydrophobic core as the I-48V mutation in the bacterial subtilisin (supplemental Figure IVB).

Processing and Secretion of PCSK9 R104C/V114A

To assess the effect of R104C and V114A 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 mutant¹⁵ were also transfected in IHH cells (Figure 2). In lysates from cells expressing WT-PCSK9, 2 bands of 73 and 64 kDa were detected, corresponding to the pro-PCSK9 and the mature cleaved PCSK9 protein, respectively. The relative amounts of pro- and mature PCSK9 for 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. Mutant R104C appeared to have decreased autocatalytic activity, whereas the autocatalytic cleavage of the V114A mutant was dramatically abolished when compared with that observed in cells expressing WT-PCSK9 (percentage of PCSK9 maturation at 62%, 13% and 2% in WT, R104C and V114A, respectively). Moreover, combination of both amino acid substitutions R104C and V114A totally abolished autocatalytic cleavage, in a similar extent to that of

the catalytically inactive S386A mutant. Secreted mature WT-PCSK9 was detected in cell culture medium by Western blot analysis using anti-V5 antibody (Figure 2, lower). As previously described,¹⁶ 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 RFHR₂₁₈.¹⁷ Compared with WT-PCSK9, amino acid substitution R104C 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*.

PCSK9 R104C/V114A Acts as a Dominant Negative

Because the proband had undetectable levels of circulating PCSK9 and both mutations were found on a single allele, we hypothesized that R104C/V114A might exhibit dominant negative activity over the wild-type allele. We coexpressed WT-PCSK9 with increasing amounts of R104C, V114A, or R104C/V114A carrying the same V5 tag to avoid any bias attributable to the nature of the tag (Figure 3A). Single R104C and V114A mutations had no effect on WT-PCSK9 processing or secretion. The double mutant, however, obviously impaired PCSK9 protein secretion. The effect was patent when R104C/V114A expression represented as little as 25% that of WT-PCSK9 and was more pronounced when both were transfected in equal quantity (last lane). Next, we verified whether other PCSK9 variants would affect WT-PCSK9 secretion. Figure 3B presents the results obtained with the LOF mutant S386A and the GOF mutants S127R and D374Y. None of these variants seemed to affect PCSK9 secretion, suggesting that our findings are specific to the R104C/V114A mutant.

PCSK9 R104C/V114A Increases LDL Clearance

In Vivo

There is no demonstration yet that *PCSK9* LOF mutations increase LDL catabolism in human. To show that *PCSK9* R104C/V114A double mutant could alter LDL metabolism in human, *in vivo* kinetics of apoB100-containing lipoproteins using a 14-hour primed constant infusion of [³H] leucine were conducted in the proband (II.3) and his daughter (III.1), as well as in healthy control subjects (n=11, 34±12 years old; body mass index, 26±4.4 kg/m). 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 supplemental Figure VI. Model fitted lines and experimental points showed close agreement. Kinetic parameters are shown in Table 2.

For the proband, the apoB100 production is lower compared to controls rate (-25%; Table 2). This low apoB100 production is related to a lower proportion of apoB100 secreted in VLDL. Importantly, the fractional catabolic rate

F2

F3

T2

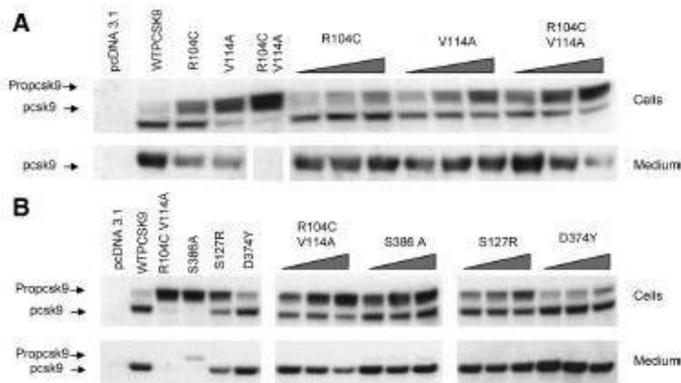


Figure 3. PCSK9R104C/V114A acts as a dominant negative. Human immortalized hepatocytes were transfected with wild-type PCSK9 or mutants coding for PCSK9 variants R104C, V114A, R104C V114A, S127R, S386A, D374Y. Lanes 1 to 5 (A) or 1 to 6 (B) correspond to cells transfected with 5 µg/well empty pcDNA3.1 or 2.5 µg/well of WT PCSK9 or indicated variants +2.5 µg/well empty pcDNA3.1. Dark colored triangles indicate lanes corresponding to cells transfected with constant amount of WT PCSK9 (2.5 µg/well) with indicated variants at 0.62, 1.25, and 2.5 µg/well from the left top to the right of the panel and adjustable doses of empty pcDNA3.1 for a total of 5 µg/well of plasmid. After protein extraction, equal amounts were analyzed by Western blots with anti-V5 epitope antibodies.

(FCR) of these lipoproteins is higher than controls particularly in LDL (+256% for LDL compared with controls). The higher FCR in VLDL and IDL is related to a higher direct removal of VLDL (0.395 versus 0.05 ± 0.02 hour) and a higher conversion rate of IDL (0.51 versus 0.31 ± 0.10 hour), respectively.

For the proband's daughter III.1, the apoB100 total production rate was higher than controls (+88%). However, the proportion of apoB100 secreted in 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 (+88%). Once again, this higher FCR is related to a higher direct removal (0.22 hour versus 0.05 ± 0.02 hour for VLDL and 0.92 hour versus 0.20 ± 0.15 hour for IDL).

Discussion

We report a French FHBL family with several individuals exhibiting low plasma LDLc, apoB, and PCSK9 concentrations, potential familial longevity, and normal liver function. Mutation carriers were heterozygous for R104C and V114A amino acid substitutions in PCSK9 prodomain. In the present case, family analysis revealed that both mutations segregated on a single-allele in subjects with a phenotype compatible with a mutation at a FHBL disease-causing locus. 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.¹⁸ The V114A mutation was also found heterozygous and rare (frequency <0.005) in a single hypocholesterolemic blood donor originating from Sicily, Italy.¹⁹ A similar picture of very rare allele frequency was found in the French population because none of these mutations were found in both hypercholesterolemic and normolipidemic individuals. We also looked for potential mutations at other known FHBL-causing loci and found no evidence for any genetic complementation on LDL metabolism. In addition, the clinical presentation of a late dominant FHBL with very limited clinical consequences (ie, absence of impaired neurological development, of severe intestinal malabsorption, or severe liver steatosis) made complete deficiency rather unlikely at the APOB or *Microsomal triglyceride transfer protein* loci.

We used stable isotope tracer methodology to study in vivo kinetics of apoB100 in 2 subjects carrying the double mutation R104C/V114A. Our study demonstrates for the first time an accelerated LDL catabolism in patients affected by a PCSK9 LOF mutation. Taking into account previous studies in PCSK9^{-/-} mice,²⁰ it is very probable that the increased FCRs in human are related to the overexpression of the hepatic LDLR. Indeed it was shown that not only LDL but also VLDL can be recaptured by the liver via the LDLR.²¹ The increased apoB100-rich lipoprotein catabolism in PCSK9 LOF mutation carriers mirrors the deficient lipopro-

Table 2. Lipoprotein Kinetic Parameters in Carriers of PCSK9 R104C/V114A Mutation and Controls

	TPR	VLDL			IDL				LDL		
		PR	FCR	CR	PR	PRd	FCR	CR	PR	PRd	FCR
II.3	0.45	0.22	0.71	0.32	0.24	0.07	0.79	0.51	0.24	0.09	0.089
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 indicates 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. supplemental Methods and supplemental Figure III for more explanation on the model used for rate constant calculations.

tein catabolism we previously reported in patients with the GOF mutation S127R.¹³ However, the picture is not the same for the apoB100 production. We had found an apoB100 production twice that of FH patients in patients with the S127R mutation,¹³ suggesting that PCSK9 could be involved in the packaging and plasma delivery of VLDL. Interestingly, circulating PCSK9 plasma concentration was correlated with plasma triglycerides in 2 recent studies.^{22,23} However, in the present case, the daughter presented with increased apoB100 production compared with controls. The fact that estrogens increase apoB100 production while androgens attenuate this effect^{24,25} supports possible effect of gender on variability of lipoprotein kinetics.

FHBL carriers of the R104C/V114A mutation had lowered to undetectable fasting plasma PCSK9 concentrations whereas noncarriers displayed no difference compared with levels found in unrelated fasted normolipidemic subjects. Our data fit with several recent reports, even though there is a large heterogeneity in the literature concerning PCSK9 plasma concentration range and absolute values.^{22,23,26,27} Of note, its association with gender is not consistent.^{22,23} Transient transfections of human hepatocytes by recombinant vectors showed that R104C somehow impaired PCSK9 cleavage, but V114A appeared even more deleterious on processing and overall secretion of PCSK9.

There was an obvious difference in the phenotype displayed by the proband with profound FHBL exhibiting about 250% increase in LDL catabolic rate and virtual absence of PCSK9 in plasma, and a phenotype of mild FHBL displayed by his sister and daughter also heterozygous for the same PCSK9 mutation but with appreciable PCSK9 plasma concentrations. Independent measurements were made at a distance from each other and confirmed this trait. A first explanation for lower LDLc in the proband comes from the apoB production that is increased in the daughter, as discussed above. The FHBL phenotype in the proband appears similar to that reported by Zhao et al (ie, 14 mg/dL) in a healthy compound heterozygote for 2 PCSK9 mutations (Δ R97 and Y142X) or by Hooper et al in a homozygote for the C679X mutation resulting in the absence of PCSK9 in the bloodstream.^{11,12} Therefore, profound FHBL cannot be explained solely by the presence of a single heterozygous LOF PCSK9 missense mutation, in the family described herein. We cannot exclude another unidentified mutation at the PCSK9 locus, impairing PCSK9 expression. However this hypothesis is rather unlikely for several reasons. First, the severely affected proband and his mildly affected sister displayed exactly identical PCSK9 genotype and parental haplotypes, ruling out the en face PCSK9 allele for bearing another disease-causing mutation. Second, the daughter and sister both displaying a similar phenotype of mild FHBL had different en face PCSK9 alleles, with 1 clearly inherited from proband's normolipidemic spouse, consistent with them being heterozygous carriers of a FHBL disease-causing mutation. Third, all relatives displayed heterozygosity for different PCSK9 haplotypes spanning a large portion of the PCSK9 locus, ruling out for very large gene rearrangement causing apparent haplo-insufficiency. Therefore the hypothesis of any mutation altering PCSK9 expression (proximal promoter,

cryptic intronic, flanking, etc) present on the en face parental allele within the PCSK9 gene appears rather unlikely in the proband.

Witztum et al identified an increased clearance rate of glycated LDL in diabetic patients that could be related to the presence of antibodies directed toward glycated proteins in their plasma, suggesting additional immune-mediated clearance of LDL in the proband.²⁸ However, we believe that this hypothesis is unlikely. Indeed, we and others have observed with kinetic studies a substantial decrease of LDL catabolism (20 to 30%) in diabetic patients.^{29,30} Furthermore the proband's diabetes was well controlled under diet only at the time of the present kinetics, as illustrated by his level of HbA1c (5.6%). Since then, despite a very good glycaemic control (HbA1c <6.5%), his LDLc has remained in the very low concentration range.

Another plausible explanation for discrepant FHBL phenotype between proband and relatives is that the R104C/V114A mutant not only is a LOF mutation but could act as a dominant negative impairing wild-type allele PCSK9 function or secretion. This might explain why the intact PCSK9 allele is apparently silent in the proband, whereas its expression remains partially preserved in his sister and daughter. Indeed, we found in vitro evidence of such an effect from liver cells transiently cotransfected with several PCSK9 mutants together with wild-type PCSK9 allele. Only the R104C/V114A double mutant displayed a dominant negative dosage effect on wild-type PCSK9 secretion. There are numerous examples in human disease that dominant negative mutations may display highly variable disease penetrance and expressivity in heterozygous carriers of the same mutation. For example, patients with the same dominant negative mutations of PPAR γ —a nuclear receptor involved in carbohydrate and lipid metabolism targeted by thiazolidinediones—display a variable phenotype of partial lipodystrophy, insulin resistance, and metabolic syndrome.³¹ Nevertheless, we cannot isolate the dominant negative effect from the other factors influencing LDLc beside the LDLr pathway (like apoB production) and determine to which extent it really contributes to the phenotype.

Thus the R104C/V114A is the first example of a LOF PCSK9 missense mutation displaying dominant negative activity, which could account for the variable FHBL phenotype observed in this family. This is also the first demonstration that PCSK9 LOF mutations are accompanied by increased LDL catabolic rate in human, providing an additional argument for developing inhibitors of PCSK9 to treat hypercholesterolemia.

Acknowledgments

We are indebted to the patients and their families for their cooperation in this study. We thank Chantal Bernard, Christine Morel, and Marjorie Jodar (Laboratoire de Référence pour le Diagnostic des Maladies Rares), APHP, for excellent technical assistance.

Sources of Funding

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 R06510NS), Fondation de France, ALFEDIAM, PNR-Maladies Cardiovascu-

laire 2006. S.K. is sponsored by Régions Pays de La Loire and Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes. P.C. benefits from a "Contrat d'Interface" INSERM –CHU de Nantes.

Disclosures

AQ:2 P.C. received research Grant ANR-06-Physio-027-01 in the amount of \approx \$10 000.

References

1. Tarugi P, Averna M, Di LE, Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, Catrin L, Benolini S, Calandra S. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007;195:e19–e27.
2. Linton MF, Farnse RV Jr, Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 1993;34:521–541.
3. Schonfeld G. Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *J Lipid Res*. 2003;44:878–883.
4. Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42:515–545.
5. Fouchier SW, Sankatasing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Alonso R, Kastelein JJ, Defesche JC. High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J Med Genet*. 2005;42:e23.
6. Costet P, Krempf M, Carliou B. PCSK9 and LDL cholesterol: Unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:426–434.
7. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cuxad C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Famiel M, Beaulieu I, Bruckert E, Chambaz J, Chenu 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;34:154–156.
8. Allard D, Amselem 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, Rabes JP. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 2005;26:497.
9. Berge KE, Ong L, Lerer TP. Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1094–1100.
10. 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;354:1264–1272.
11. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular Characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*. 2006;79:514–523.
12. Hooper AJ, Manis AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*. 2007;193:445–448.
13. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, Krempf M. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1448–1453.
14. Shinde UP, Liu JJ, Inouye M. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*. 1997;389:520–522.
15. Naureckiene S, Ma L, Sreelakshmi K, Purandare U, Lo CP, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, DiStefano PS, Wood A, Bingham B. Functional characterization of Nanc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420:55–67.
16. Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, Soutar AK. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1161–1169.
17. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PCS6A: Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem*. 2006;281:30561–30572.
18. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Yamamura T, Miyata T. 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*. 2007;196:29–36.
19. Fasano T, Cefalu AB, Di LE, Noto D, Pellaccia D, Bocchi L, Valenti V, Bonardi R, Guardamagna O, Averna M, Tarugi P. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:677–681.
20. 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 *Psck9*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5374–5379.
21. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barnett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest*. 2000;105:521–532.
22. Dubuc G, Tremblay M, Pate G, Jacques H, Hamelin J, Benjannet S, Boulet L, Genest J, Bernier L, Seidah NG, Davignon J. A new method for measurement of total plasma PCSK9—Clinical applications. *J Lipid Res*. In press.
23. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Plasma levels of PCSK9 in a large multiethnic population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:2537–2543.
24. Creston GE, Milan LB, Marschke KB, Reichman M, Briggs MR. Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinology*. 1997;138:3779–3786.
25. Smith PM, Cowan A, White BA. The low-density lipoprotein receptor is regulated by estrogen and forms a functional complex with the estrogen-regulated protein ezrin in pituitary GH3 somatotactotropes. *Endocrinology*. 2004;145:3075–3083.
26. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, Konrad RJ. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2007;53:1814–1819.
27. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of pambiotic mice. *J Clin Invest*. 2006;116:2995–3005.
28. Witztum JL, Steinbrecher UP, Kesaniemi YA, Fisher M. Autoantibodies to glycosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:3204–3208.
29. Davillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gambert P, Verges B. Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:685–694.
30. Ouguerram K, Magot T, Zair Y, Marchini JS, Charbonnel B, Lacomme H, Krempf M. Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:332–337.
31. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006;116:581–589.

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

AQ1— Au: Please review the typeset table(s) carefully against your original table(s) to verify accuracy of editing and typesetting.

AQ2— Au: Please carefully review any Acknowledgments, Sources of Funding, and/or Disclosures listed at the end of the manuscript (before the References), and confirm that they are accurate and complete for all authors.

AQ3— Au: Please verify figure legends as set.

AQ4— Au: Please confirm that all authors' institutional affiliations (including city/state/country locations) and all correspondence information are correct as shown in the affiliations footnote.

NOM : BENOIT PRENOM : Isabelle

Titre de Thèse : Les mutations « perte de fonction » de PCSK9 : une nouvelle cause d'hypobétalipoprotéinémie familiale.

Analyse de 3 cas

RESUME

PCSK9 est le 9^{ème} membre de la famille des proprotéines convertases et joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, en augmentant la dégradation du récepteur des LDL. Les mutations « perte de fonction » de PCSK9 sont associées à une diminution des taux de LDLC. Les hypobétalipoprotéinémies familiales (FHBL) sont définies par des concentrations plasmatiques de CT, de LDLC et/ou d'apolipoprotéine B inférieures au 5^{ème} percentile.

L'objectif de ce travail est de rapporter les observations cliniques de 3 familles de patients présentant une FHBL en rapport avec une mutation de PCSK9. Pour une de ces familles présentant une double mutation hétérozygote R104C/V114A, les conséquences pathologiques ont pu être explorées *in vivo* et *in vitro*. Ceci nous a permis de démontrer, pour la première fois, que l'hypocholestérolémie associée aux mutations « perte de fonction » de PCSK9 est la conséquence d'une augmentation de la clairance du LDLC *in vivo* chez l'homme.

Ces cas cliniques renforcent l'intérêt de développer des inhibiteurs de PCSK9 comme traitement adjuvant aux statines dans le cadre des hypercholestérolémies.

MOTS-CLES

Hypobétalipoprotéinémie familiale, PCSK9, LDL cholestérol