

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

IMPLICATION DE PCSK9
DANS LES MALADIES MÉTABOLIQUES :
RÉGULATION PAR LES ACIDES BILIAIRES ET
RÔLE FONCTIONNEL DANS LE PANCRÉAS

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE / SANTE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Nutrition et métabolisme

Présentée et soutenue publiquement par

LANGHI Cédric

Le 30 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs Mr le Professeur Bart STAELS, Université Lille Nord de France
Mme le Docteur Mathilde VARRET, Université Paris Descartes

Examineurs Mr le Professeur Jean-Marie BARD, Université de Nantes
Mme le Docteur Catherine POSTIC, Université Paris Descartes

Directeurs de Thèse Mr le Professeur Bertrand CARIOU, Université de Nantes
Mr le Professeur Michel KREMPF, Université de Nantes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
I) Le métabolisme des lipides	14
1) Métabolisme lipidique et lipoprotéines	14
a) Molécules de transport des lipides : les lipoprotéines.....	14
b) Métabolisme des lipoprotéines.....	18
- La voie de transport des lipides exogènes.....	18
- La voie de transport des lipides endogènes.....	20
- La voie de transport inverse du cholestérol	20
c) Les dyslipidémies.....	22
- Les hyperlipidémies	24
Les hypertriglycéridémies majeures :	24
Les hypercholestérolémies primaires :	24
Les hyperlipidémies mixtes :	26
- Les hypolipidémies	27
Les hypoβlipoprotéinémies et les αlipoprotéinémies	27
Les hypoαlipoprotéinémies	27
2) Syndrome métabolique et diabète de type 2	28
a) Définition du syndrome métabolique	28
b) Obésité, insulino-résistance, inflammation et stéatose hépatique	30
c) Dyslipidémie mixte	33
d) Le diabète de type 2	35
3) Cholestérol et sécrétion d'insuline.....	36
a) Mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion	36
b) Régulation de l'insulinosécrétion.....	38
- Régulation neurohormonale	38
- Rôle des incrétines	39
- Rôle des AGL	40
b) Dysfonction de la cellule β dans le diabète de type 2	42
- Mécanismes compensateurs de l'insulino-résistance	42
- Lipotoxicité	44
- Stress du RE et dépôt amyloïdes.....	45
c) Métabolisme du cholestérol et fonction β-cellulaire	46
- Effet direct du cholestérol sur la sécrétion d'insuline.....	46
- Rôle du transporteur ABCA1 sur la sécrétion d'insuline	47
- Rôle des lipoprotéines et du LDLR sur la sécrétion d'insuline	49
- Mécanismes d'action du cholestérol sur la sécrétion d'insuline.....	51
- Conclusion sur le rôle du cholestérol dans la sécrétion d'insuline	52
4) Acides biliaires et métabolisme des lipides	54
a) Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires	54
b) Le récepteur nucléaire FXR	57
- Les récepteurs nucléaires	57
- Structure des récepteurs nucléaires	58

- Découverte et adoption du récepteur FXR.....	61
- Régulation du métabolisme des acides biliaires par FXR.....	63
c) Interactions entre le métabolisme des acides biliaires et des lipides.....	65
- Effet des acides biliaires sur le métabolisme des lipides	65
- FXR et métabolisme des TG	66
- FXR et métabolisme du cholestérol	70
- FXR et homéostasie du glucose	73
FXR et métabolisme hépatique du glucose	73
FXR et sensibilité à l'insuline	76
d) Autres rôles de FXR	77
- Rôle de FXR dans les vaisseaux et l'athérosclérose	77
- Rôle de FXR dans l'inflammation et la stéatohépatite	80
- Rôle de FXR dans la fibrose hépatique.....	82
- Rôle de FXR dans la carcinogenèse.....	82
- Rôle de FXR dans la régénération hépatique.....	83
e) Voies de signalisation des AB alternatives à FXR.....	83
f) Conclusion.....	85
II) Proprotéines convertases et PCSK9	87
1) La famille des proprotéines convertases	87
a) Structure et classification des proprotéines convertases	87
b) Rôles fonctionnels des PC	90
- Modèles animaux transgéniques	90
- PC et métabolisme lipidique	91
- Rôle des PC dans le pancréas.....	92
2) PCSK9 : de sa découverte à sa structure cristallographique	93
a) Découverte de PCSK9.....	93
b) Expression et niveaux circulants de PCSK9	95
c) Structure de PCSK9	96
- PCSK9 : du gène à la protéine	96
- Structure cristallographique de PCSK9	98
- PCSK9 et activité catalytique	100
3) PCSK9 et risque cardiovasculaire	100
a) Les mutations gain de fonction de PCSK9.....	100
b) Les mutations perte de fonction de PCSK9	102
c) PCSK9 corrèle avec le LDL-C et le risque cardiovasculaire	103
4) Rôle de PCSK9 dans le métabolisme lipidique	104
a) PCSK9 : un inhibiteur post-traductionnel du LDLR.....	104
- PCSK9 régule l'expression hépatique du LDLR	104
- Action intracellulaire et extracellulaire de PCSK9	105
- L'activité de PCSK9 n'est pas nécessaire à son action sur le LDLR	106
- Mécanismes d'action de PCSK9 sur le LDLR	107
PCSK9 : une simple molécule chaperonne ?	107
Rappel sur le fonctionnement du LDLR	108
PCSK9 se lie au domaine EGF-A du LDLR et empêche son recyclage à la membrane	111
- Régulation de la liaison PCSK9-LDLR	114
- PCSK9 et les autres membres de la famille du LDLR.....	115
- Effets des mutations de PCSK9 sur sa fonction.....	115
b) PCSK9 et sécrétion des VLDL.....	117
c) Rôle hépatique et extrahépatique de PCSK9.....	118

- Rôle du PCSK9 hépatique	118
- Effet de PCSK9 circulant sur les organes extrahépatiques	118
- Rôle de PCSK9 dans l'intestin et la période post-prandiale	119
d) Régulation de l'expression de PCSK9	120
5) Autres rôles de PCSK9	123
a) PCSK9 et régénération hépatique	123
b) PCSK9 et infection virale et parasitaire	123
c) PCSK9 et maladie d'Alzheimer	124
6) Conclusion : quelles perspectives thérapeutique pour la cible PCSK9	125
TRAVAUX PERSONNELS	127
I) Etude de la régulation de PCSK9 par FXR et les acides biliaires	128
1) Introduction	128
2) Article I : Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes	130
Supplementary data 2 : Données préliminaires du PHRC FXR/PCSK9.....	140
3) Discussion.....	141
II) Etude du rôle fonctionnel de PCSK9 dans le pancréas	146
1) Introduction	146
2) Article II : PCSK9 modulates the expression of LDL receptor in pancreatic islets without affecting insulin secretion	149
3) Discussion.....	178
CONCLUSION GENERALE	184
ANNEXES.....	188
I) Article 1 : Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	189
II) Article 2 : Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia.....	198
III) Article 3 : PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia.....	206
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique des lipoprotéines	p19
Figure 2 : Structure de l'hélice α des apolipoprotéines	p20
Figure 3 : Synthèse des TRL dans le réticulum endoplasmique des entérocytes et des hépatocytes	p23
Figure 4 : Métabolisme des lipoprotéines	p26
Figure 5 : Interactions entre les différentes dyslipidémies	p27
Figure 6 : Pathologies associées au syndrome métabolique	p32
Figure 7 : Voies de signalisation de l'insuline	p36
Figure 8 : Relation entre sensibilité à l'insuline et insulinosécrétion	p40
Figure 9 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans la cellule β	p41
Figure 10 : Voies d'interactions métaboliques et d'amplification de la sécrétion d'insuline par les AGL	p46
Figure 11 : Mécanismes de la compensation β -cellulaire dans l'insulinorésistance	p47
Figure 12 : Récepteurs et transporteurs du cholestérol dans la cellule β	p55
Figure 13 : Structure des principaux acides biliaires	p58
Figure 14 : Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires	p59
Figure 15 : Voies de synthèse des acides biliaires	p60
Figure 16 : Structure générale des récepteurs nucléaires	p63
Figure 17 : Schéma classique du fonctionnement des RN	p64
Figure 18 : Les différents isoformes de FXR	p66
Figure 19 : Structures des agonistes synthétiques de FXR	p67
Figure 20 : Modes de régulation de la transcription de FXR	p68
Figure 21 : Régulation du cycle entéro-hépatique des AB par FXR	p69
Figure 22 : Effets hypotriglycéridémians de FXR	p74
Figure 23 : FXR contrôle la réponse adaptative du foie lors de la transition jeûne réalimentation	p79
Figure 24 : Structure des proprotéines convertases	p94
Figure 25 : Clivage de la proinsuline par PC1, PC2 et la CPH	p97
Figure 26 : Part des mutations de PCSK9 dans l'hypercholestérolémie familiale (FH)	p99

Figure 27 : Structure primaire de PCSK9 et ses modifications post-traductionnelles	p101
Figure 28 : Structure cristallographique de PCSK9 (A), imbrication du prodomaine dans la poche catalytique (B), superposition du domaine CRHD de PCSK9 avec un homotrimère de résistine (SD : sous domaine) (C)	p103
Figure 29 : PCSK9 et ses différentes mutations	p106
Figure 30 : Structure du LDLR (A), internalisation et recyclage du LDLR à la membrane (B) et changement de conformation du LDLR avec le pH (C)	p114
Figure 31 : PCSK9 interfère avec le recyclage du LDLR (A) et liaison du domaine EGF-A du LDLR au domaine catalytique de PCSK9 (B)	p117
Figure 32 : Régulation transcriptionnelle de PCSK9	p126
Figure 33 : PCSK9 au centre des perturbations métaboliques	p190
Tableau I : Propriétés des différentes classes de lipoprotéines	p20
Tableau II : Répartition et fonction des apolipoprotéines	p21
Tableau III : Les définitions cliniques du syndrome métabolique	p34
Tableau IV : Effets de l'activation de FXR sur la fonction vasculaire	p83
Tableau V : Classification et rôle des sérines protéases	p92

LISTE DES ABREVIATIONS

AB	acides biliaires
ABCA1	ATP binding cassette A1
ACAT2	acyl cholesterol acyl transferase
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACS	acyl-CoA synthase
AF-1/2	activation function 1/2
AGL	acides gras libres
ANGPTL3	angiopoietin-like protein 3
AOA	acide oxalo-acétique
Apo-A	apolipoprotéine A
Apo-B	apolipoprotéine B
apoB48R	apoB48 receptor
APOBEC1	apo-B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 1
Apo-C	apolipoprotéine C
Apo-E	apolipoprotéine E
apoER	apoE receptor
APP	amyloid precursor protein
ARH	autosomal recessive hypercholesterolemia
ARN	acide ribonucléique
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
ATP	adénosine tri-phosphate
Aβ	amyloid β
BACE1	β-site amyloid precursor protein APP-cleaving enzyme 1
BAAT	bile acyl-CoA amino acid N-acyltransferase
BSEP	bile salt export pump
CA	cholic acid
CAT	transporteur aux acides aminés cationiques
CBP	cAMP response element-binding protein
CDCA	chenodeoxycholic acid
CE	cholestérol estérifié

CETP	cholesterol ester transfert protein
ChoRE	carbohydrate response element
CL	cholestérol libre
CML	cellule musculaires lisses
CPH	carboxypeptidase H
CPT1	carnitine palmytoyltransférase 1
C-RP	C reactive protein
CYP7A1	cytochrome P450 cholestérol 7α-hydroxylase A1
DAG	dialcyl glycerides
DAX1	dosage-sensitive sex reversal
DBD	DNA binding domain
DCA	deoxycholic acid
DHEA	déhydroépiandrostérone
DIO2	type 2 iodothyronine deiodinase
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
EGFP	epidermal growth factor precursor
ET-1	endothéline 1
FABP	fatty acid binding protein
FAS	fatty acid synthase
FATP	fatty acid transport protein
FFAR1	free fatty acid receptor 1
FGF-15	fibroblast growth factor-15
FXR	farnesoid X receptor
G6P	glucose 6 phosphote
GIP	glucose-dependent insulintropic polypeptide
GK	glucokinase
GLP-1	glucagon like-peptide 1
Glut	glucose transpoteur
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone
GPR40	G Protein-Coupled Receptor 40
GSIS	glucose simulated insulin secretion
HAT	histone acetyltransferases
HCF	hyperlipidémie combinée familiale
HDAC	histones deacetylases

HDL	high density lipoprotein
HF	hypercholestérolémie familiale
HMGC_oA	hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HRE	hormone response element
IAPP	islet amyloid polypeptide
IBABP	intestinal bile acid binding protein
IBAT	ileal bile acid transporter
IDF	international diabetes federation
IDL	intermediate density lipoprotein
IKK	inhibitor κB kinase
IL	interleukine
IP3	inositol 3 phosphate
IR	insulinorésistance
IRS	insulin receptor substrate
JNK	c-jun N-terminale kinase
JUPITER	Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
LBD	ligand binding domain
LCA	lithocholic acid
LCAT	lécithine cholestérol-acyltransférase
LDL	low density lipoprotein
LDLR	low density lipoprotein receptor
LH	lipase hépatique
LPL	lipoprotéine lipase
LRH-1	liver receptor homolog 1
LRP	low density lipoprotein receptor related protein
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MRP2	multidrug resistance associated protein 2
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
MβCD	méthyl β cyclodextrine
NARC-1	neuronal-apoptosis-regulated convertase 1
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel
NcoR	nuclear receptor corepressor

NOD	non obese diabetic
NPC1L1	niemann-pick disease, type C1 gene-like 1
NTCP	Na-taurocholic cotransporting polypeptide
OATP	organic anion transporting polypeptides
OMS	organisation mondiale de la santé
OSTα/β	organic solute transporter α/β
PACE4	paired basic amino acid cleaving enzyme 4
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PC	proprotéine convertase
PDH	pyruvate déhydrogénase
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase 4
PDX-1	pancreas-duodenum homeobox-1
PI3K	phosphatidyl inositol 3 kinase
PKA	protein kinase A
PL	phospholipide
PLC	phospholipase C
PLTP	phospholipid transfert protein
POMC	pro-opiomélanocortine
PPARα	peroxisome proliferator activated receptor α
RE	réticulum endoplasmique
RN	récepteur nucléaire
RXR	Retinoid X Receptor
S1P	site-1 protease
SHP	small heterodimer partner
SKI-1	subtilisin kexin isozyme-1
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SNAP 25	synaptosome-associated protein of 25 kDa
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive NSF-attachement protein receptor
SRB1	scavenger receptor class B member 1
SRC	steroid receptor coactivator
SREBP	sterol response element binding protein
SST	somatostatine
SSTR	somatostatin receptor
SULT2A1	sulfotransférase 2A1

TG	triglycérides
TNFα	tumor necrosis factor α
TRL	triglycerids rich lipoprotein
UCP2	uncoupling protein 2
UGT2B4	glucuronosyltransferase 2B4
UPR	unfolded protein response
VAMP-2	vesicle associated membrane protein 2
VLDL	very low density lipoprotein
VLDLR	very low density lipoprotein receptor
WOSCOPS	west of scotland coronary prevention study

AVANT-PROPOS

La thématique principale de mon travail de thèse fut d'approfondir nos connaissances sur la proprotéine convertase PCSK9, une sérine protéase régulatrice du métabolisme du cholestérol chez l'homme et l'animal. Ces travaux de recherche m'ont conduit à explorer le métabolisme des acides biliaires, molécules issues de la transformation du cholestérol par le foie, puisqu'une partie de mes travaux porte sur la régulation hépatique de l'expression de PCSK9 par les acides biliaires. Dans une seconde partie, je me suis intéressé à l'expression et au rôle de PCSK9 dans le pancréas, et plus particulièrement dans le pancréas endocrine. Ainsi, mon manuscrit de thèse aborde ces différentes thématiques en les situant au préalable dans leur contexte bibliographique. Pour cela, la première partie de mon introduction aux données de la littérature rappelle les grandes lignes du métabolisme des lipoprotéines et des pathologies qui y sont associées, PCSK9 étant lui-même un gène lié à l'hyper- ou à l'hypocholestérolémie. Puis j'aborde l'importance de la fonction insulinosécrétrice des cellules β du pancréas, principalement dans la mise en place du diabète de type 2. Une attention particulière est portée sur le rôle du cholestérol intracellulaire sur la régulation de la sécrétion d'insuline. Ensuite, je décris la régulation du cycle entéro-hépatique des acides biliaires, et notamment l'émergence du récepteur nucléaire FXR comme lien moléculaire entre le métabolisme des acides biliaires et celui des lipides. Pour finir, j'introduis la famille des sérines protéases, leur mode de fonctionnement et leurs divers rôles physiologiques. PCSK9 est le 9^{ème} membre particulier identifié de cette famille. L'ensemble des données de la littérature se rapportant à PCSK9 est décrit dans ce dernier chapitre, conduisant à nos hypothèses de travail. Ces travaux ont abouti à une publication et à la rédaction d'un second manuscrit toujours en préparation. Les méthodes utilisées et les résultats obtenus figurent dans la partie travaux personnels de ce manuscrit, présentés sous la forme d'articles. Ma participation à d'autres travaux du laboratoire est présentée dans une partie annexe.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I) Le métabolisme des lipides

1) Métabolisme lipidique et lipoprotéines

a) Molécules de transport des lipides : les lipoprotéines

Les lipides constituent une vaste famille hétérogène de molécules dont les rôles vont de substrats énergétiques pour les cellules, de composés structuraux pour les membranes cellulaires, ou encore de médiateurs de signalisation intracellulaire. L'hydrophobicité est le caractère commun à tous les lipides, mais leur variété est immense dans les organismes vivants. Les lipides peuvent être classés selon leur composition chimique et leur structure :

- Les **acides gras** sont des acides carboxyliques aliphatiques. Ils sont composés de chaînes linéaires de carbones hydrogénés présentant, à une extrémité, la fonction acide carboxylique. Un acide gras saturé est un acide gras dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène ; si la chaîne de carbone comporte une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone, l'acide gras est mono ou polyinsaturé, respectivement.
- Une, deux ou trois molécules d'acide gras peuvent estérifier le glycérol sur ses groupements hydroxyles pour donner des mono, di ou **triglycérides**. Les triglycérides constituent les molécules de réserve énergétique anhydre par excellence chez les animaux.
- Le **cholestérol** est une molécule de la famille des stérols. Il comprend 4 cycles carbonés composant le noyau cyclo-pentano-phénanthrénique. Le cholestérol possède un groupement hydroxyle qui peut être estérifié par un acide gras, rendant la molécule totalement insoluble dans l'eau. Le cholestérol n'a pas fonction de substrat énergétique. Il sert de précurseur aux hormones stéroïdiennes de la corticosurrénale (aldostérone, cortisol et DHEA) ou sexuelles (progestérone, œstrogène, testostérone). Surtout, c'est un composant majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides.
- Les **phospholipides** comprennent la sphingomyéline et les glycérophospholipides. Ils sont constitués d'un diglycéride dont le troisième hydroxyle du glycérol est estérifié par un acide phosphorique. L'acide phosphorique peut lui-même être, une deuxième fois, dérivé par un alcool ce qui lui confère ses propriétés amphiphiles. La diversité des phospholipides rend compte à la fois des propriétés modulatrices de ces molécules

au sein des membranes cellulaires et de leur fonction de précurseurs d'un large éventail de médiateurs lipidiques.

Les besoins en lipides sont un impératif de survie pour les cellules, qui peuvent être comblés par la biosynthèse *de novo*. Les cellules réalisent également l'épargne énergétique de leur synthèse en captant les lipides extracellulaires. Ceux-ci étant hydrophobes, les organismes vivants dotés d'un système circulatoire se sont pourvus d'un système de transport adapté. Seuls les acides gras circulent sous forme libre ou complexés à l'albumine. Ainsi, les lipides sont transportés dans le plasma et la lymphe au sein de complexes macromoléculaires : **les lipoprotéines**. Les lipoprotéines sont des édifices complexes et labiles, constitués d'un noyau lipidique hydrophobe composé de triglycérides (TG) et de cholestérol estérifié (CE), entouré d'une monocouche de phospholipides (PL), de cholestérol libre (CL) et de protéines amphiphiles, les apolipoprotéines (**figure 1**).

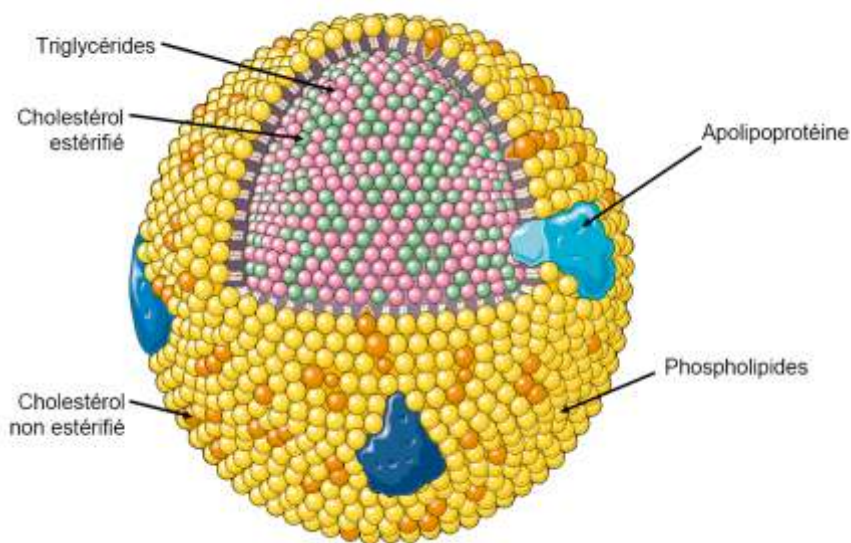


Figure 1 : Représentation schématique des lipoprotéines

Au milieu du siècle dernier, Gofman et son équipe ont isolé les différentes espèces de lipoprotéines par ultracentrifugation. Ils définirent une classification basée sur leur densité de flottation : **HDL** (high density lipoprotein), **LDL** (low density lipoprotein), **IDL** (intermediate density lipoprotein), **VLDL** (very large density lipoprotein) et **chylomicrons** (**tableau I**). Ce sont les particules les plus riches en lipides qui sont les moins denses, et celles qui sont les plus riches en protéines qui sont les plus denses. La densité reflète aussi leur capacité de chargement en lipides, et donc leur volume. Les chylomicrons et les VLDL sont de larges

lipoprotéines essentiellement constituées en TG appelées lipoprotéines riches en TG ou **TRL** (TG rich lipoprotein).

TYPE DE LIPOPROTÉINE	MOBILITÉ ÉLECTRO-PHORÉTIQUE	DENSITÉ (g/ml)	TAILLE (nm)	PROPORTION EC/TG	PRINCIPALES APOLIPO-PROTÉINES (APO)
Chylo-microns	Pas de migration	0,93	75-1 200	1/19	B48, E, C
VLDL	préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	préβ lent	1,006-1,019	27-5	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	AI, AII, C
préβHDL	préβ	1,210-1,250	<7 (disques)	nd	AI
Lp(a)		1,040-1,115	25		B100, (a)

Tableau I : Propriétés des différentes classes de lipoprotéines
d'après (Toussaint *et al.*, 2003)

Chaque classe de lipoprotéines est caractérisée par son contenu en apolipoprotéines. Leur élément moléculaire commun est un motif de 11 acides aminés, formant une hélice de 3,6 acides aminés/tour. Les acides aminés polaires sont regroupés sur une face et ceux qui sont apolaires sur l'autre face de l'hélice (**figure 2**), lui conférant des caractéristiques d'hélice α amphiphile.

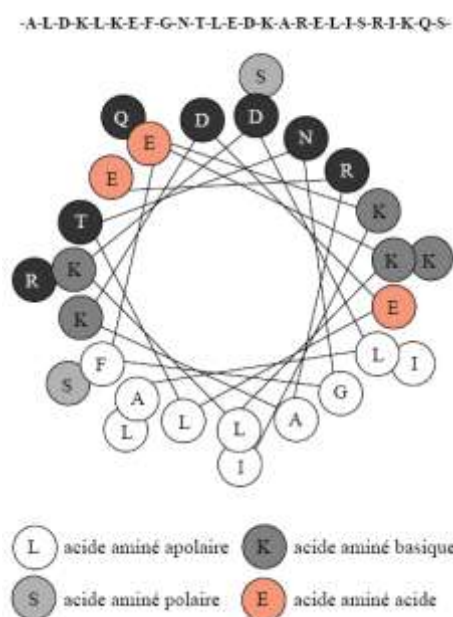


Figure 2 : Structure de l'hélice α des apolipoprotéines
d'après (Béréziat and Benlian, 1999)

Il existe plusieurs apolipoprotéines. Elles ont été initialement classées en « A » (apo-A) si elles étaient purifiées à partir des α -lipoprotéines (HDL), « B » (apo-B) si elles étaient purifiées à partir des β -lipoprotéines (LDL) et « C » (apo-C) si elles étaient purifiées à partir des VLDL. L'apolipoprotéine E (apo-E) a été purifiée à partir des IDL de sujets atteints d'hyperlipidémie de type III. Bien plus que leur rôle structural dans la composition des lipoprotéines, les apolipoprotéines gouvernent le devenir de ces particules (**tableau II**). En effet, les apolipoprotéines sont des activateurs ou inhibiteurs enzymatiques, elles sont également les ligands de récepteurs membranaires spécifiques. Elles influencent donc le métabolisme des lipoprotéines que nous allons décrire maintenant.

NOM	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTION
apo AI	foie, intestin	chylo, HDL	Structurelle ; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
apo AII	foie (intestin)	HDL	Structurelle ; activateur/inhibiteur de la HL ; efflux de cholestérol
apo AIV	foie, intestin	chylo, HDL	Transport reverse du cholestérol ; activateur de la LCAT ; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo AV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
apo B100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle : synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDLR
apo B48	intestin	chylomicrons	Structurelle ; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; ligand du récepteur B48R
apo CI	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDLR, LRP et VLDLR
apo CII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
apo CIII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
apo D (apo AIII)	foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
apo E	foie, macrophage, cerveau	chylo, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP

Tableau II : Répartition et fonction des apolipoprotéines
d'après (Toussaint *et al.*, 2003)

b) Métabolisme des lipoprotéines

La circulation des lipides au travers des lipoprotéines s'organise en un réseau complexe et interconnecté que l'on peut diviser en 3 voies principales. On distingue **la voie de transport des lipides exogènes**, qui a lieu uniquement au cours de la période postprandiale, la **voie de production endogène** et enfin la **voie du retour inverse du cholestérol** (pour revues : Béréziat *et al.*, 1999; Toussaint *et al.*, 2003).

- La voie de transport des lipides exogènes

Elle assure la distribution des lipides alimentaires suite à leur absorption par l'intestin. Elle débute par la synthèse intestinale des chylomicrons, volumineuses lipoprotéines dont le contenu en lipides est représenté par 90 % de TG. Dans la lumière intestinale, les lipides subissent l'action des triglycérides lipases, phospholipases et cholestérol estérases. Les AGL, monoglycérides et cholestérol libre produits vont former des micelles et entrer en contact avec la membrane apicale des entérocytes. Les AGL entrent dans la cellule *via* le transporteur FATP4 (fatty acid transport protein 4) et sont pris en charge par la I-FABP (intestinal fatty acid binding protein) dans le cytosol de la cellule. La neutralisation des AGL par la I-FABP et leur estérification en acyl-CoA permettent d'entretenir un gradient favorisant l'entrée des AGL dans l'entérocyte. Ces acyl-CoA serviront ensuite à la synthèse des TG des chylomicrons. Le cholestérol pénètre dans l'entérocyte par l'intermédiaire du transporteur NPC1-L1 (niemann pick C1 like 1) et est estérifié avec un acide gras par l'ACAT-2 (acyl cholesterol acyl transferase) avant d'incorporer les chylomicrons.

La synthèse des lipoprotéines riches en TG, chylomicrons dans l'intestin et VLDL dans le foie, se déroule de la même façon dans le réticulum endoplasmique (RE) des entérocytes et hépatocytes, respectivement. L'apo-B constitue la charpente des chylomicrons et des VLDL, on distingue cependant l'apo-B100 présente dans les VLDL de l'apo-B48 spécifique des chylomicrons. L'apo-B48 est une forme tronquée de l'apo-B100 fabriquée par édition de l'ARN messenger (ARNm) de l'apo-B100 sous l'effet de la désaminase APOBEC-1 (apo-B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 1) exprimée uniquement dans l'intestin chez l'homme (Chan *et al.*, 1997). Le RE est le lieu de biosynthèse des TG à partir des acides gras alimentaires et d'estérification du cholestérol exogène. C'est également le lieu de production de l'apo-B par les ribosomes. Les TG sont ensuite associés à l'apo-B sous l'action de la MTP (microsomal triglyceride transfer protein) (**figure 3**). La MTP transfère

des lipides sur l'apo-B et lui permet d'acquérir une conformation appropriée et de poursuivre sa translocation dans le réticulum endoplasmique. Au terme de cette première étape, une lipoprotéine intermédiaire est formée. Cette dernière subit alors une étape de maturation qui consiste en la fusion avec une vésicule lipidique dépourvue d'apo-B et générée par la MTP elle-même. Les chylomicrons sont ensuite concentrés au sein de l'appareil de Golgi dans des vésicules de sécrétion et libérés par les entérocytes dans la lymphe. Les chylomicrons rejoindront la circulation sanguine au niveau de la veine sous clavière gauche où ils acquièrent rapidement les apo-C et E.

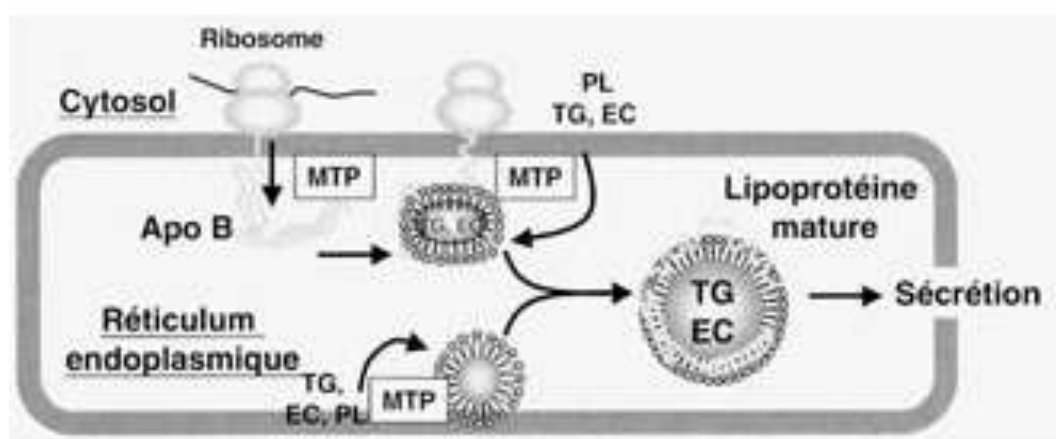


Figure 3 : Synthèse des TRL dans le réticulum endoplasmique des entérocytes et des hépatocytes, d'après (Toussaint *et al.*, 2003)

Les chylomicrons subissent alors l'action de la LPL (lipoprotéine lipase) qui hydrolyse les TG, fournissant des AGL captés par les cellules (**figure 4, en violet**). La LPL est fixée à l'endothélium des capillaires sous forme d'homodimère, elle est activée par l'apo-CII et inhibée par l'apo-CIII. Le rapport apo-CII sur apo-CIII dans les TRL conditionne l'activité de la LPL. La lipolyse des chylomicrons favorise le détachement de composants de surface (PL, CL et apo-AI, AII et AIV) ce qui génère des particules HDL natives. La clairance des résidus de chylomicrons, appelés remnants de chylomicrons, est assurée par un récepteur hépatique liant l'apo-E, le LRP (low density lipoprotein receptor related protein). Il a été montré l'expression d'un récepteur aux remnants de chylomicrons spécifique de l'apo-B48 (apoB48R) dans les macrophages (Brown *et al.*, 2000). *In vitro*, ce récepteur induit la capture des TRL alimentaires par les macrophages et initie leur conversion en cellules spumeuses. La présence de ce récepteur est détectée dans les cellules spumeuses au niveau des lésions athéromateuses chez l'homme (Brown *et al.*, 2000).

- La voie de transport des lipides endogènes

Cette voie assure le transport des lipides endogènes du foie vers les tissus périphériques leur garantissant un apport permanent en TG et cholestérol. Elle met en jeu les lipoprotéines à apo-B100 que sont les VLDL, IDL et LDL. Cette voie est initiée dans les hépatocytes par la synthèse et la sécrétion des VLDL. Leur synthèse dans le RE est identique à celle des chylomicrons dans l'entérocyte (**figure 3**). Les triglycérides hépatiques, constituants majeurs des VLDL, sont synthétisés à partir des AGL exogènes transportés par les chylomicrons, des AGL endogènes issus de la lipolyse du tissu adipeux blanc et proviennent également de la lipogenèse *de novo* hépatique (pour revue : (Postic and Girard, 2008)). Une fois sécrétées dans la circulation sanguine, ces particules acquièrent les apo-C et E. Les VLDL subissent alors l'action de la LPL qui hydrolyse les TG et donne des particules plus petites et plus denses : les IDL (**figure 4, en vert**). Les IDL ne possèdent plus l'apo-C. Les IDL sont le substrat d'une seconde lipase : la lipase hépatique (LH), qui produit des particules enrichies en cholestérol : les LDL. Les LDL perdent l'apo-E et ne contiennent plus que l'apo-B100. Ainsi, tout au long de la cascade VLDL-IDL-LDL, les particules s'appauvrissent en TG, s'enrichissent en cholestérol et deviennent plus petites et plus denses. Cependant, il faut noter l'action de la CETP (cholesterol ester transfert protein) qui permet l'échange de CE des LDL contre des TG des VLDL. Ceci provoque un enrichissement des LDL en TG, qui deviennent un substrat pour la LH produisant ainsi des LDL plus petites et plus denses.

Ces lipoprotéines peuvent être retirées de la circulation sanguine par interaction avec des récepteurs cellulaires spécifiques. De part leur apo-E, les VLDL et IDL sont reconnues et captées par la LRP, le récepteur au VLDL (VLDLR), le récepteur à l'apo-E (apoER) ou le récepteur aux LDL (LDLR). Le VLDLR est peu exprimé au niveau du foie, il est surtout impliqué dans le captage des lipoprotéines par les organes périphériques contrairement au LDLR. Le LDLR, encore appelé récepteur à l'apoB/E, est le seul récepteur capable de reconnaître et d'endocyter les LDL *via* leur apo-B.

- La voie de transport inverse du cholestérol

Elle assure le retour du cholestérol excédentaire des tissus périphériques incapables de le cataboliser vers le foie, principal organe d'élimination du cholestérol de l'organisme. Le

cholestérol sera éliminé directement dans la bile ou après transformation en acides biliaires. Il s'agit donc d'un mécanisme anti-athérogène qui met en jeu les lipoprotéines à apo-A : les HDL. Les particules HDL natives (préβHDL), synthétisées par le foie et l'intestin ou provenant de la lipolyse des particules riches en TG, sont discoïdales et constituées d'une apolipoprotéine échangeable, l'apo-AI, et d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol. Elles ont une forte affinité pour le cholestérol libre, lequel est associé aux phospholipides dans les membranes cellulaires.

L'efflux du cholestérol cellulaire, étape au cours de laquelle le cholestérol est transféré des cellules vers les accepteurs préβHDL, constitue la première phase du transport reverse du cholestérol (**figure 4, en bleu**). Cet efflux de cholestérol est facilité par l'interaction de l'apo-AI avec un transporteur membranaire à activité ATPasique : le transporteur ABCA1 (ATP binding cassette A1). ABCA1 facilite la translocation du cholestérol des pools intracellulaires vers la membrane plasmique. L'efflux de cholestérol est principalement dépendant de la lécithine cholestérol-acyltransférase (LCAT), enzyme associée aux HDL dans le plasma. L'apo-AI active la LCAT qui transfère un acide gras d'un phospholipide vers le cholestérol. Les esters de cholestérol ainsi formés intègrent le cœur de la particule, laquelle prend une forme sphérique et devient une HDL3. Les esters de cholestérol générés par la LCAT et localisés au cœur des particules HDL3 peuvent suivre deux voies métaboliques. Les particules devenues sphériques s'enrichissent en TG par l'intermédiaire de la CETP, qui échange les esters de cholestérol des HDL contre les TG des VLDL. Ces particules dont les TG sont hydrolysés par la lipase hépatique donnent de nouvelles particules de type HDL3 plus petites. Cette action de la CETP est un véritable court-circuit du transport reverse du cholestérol puisque le CE des HDL est alors remis en circulation dans les VLDL.

Dans le compartiment plasmatique, les particules HDL3 peuvent également connaître une étape supplémentaire de maturation sous l'influence de la protéine de transfert des phospholipides (PLTP). À partir de deux particules HDL3, de taille et de densité intermédiaires, et grâce à un processus fusionnel, la PLTP va permettre l'émergence de particules HDL2 de grande taille et de préβHDL. Enfin, les HDL sont capables de délivrer les esters de cholestérol au niveau cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur de la famille des récepteurs scavengers : SR-B1. SR-B1 (scavenger receptor class B member 1) assure la captation sélective du CE, un processus par lequel les esters de cholestérol des HDL pénètrent à l'intérieur de la cellule sans endocytose. Les HDL s'appauvrissent en cholestérol reformant alors des préβHDL.

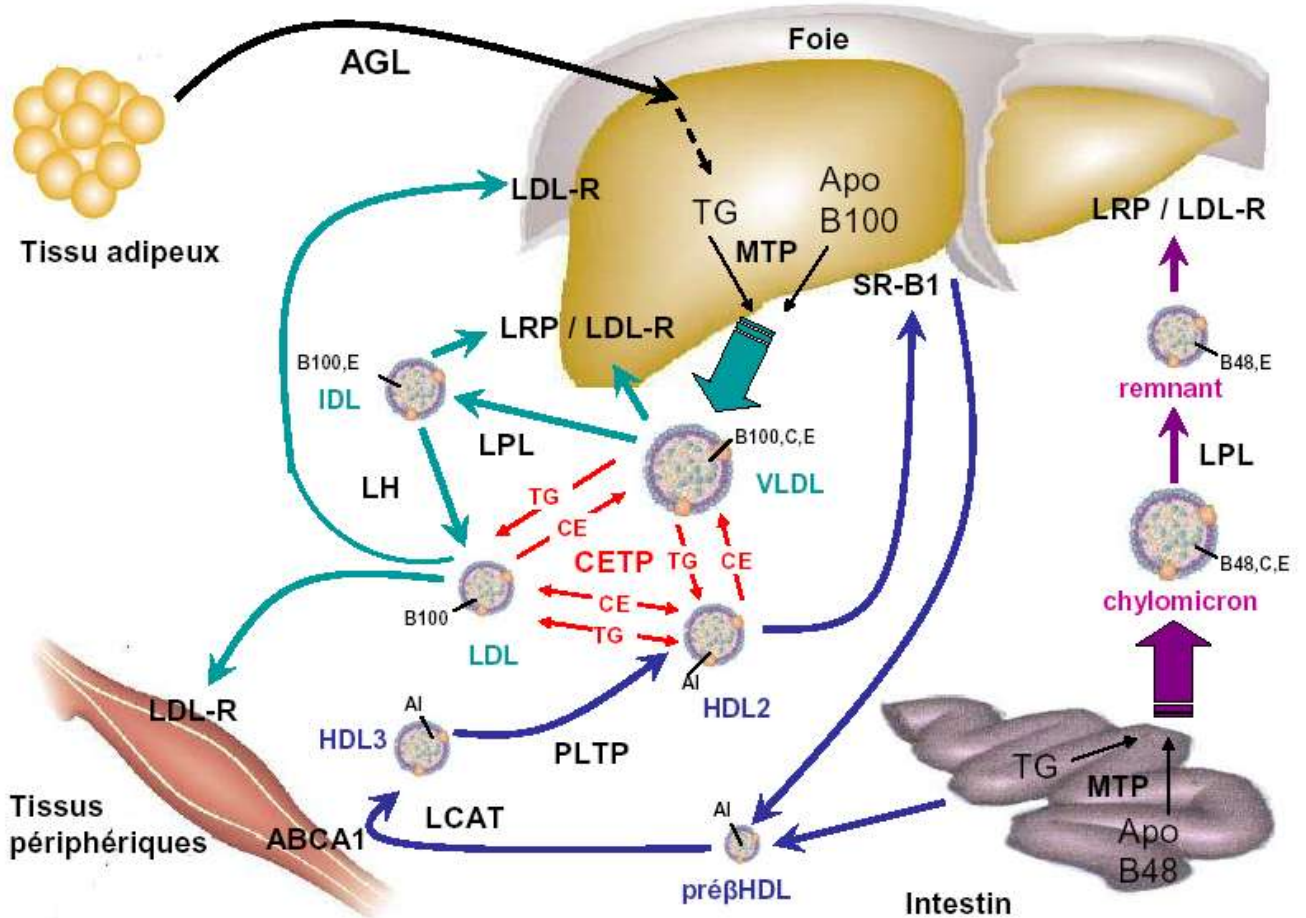


Figure 4 : Métabolisme des lipoprotéines

c) Les dyslipidémies

Les dyslipidémies constituent des troubles du métabolisme des lipoprotéines. A l'heure actuelle, le lien de causalité entre les dyslipidémies et l'apparition de l'athérosclérose est clairement établi. Les dyslipidémies peuvent avoir comme origine la mutation de gènes du métabolisme des lipoprotéines et possèdent ainsi un caractère héréditaire. Elles peuvent aussi être secondaire à certains états physiopathologiques (le diabète et les états d'insulinorésistance, l'hypothyroïdie, la grossesse, l'alcoolisme, les syndromes néphrotiques ou encore les infections au VIH) et à des traitements médicamenteux (diurétiques, stéroïdes, immunosuppresseurs, β -bloquants). Les dyslipidémies secondaires constituent la cause la plus fréquente des anomalies lipidiques observées chez l'adulte. Les dyslipidémies secondaires modifient et aggravent fréquemment le phénotype lipidique des malades ayant une hyperlipidémie primaire (**figure 5**).

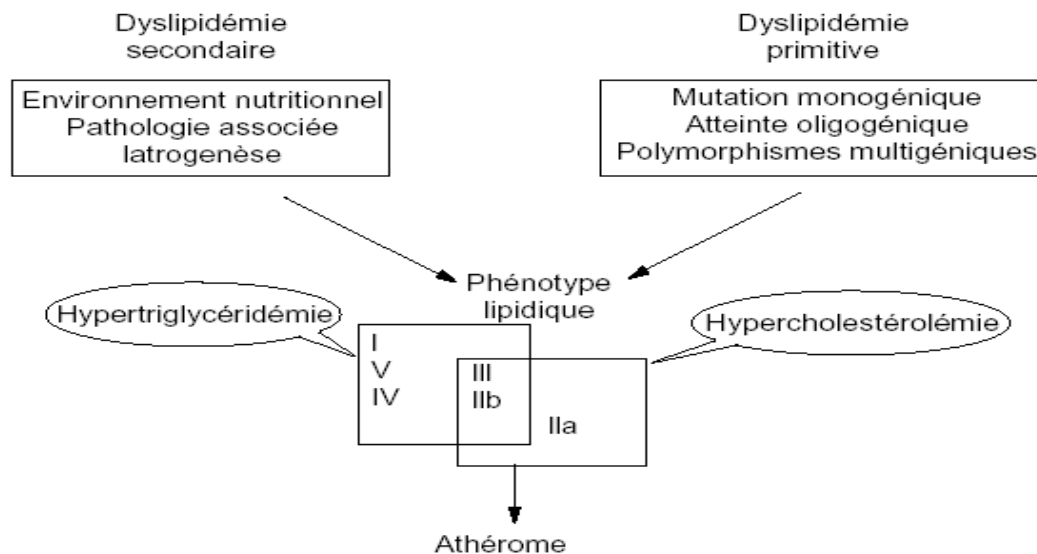


Figure 5 : Interactions entre les différentes dyslipidémies

En 1967, une classification internationale des dyslipidémies a été établie par Fredrickson sur l'aspect du sérum après 12h de jeun. Il décrit ainsi 6 phénotypes :

- les dyslipidémies de **type I** : le sérum est lactescent. On observe une augmentation élevée des TG plasmatiques liée à une augmentation des chylomicrons.
- les dyslipidémies de **type IIa** : le sérum est limpide. Elle est caractérisée par une augmentation du cholestérol associée aux LDL (LDL-C).
- les dyslipidémies de **type IIb** : le sérum est limpide. On a une augmentation des lipoprotéines à apo-B VLDL et LDL, ce qui entraîne une augmentation du cholestérol et des triglycérides plasmatiques.
- les dyslipidémies de **type III** : le sérum est opalescent. Elle est la conséquence d'une augmentation des particules IDL et des remnants de chylomicrons dans le plasma.
- les dyslipidémies de **type IV** : le sérum est opalescent. Elle consiste en une augmentation des VLDL-TG et une diminution du HDL-C. Le LDL-C n'est pas modifié.
- les dyslipidémies de **type V** : le sérum est lactescent. C'est une hypertriglycéridémie causée par une augmentation conjointe des VLDL et des chylomicrons.

De façon plus pragmatique, les dyslipidémies peuvent être séparées en hyperlipidémies et en hypolipidémies. Ces dernières ne sont pas prises en compte dans la classification de Fredrickson.

- Les hyperlipidémies

Les hypertriglycéridémies majeures :

On y trouve les **dyslipoprotéinémies de type IV**. Elles représentent 30% des dyslipidémies. Les concentrations en TG sont élevées du fait d'une augmentation des VLDL. Le LDL-C est normal mais le HDL-C est diminué. Cette dyslipidémie est le plus souvent associée aux états d'insulinorésistance. Les mécanismes moléculaires de la mise en place de cette dyslipidémie dans le syndrome métabolique seront décrits plus loin.

La **dyslipoprotéinémie de type I** ou **hyperchylomicronémie familiale**. Pathologie exceptionnelle, elle concerne 1 patient sur un million. Elle est liée à un déficit congénital de la LPL ou de son activateur l'apo-CII et donc un défaut de la lipolyse. L'hypertriglycéridémie massive se complique dès l'enfance de pancréatites aiguës.

La **dyslipoprotéinémie de type V**. Elle est caractérisée par une augmentation des VLDL et des chylomicrons. Elle est également très rare et possède une clinique proche du type I. Son origine génétique est mal connue. En pratique, on trouve des formes secondaires issues de l'évolution d'une dyslipidémie de type IV.

Les hypercholestérolémies primaires :

On distingue celles qui concernent le HDL-C et celles qui impliquent le LDL-C.

Les **hyperalipoprotéinémies**. Il s'agit d'hypercholestérolémies primaires, modérées et caractérisées par une augmentation du HDL-C et de l'apo-AI sans augmentation du LDL-C. C'est une pathologie silencieuse à transmission autosomique dominante dont le gène muté est la CETP. Ces mutations du gène de la CETP qui provoquent une diminution de son activité sont fréquentes dans le nord du Japon (Inazu *et al.*, 1990).

L'hypercholestérolémie familiale (HF). L'HF est une affection génétique fréquente, résultant d'une mutation du gène codant pour le LDLR. Elle se transmet sur un mode autosomique dominant et se manifeste par une élévation de la concentration plasmatique du LDL-C tout au long de la vie, responsable de la survenue précoce de complications cardiovasculaires. L'autre caractéristique clinique est l'existence de dépôts de cholestérol extravasculaires : les xanthomes et l'arc cornéen. Historiquement, l'HF est la première

anomalie génétique identifiée responsable d'infarctus du myocarde. On peut séparer la population atteinte d'HF en deux groupes : les sujets hétérozygotes ayant hérité d'un seul allèle muté avec une prévalence moyenne d'un cas sur 500 naissances, ce qui classe cette affection comme la maladie génétique la plus fréquente, et les sujets homozygotes porteurs de deux allèles mutés, qu'ils soient identiques ou non, avec une prévalence d'un cas sur 1 million de naissances (Goldstein *et al.*, 1973). La prévalence de l'hétérozygotie est considérablement accrue dans certaines régions du globe : au Québec 1/270, en Afrique du Sud 1/100, chez les Juifs de Lituanie 1/67. Le taux plasmatique de cholestérol total est généralement compris entre 3,50 et 5,50 g/L chez les hétérozygotes et entre 6,0 et 12,0 g/L chez les homozygotes. Le taux de cholestérol LDL moyen chez les hétérozygotes est deux à trois fois plus élevé que chez les sujets sains. Chez les homozygotes, il est deux à trois fois plus fort que chez les hétérozygotes.

La déficience familiale en apo-B100. C'est également une hypercholestérolémie autosomique dominante de type IIa qui implique un défaut de clairance des LDL concernant le ligand du LDLR, l'apo-B qui est mutée dans son domaine de liaison au LDLR. Sa fréquence est de 1 pour 12000. Son tableau clinique est proche de celui de l'HF hétérozygote mais en plus modéré. Les sujets homozygotes ont souvent des taux de cholestérol similaires aux hétérozygotes. Ceci suggère un phénomène d'adaptation pour stimuler la clairance des IDL *via* leur apo-E. On a donc une moindre accumulation des LDL dans le plasma que lorsque le LDLR est muté.

L'hypercholestérolémie autosomique récessive. C'est une maladie rare (inférieure à 1 pour 5000), homozygote, due à une mutation du gène ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia). ARH est une protéine adaptatrice de l'ancrage membranaire du LDLR qui provoque l'internalisation du LDLR quand il lie une particule de LDL. Un défaut de cette protéine empêche donc l'internalisation du LDLR et des LDL.

Hypercholestérolémie et athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire des artères de gros et moyens calibres. Les pathologies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose (accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, artérite des membres inférieurs) sont la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. L'hypercholestérolémie, et plus particulièrement l'augmentation du LDL-C, est un facteur de risque primordial de l'athérosclérose. L'augmentation des particules de LDL dans la circulation sanguine va favoriser leur infiltration dans la paroi des artères. Sur place, elles peuvent subir des modifications oxydatives et vont entraîner l'activation des cellules de

l'endothélium vasculaire. Les monocytes recrutés vont internaliser les LDL oxydées *via* leurs récepteurs scavenger et se transformer à la longue en cellules spumeuses. Les cellules spumeuses s'accumulent dans la paroi artérielle, formant le noyau lipidique de la future plaque d'athérome. Sous l'action des cytokines pro-inflammatoires des macrophages spumeux, les cellules musculaires lisses de la média prolifèrent, perdent leur caractère contractile, et entourent le noyau lipidique, constituant la chape fibreuse de la plaque d'athérome. Par la suite, la plaque d'athérome peut devenir hémorragique et se compliquer avec la mise en route des cascades de coagulation et d'agrégation des plaquettes, obstruant encore plus la lumière des vaisseaux : c'est l'accident ischémique aïgu (Ross, 1999).

Traitement des hypercholestérolémies par les statines. Les statines constituent la classe de médicaments hypocholestérolémiants la plus prescrite pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Les statines sont des inhibiteurs compétitifs de la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol. En diminuant ainsi le cholestérol intracellulaire, les statines augmentent l'activité du facteur de transcription SREBP2 (sterol response element binding protein 2). SREBP2 contrôle positivement l'expression des gènes qui augmentent le cholestérol intracellulaire, comme la HMGCoA reductase mais surtout le LDLR. Ainsi l'augmentation de l'expression du LDLR permet l'épuration des LDL de la circulation sanguine essentiellement au niveau du foie.

Les hyperlipidémies mixtes :

Les hyperlipidémies mixtes sont caractérisées par une augmentation conjointe des concentrations plasmatiques de cholestérol et de TG.

L'hyperlipidémie combinée familiale (HCF). L'HCF recoupe les dyslipidémies de type IIa, IIb et de type IV. L'HCF se caractérise par sa variabilité d'expression au sein d'une famille et chez un même individu au cours du temps, ce qui rend difficile son diagnostic. Sa fréquence est de 5 pour 1000. L'HCF comprend une hyperproduction des lipoprotéines à apo-B et une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG. Elle est également associée à une augmentation de la proportion de LDL petites et denses. Sa physiopathologie reste mal connue tant au plan métabolique qu'au plan génétique où les études familiales ont trouvé une association avec différents loci.

L'hyperprotéïnémie de type III ou dysβlipoprotéïnémie familiale. C'est une hyperlipidémie mixte génétique caractérisée par une accumulation des remnants des

chylomicrons et des VLDL. L'anomalie moléculaire principale est la présence de l'isoforme E2 de l'apo-E à l'état homozygote. Cette dyslipidémie est consécutive à une mauvaise reconnaissance de l'apo-E à ces récepteurs membranaires, ce qui diminue la clairance des remnants de chylomicrons et des VLDL / IDL. Sa fréquence est de 1 pour 10000.

- Les hypolipidémies

Les hypoβlipoprotéinémies et les aβlipoprotéinémies

Ces anomalies sont liées à un défaut de production de l'apo-B qui peut être total (aβ) ou partiel (hypoβ). Les formes incomplètes sont causées par des mutations du gène de l'apo-B entraînant la formation d'une apo-B tronquée. La forme complète d'aβlipoprotéinémie est une affection rare, autosomique récessive, liée à l'impossibilité de fabriquer des VLDL ou chylomicrons à cause d'une mutation du gène de la MTP. Ces défauts donnent lieu, dès la première enfance, à des déficits neurologiques centraux associés à une stéatose majeure et à un défaut d'absorption intestinale des lipides et des vitamines liposolubles (Gregg and Wetterau, 1994).

Les hypoαlipoprotéinémies

La maladie de Tangier se caractérise par des concentrations effondrées en HDL-C, une athérosclérose précoce dès l'enfance, des manifestations neuro-périphériques et une hypertrophie orangée des amygdales. Très rare, elle se transmet sur le mode autosomique récessif. Ces anomalies sont la conséquence du déficit du gène codant le transporteur ABCA1, qui conduit l'efflux du cholestérol à partir de la cellule vers l'apo-AI acceptrice du cholestérol. Ainsi, le cholestérol en excès s'accumule dans la cellule alors que la formation des préβ-HDL, étape initiale du retour inverse du cholestérol vers le foie, est compromise (pour revue : (Brunham *et al.*, 2008; Tang and Oram, 2009).

D'autres hypoHDLémies sont consécutives à des déficits sur les gènes de l'apo-AI ou bien de la LCAT.

2) Syndrome métabolique et diabète de type 2

a) Définition du syndrome métabolique

Les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose représentent la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. L'athérosclérose a une origine multifactorielle, parmi lesquels l'obésité et le diabète de type 2 qui atteignent des proportions épidémiques dans ces pays. La perte de sensibilité à l'insuline, et l'hyperinsulinémie consécutive, sont au centre d'un état clinique qualifié de syndrome métabolique, encore nommé syndrome d'insulinorésistance ou syndrome X. Le syndrome métabolique se définit comme une constellation d'anomalies métaboliques et hémodynamiques qui gravitent autour de l'axe obésité viscérale / insulinorésistance (Eckel *et al.*, 2005) (**figure 6**). Ces pathologies : dyslipidémie mixte, hypertension, obésité abdominale, diabète de type 2, stéatose hépatique mais également un état pro-inflammatoire et pro-coagulant sont autant de facteurs de risque cardiovasculaire susceptibles d'altérer l'intégrité de l'endothélium vasculaire et de favoriser la survenue de l'athérosclérose (Eckel *et al.*, 2005).

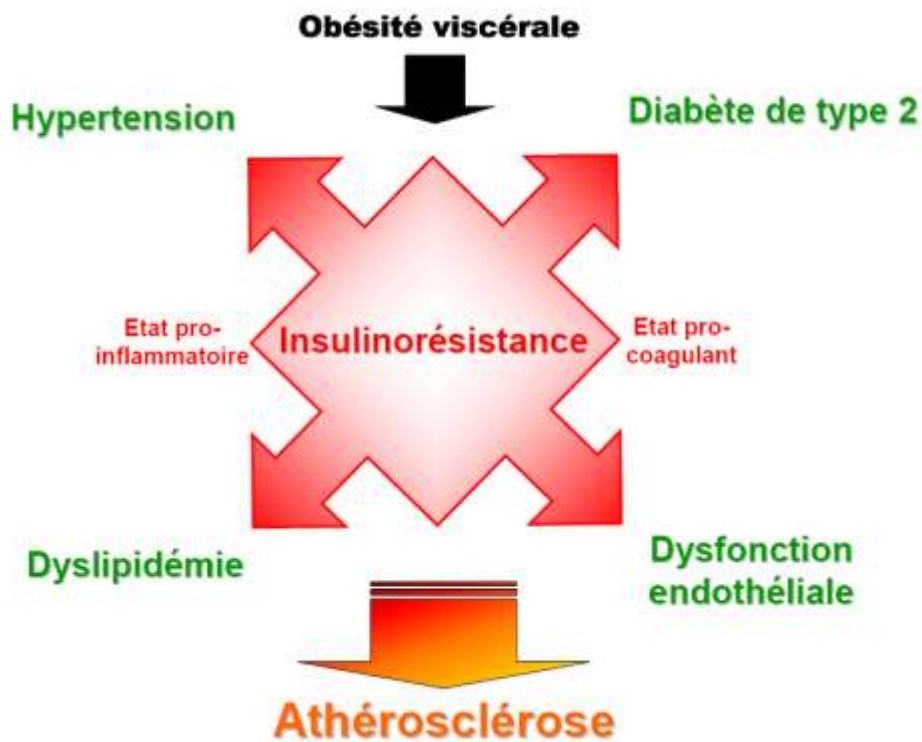


Figure 6 : Pathologies associées au syndrome métabolique

Ce concept de syndrome métabolique existe depuis 80 ans, puisqu'il était déjà décrit dans les années 1920 par Kylin. Plus tard, en 1947, Vague attirait l'attention sur l'obésité de type androïde comme facteur commun associé avec le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. De nombreuses définitions cliniques du syndrome métabolique ont été proposées depuis la première, en 1998, par un groupe d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Depuis, d'autres définitions ont été formulées par le National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) et le Groupe Européen pour l'Etude de l'Insulinorésistance. Ces définitions concordent sur les composants essentiels : hyperglycémie, obésité abdominale, hypertension et dyslipidémie, mais diffèrent dans les critères (**tableau III**). La définition de l'OMS et du Groupe Européen pour l'Etude de l'Insulinorésistance incluent toutes deux l'hyperglycémie à jeun et l'insulinorésistance comme composant essentiel. Dans la définition de l'ATP III, ce composant n'est pas inclus. Récemment, un groupe d'experts de l'International Diabetes Federation (IDF) a proposé une nouvelle définition, dérivée de celle du NCEP-ATP III, mais qui pose l'obésité abdominale comme un élément obligatoire de la définition du syndrome (**tableau III**). Cette définition se veut internationale et les seuils de tour de taille proposés varient suivant les différentes ethnies.

Définition de l'OMS
➤ Diabète ou hyperglycémie à jeun ou intolérance au glucose ou insulino-résistance + 2 paramètres suivants ou plus : ➤ Obésité : IMC > 30 ou ratio taille sur hanche > 0.9 (homme) ou > 0.85 (femme) ➤ Dyslipidémie : TG ≥ 1.7 mM ou HDL < 0.9 mM (homme) ou < 1 mM (femme) ➤ Hypertension : pression sanguine > 140 / 90 mmHg ➤ Microalbuminurie : excretion d'albumine > 20 µg/min
Définition du groupe européen pour l'étude de l'insulino-résistance
➤ Insulino-résistance / Hyperinsulinémie + 2 paramètres suivants ou plus : ➤ Obésité centrale: circonférence de la taille ≥ 94 cm (homme) ou ≥ 80 cm (femme) ➤ Dyslipidémie : TG > 2 mM ou HDL < 1 mM ➤ Hypertension : pression sanguine ≥ 140 / 90 mmHg ➤ Glycémie a jeun : ≥ 6.1 mM
Définition du NCEP-ATP III
3 paramètres suivants ou plus : ➤ Obésité centrale: circonférence de la taille > 102 cm (homme) ou > 88 cm (femme) ➤ Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1.7 mM ➤ HDL-C bas : < 1 mM (homme) ou < 1.3 mM (femme) ➤ Hypertension : pression sanguine ≥ 135 / 85 mmHg ➤ Glycémie a jeun : ≥ 6.1 mM
Définition de l'IDF
➤ Obésité centrale: circonférence de la taille ≥ 94 cm (homme) ou ≥ 80 cm (femme) (Europe) + 2 paramètres suivants ou plus : ➤ Hypertriglycéridémie : TG ≥ 1.7 mM ➤ HDL-C bas : < 1 mM (homme) ou < 1.3 mM (femme) ➤ Hypertension : pression sanguine ≥ 135 / 85 mmHg ➤ Glycémie a jeun : ≥ 6.1 mM

Tableau III : Les définitions cliniques du syndrome métabolique

b) Obésité, insulino-résistance, inflammation et stéatose hépatique

L'insuline, sécrétée par les cellules β des îlots pancréatiques, est une hormone clé de l'homéostasie glucidique. L'insuline a une action hypoglycémisante immédiate : en se liant à son récepteur, elle provoque une cascade de réactions intracellulaires stimulant le captage cellulaire du glucose et permettant son effet anabolisant sur le métabolisme glucidique, mais aussi lipidique et protéique (**figure 7**). La liaison de l'insuline à son récepteur induit l'autophosphorylation de celui-ci sur les résidus tyrosine de sa partie cytoplasmique, mais aussi sur les résidus tyrosine de protéines d'ancrage comme les substrats du récepteur à l'insuline 1 et 2 (IRS1, IRS2). Ainsi phosphorylés sur des résidus tyrosines, les IRS 1 et 2 peuvent recruter et activer la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K). La PI3K, à son tour, induit le recrutement la protéine kinase Akt. La voie de signalisation PI3K / Akt est à l'origine

de la transmission des effets métaboliques de l'insuline. Dans le foie, l'insuline stimule la glycogénogenèse et inhibe la néoglucogenèse. Dans les muscles squelettiques, elle induit le captage intracellulaire du glucose *via* la translocation membranaire des transporteurs au glucose de type Glut-4 et stimule la glycogénogenèse et la synthèse protéique. Enfin, dans le tissu adipeux, elle permet le recrutement des Glut-4 et l'inhibition de la lipolyse (Wilcox, 2005).

L'insulinorésistance (IR) se définit comme une situation dans laquelle une insulinémie normale ou élevée produit une réponse biologique anormalement basse. L'IR est positivement corrélée avec l'augmentation de l'IMC (indice de masse corporelle, en kg/m²), du tour de taille et en particulier du rapport taille / hanche (Wilcox, 2005). Ceci reflète une augmentation de la masse adipeuse viscérale qualifiée d'obésité androïde. Le tissu adipeux viscéral correspond à la matière grasse intra-abdominale située autour des intestins et se trouve donc directement en relation avec le foie en empruntant la circulation splanchnique. Parce que les adipocytes du tissu adipeux viscéral possèdent une très forte activité lipolytique intrinsèque, une augmentation de la masse adipeuse abdominale résulte en une élévation marquée du flux d'AGL en direction du foie par la circulation sanguine entraînant ainsi une perte de sensibilité à l'insuline de cet organe (Wajchenberg, 2000). Ce phénomène de lipotoxicité existe également dans les muscles squelettiques. L'accumulation des AGL dans les cellules provoque une augmentation de leurs produits dérivés que sont les diacylglycérols (DAG), les céramides et les acyl-CoA (Kovacs and Stumvoll, 2005). Il est montré que ces molécules activent des protéines kinases C (PKC) atypiques (PKC θ) qui phosphorylent les IRS sur leurs résidus serine et thréonine (**figure 7**) (Shulman, 2000). La phosphorylation des résidus serine / thréonine des IRS, et non plus tyrosine, bloque la transduction intracellulaire du signal insulinique par la voie PI3K / Akt dans les cellules musculaires et hépatiques, mais également dans les adipocytes, accentuant de fait la lipolyse adipocytaire et la libération supplémentaire d'AGL.

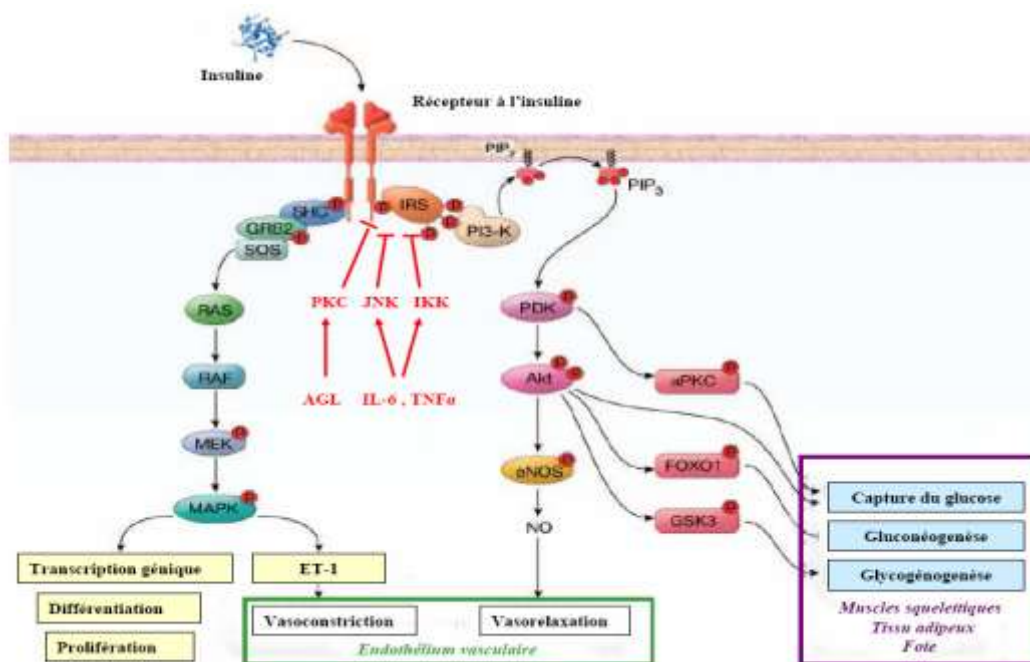


Figure 7 : Voies de signalisation de l'insuline, modifié d'après (Muniyappa *et al.*, 2007)

Mais le tissu adipeux est aussi un véritable organe endocrine. Des données suggèrent la présence de macrophages résidants au sein du tissu adipeux qui seraient responsables du relargage de cytokines pro-inflammatoires TNF α (tumor necrosis factor α) et IL-6 (interleukine 6) dans la circulation sanguine. Ces cytokines agissent sur le foie qui produit alors de la protéine C réactive (CRP) et d'autres protéines de la phase aiguë, contribuant à l'état systémique pro-inflammatoire. Mais ces concentrations plasmatiques élevées de TNF α et d'IL6 ont aussi une action négative sur la sensibilité à l'insuline puisque ces cytokines activent dans les cellules des sérines kinases comme la c-jun N-terminale kinase (JNK) et l'inhibitor κ B kinase (IKK) qui diminuent la voie de signalisation de l'insuline dépendante des IRSs (**figure 7, en rouge**). De plus, alors que l'augmentation de l'obésité viscérale s'accompagne d'une augmentation des concentrations circulantes d'AGL et d'adipokines pro-insulinorésistantes comme la résistine, on constate une diminution de la production adipocytaire de l'adiponectine, cytokine anti-inflammatoire et insulinosensibilisatrice (Eckel *et al.*, 2005; Stumvoll *et al.*, 2005). Le tissu adipeux est également responsable de la production du plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), alors que le foie sécrète davantage de fibrinogène dans ces conditions. Ceci est à l'origine d'un état pro-coagulant dans le syndrome d'insulinorésistance.

La stéatose macrovésiculaire correspond à l'accumulation de lipides au sein des hépatocytes. Elle peut se compliquer de lésions inflammatoires et dégénératives définissant la stéatohépatite (NASH : non-alcoholic steatohepatitis). Dans la grande majorité des cas, la stéatose non alcoolique survient chez des sujets présentant des éléments cliniques ou biologiques du syndrome métabolique. La stéatose correspond à l'accumulation de TG au sein des hépatocytes ; sa définition est donc histologique. Cette accumulation doit en théorie représenter plus de 5 % du poids total du foie. Quand à la stéatose se surajoutent des lésions inflammatoires lobulaires et une ballonnisation des hépatocytes et si ces lésions surviennent chez un sujet présumé non consommateur excessif d'alcool, on parle de stéatohépatite non alcoolique (NASH) dont la définition est donc à la fois histologique et clinique. Avec l'afflux important d'AGL vers le foie au cours de l'IR, ces lipides vont s'accumuler sous leur forme de stockage que sont les TG. Il faut noter que ces états d'insulinorésistance sont liés, en partie du moins, à une altération des capacités oxydatives des mitochondries à consommer les lipides, ce qui favorise leur accumulation hépatique. Ce dysfonctionnement de la fonction mitochondriale génère des espèces toxiques de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries. C'est ce stress oxydatif excessif qui provoque des lésions dégénératives hépatocytaires liées à la destruction de membranes cellulaires par peroxydation lipidique. Par ailleurs, les produits finaux de cette peroxydation (malonedialdéhyde, hydroxynonenal) favorisent la fibrose et la réaction inflammatoire par induction de cytokines inflammatoires et chémoattraction de polynucléaires. Ces mécanismes inflammatoires, associés à des excès de TNF α et une carence en adiponectine pourraient favoriser le passage de la stéatose vers la stéatohépatite.

c) Dyslipidémie mixte

Une importante complication de l'insulinorésistance est l'apparition d'un profil dyslipidémique pro-athérogène caractérisé à jeun par une **hypertriglycérémie** (augmentation des VLDL-TG), une **diminution du cholestérol des HDL** (HDL-C), ainsi qu'une **augmentation des LDL petites et denses** (small dense LDL ou sdLDL) (Kolovou *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006).

L'augmentation de la synthèse des TG hépatiques servant à la fois de substrats à la MTP pour l'assemblage des VLDL, mais assurant également la stabilité de l'apo-B, contribue à l'augmentation de la production des VLDL. De plus, l'insuline réprime normalement

l'expression de la MTP et stimule la dégradation de l'apo-B100. La mise en place de l'IR hépatique par les mécanismes décrits précédemment est associée à une augmentation de l'activité de la MTP et des concentrations en apo-B100, favorisant de même la surproduction hépatique des particules à apo-B100 (Adeli *et al.*, 2001). Enfin, l'hypertriglycémie s'explique aussi par une diminution de la lipolyse des VLDL par la LPL, conséquence d'une diminution de l'expression de la LPL et d'une augmentation du rapport Apo CIII / CII des VLDL (Ginsberg *et al.*, 2005).

Les variations concernant les LDL sont essentiellement qualitatives. Il n'y a pas toujours d'augmentation de la concentration en LDL mais un changement de leur taille vers des particules plus petites et plus denses qui pénètrent plus facilement dans la paroi artérielle (Taskinen, 2003). Associé à l'altération du transport inverse du cholestérol (diminution des HDL-C), le profil lipidique obtenu est clairement pro-athérogène. Une augmentation de l'activité CETP est retrouvée dans l'IR, ce qui favorise la génération de LDL et de HDL enrichies en TG (augmentation des LDL-TG et HDL-TG). Or, ces LDL et HDL enrichies en TG deviennent des substrats pour la LH, dont l'activité est aussi augmentée dans l'IR. Sous l'action de la LH, les LDL-TG donnent naissance aux sdLDL. L'hydrolyse des HDL-TG par la LH a comme effet de totalement dissocier la particule de HDL et de provoquer l'excrétion de l'Apo-AI par les reins (Kolovou *et al.*, 2005; Ginsberg *et al.*, 2005).

Avec l'IR, le métabolisme des chylomicrons et de leur remnants est également altéré. Plus précisément, la période postprandiale est caractérisée par une hypertriglycémie (augmentation des TRL-TG) et s'étend sur une durée plus longue. Ainsi non seulement les concentrations des particules à apo-B48 sont plus élevées, mais cette élévation dure plus longtemps (Owens, 2003). L'hypertriglycémie postprandiale est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (Taskinen, 2003). Ceci témoigne d'une diminution de l'élimination de ces particules, conséquence de la réduction de l'activité LPL, de l'augmentation du rapport Apo CIII / CII dans les TRL et par une compétition plus accrue entre VLDL et chylomicrons pour la LPL du fait de la présence importante des VLDL dans l'IR (Taskinen, 2003; Ginsberg *et al.*, 2005). De même, il est constaté une diminution de la clairance des remnants de chylomicrons dans l'IR (Martins and Redgrave, 2004). Un certain nombre de données provenant de l'étude de modèles animaux laisse présager un rôle des entérocytes dans l'exacerbation de la période postprandiale dans les états d'IR. Il est montré que les entérocytes de hamsters dorés insulino-résistants synthétisent et sécrètent davantage de lipides, d'apo-B48 et de chylomicrons (Haidari *et al.*, 2002). Une augmentation de la masse et

de l'activité de la MTP intestinale est également retrouvée. Ce modèle animal a permis de montrer que l'insuline n'est plus capable de réduire la sécrétion intestinale d'apo-B48 chez les animaux insulino-résistants, ceci en association avec l'altération de la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes (Federico *et al.*, 2006). Chez l'homme, l'IR est associée à une augmentation de la production des chylomicrons montrée par étude cinétique du métabolisme des lipoprotéines (Duez *et al.*, 2006).

d) Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 a atteint des proportions épidémiques et touche plus de 170 millions d'individus à travers le monde. Dans les pays industrialisés, le diabète de type 2 a une prévalence de l'ordre de 6%. De plus, 4% des adolescents obèses ont un diabète et 25% ont une intolérance au glucose (Stumvoll *et al.*, 2005). Le diabète est diagnostiqué selon les recommandations de l'OMS de 1999 sur la glycémie à jeun et 2h après une charge orale en glucose (75g). Le diabète est déclaré pour une glycémie supérieure ou égale à 7 mM (1.26 g/l) à jeun ou 11.1mM (2 g/l) 2h après une charge orale de 75g de glucose. L'intolérance au glucose concerne les individus avec des glycémies à jeun inférieure à 7 mM et une glycémie après la charge de glucose comprise entre 7.8 mM (1,40 g/l) et 11.1 mM. L'hyperglycémie modérée à jeun se définit par une glycémie supérieure à 6 mM (1,10), mais inférieure à 7 mM. Ces 2 états définissent le pré-diabète.

Le diabète de type 2 est une composante classique du syndrome métabolique et résulte de l'aggravation des états d'insulino-résistance. L'insuline est l'hormone de contrôle de la glycémie. Ainsi, la normoglycémie est maintenue à la fois par la sensibilité à l'insuline des organes métabolisant le glucose (foie, muscles, tissu adipeux) et par la production même de l'insuline par les cellules β des îlots du pancréas (**figure 8**). Dans les états d'insulino-résistance, la diminution de l'action de l'insuline peut être corrigée par une hyperinsulinémie compensatrice. Cette situation peut se maintenir pendant une dizaine d'années. Mais lorsque la cellule β ne sera plus en mesure de produire suffisamment d'insuline, le profil glycémique des patients insulino-résistants s'orientera progressivement vers une intolérance au glucose puis un diabète de type 2 déclaré (**figure 8**) (Stumvoll *et al.*, 2005). Avec la perte de sensibilité à l'insuline, l'altération de la fonction des cellules β à sécréter l'insuline est une composante majeure dans l'apparition du diabète de type 2 ; ces mécanismes délétères seront expliqués en détail plus loin.

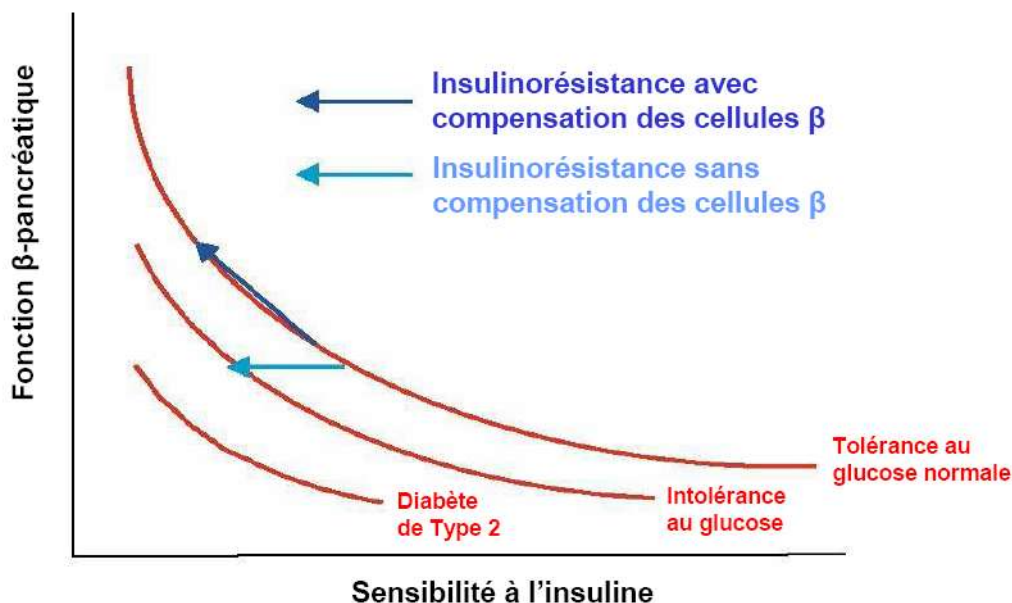


Figure 8 : Relation entre sensibilité à l'insuline et insulinosécrétion, modifié d'après (Stumvoll *et al.*, 2005)

3) Cholestérol et sécrétion d'insuline

a) Mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion

L'entrée du glucose dans la cellule β est l'élément initiateur de la cascade d'événements conduisant à la sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine. La première phase de l'insulinosécrétion stimulée par le glucose consiste à métaboliser le glucose. La production d'ATP qui en résulte permet le couplage avec la seconde phase qui correspond aux mécanismes d'excitation-sécrétion des granules d'insuline (**figure 9**).

Ainsi, tout est fait pour que la cellule β soit en mesure de répondre aux moindres changements de glycémie. En effet, le glucose entre dans la cellule β par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique à haute capacité, Glut-2. Ceci permet un équilibre quasi immédiat et permanent entre les concentrations extracellulaires et intracellulaires de glucose. Ensuite, le glucose est phosphorylé en glucose 6-phosphate (G6P) par une hexokinase à faible affinité : la glucokinase (GK), capable d'augmenter la production de G6P dans la gamme de valeurs physiologiques de la glycémie. Le G6P entre alors dans la glycolyse pour produire du pyruvate, lequel subit les mécanismes oxydatifs dans la mitochondrie conduisant à la production d'ATP. L'élévation du rapport des concentrations ATP/ADP constitue une étape clef dans le lien entre les phénomènes métaboliques et l'exocytose des granules d'insuline.

L'augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants $K_{ir6.2}$. La diminution de la perméabilité aux ions potassium et leur accumulation dans le cytosol conduisent à la dépolarisation de la cellule β , entraînant l'activation des canaux calciques voltages dépendant Ca_v et un flux entrant de calcium dans la cellule. C'est l'augmentation du calcium intracellulaire qui déclenche l'exocytose des granules d'insuline. Il existe 2 types de granules d'insuline dans la cellule β . Un pool de granules dit directement mobilisable et un pool de réserve. La sécrétion d'insuline est donc biphasique. Le pool de granules directement mobilisable est situé très proche de la membrane plasmique, et donc plus rapidement à disposition pour fusionner avec la membrane plasmique et libérer le contenu granulaire dans l'espace extracellulaire. Ces granules contribuent au pic précoce de sécrétion d'insuline observé lors d'une stimulation des cellules β avec du glucose. Le pool de réserve est lui responsable de la phase tardive de la sécrétion d'insuline. L'arrimage des granules d'insuline à la membrane plasmique se fait grâce à un complexe macromoléculaire impliquant les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive NSF-attachement protein receptor). Associées aux granules d'insuline, ce sont les v-SNARE parmi lesquelles on distingue les synaptotagmines et la protéine VAMP-2 (vesicle associated membrane protein 2) encore appelée synaptobrévine. Du côté de la membrane plasmique, les t-SNARE comprennent la syntaxine et SNAP 25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa). Suite à la liaison des v-SNARE et des t-SNARE, l'étape finale de fusion proprement dite reste encore très mal définie quant à ses mécanismes.

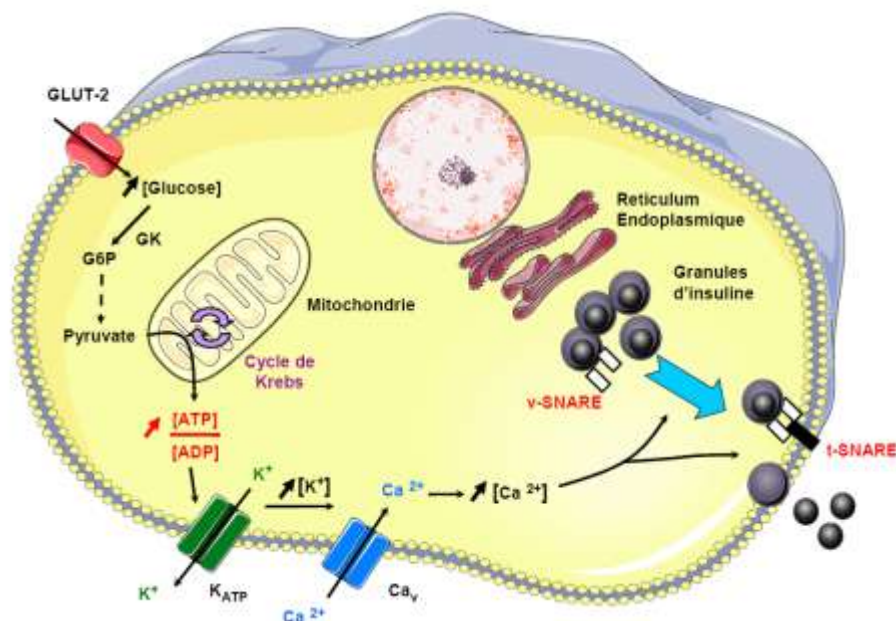


Figure 9 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans la cellule β

b) Régulation de l'insulinosécrétion

- Régulation neurohormonale

Les îlots des Langerhans sont richement innervés par le système nerveux autonome. Le système nerveux parasympathique stimule la sécrétion d'insuline (pour revue : (Ahren, 2000)). A la surface des cellules β sont exprimés des récepteurs à 7 domaines transmembranaires à l'acétylcholine : les récepteurs muscariniques de type 3 (M3). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G. L'activation de ces récepteurs lors d'une stimulation vagale conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) dans la cellule β et donc à la production de DAG et d'inositol 3 phosphate (IP3). L'IP3 provoque la libération de calcium du RE induisant une augmentation du calcium intracellulaire et la sécrétion des granules d'insuline. Egalement produit au cours de l'activation de la PLC, le DAG va activer les protéines kinase C qui modulent diverses protéines effectrices de l'excitation de la cellule β et de l'exocytose. A l'inverse, la stimulation sympathique, au travers des nerfs splanchniques, inhibe la sécrétion d'insuline à l'état basal et stimulée par le glucose. La noradrénaline va activer des récepteurs α_2 -adrénergiques au niveau de la cellule β qui entraînent une diminution des concentrations en AMP cyclique (AMPC) dans la cellule. Au final, la stimulation adrénergique provoque une hyperpolarisation de la cellule β conséquence d'une augmentation de l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendants qui diminue le seuil d'excitabilité des cellules. Cette régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline permet à l'organisme de maintenir la glycémie dans différentes manifestations physiologiques comme lors de la préparation à la prise alimentaire pour diminuer la glycémie sous l'effet du nerf vague ou au contraire au cours de l'exercice physique qui stimule le système sympathique.

Mais la sécrétion d'insuline peut également être régulée plus localement, au sein même de l'îlot. Les îlots de Langerhans sont composés majoritairement de cellules β , puis de cellules α sécrétrices du glucagon et enfin de cellules δ sécrétrices de la somatostatine. La somatostatine (SST) est une hormone peptidique que l'on peut trouver sous 2 formes : une de 14 acides aminés (SST-14) et une autre de 28 acides aminés (SST-28). Le pancréas produit majoritairement la forme SST-14, tout comme les tissus gastriques et les neurones. La forme SST-28 est principalement produite au niveau de l'épithélium intestinal (pour revue : (Ballian *et al.*, 2006)). Il existe 5 récepteurs à la somatostatine (SSTR1 à 5). Ce sont tous des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La cellule β exprime majoritairement SSTR1 et 5. La somatostatine, sécrétée de manière glucodépendante comme l'insuline, inhibe la sécrétion d'insuline. Le rôle paracrine de la cellule δ sur la cellule β dans

l'îlot a été récemment démontré sur des îlots isolés de souris invalidées pour la somatostatine. *Ex vivo*, la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose est amplifiée dans les îlots des souris déficientes en SST par rapport aux îlots des souris sauvages (Hauge-Evans *et al.*, 2009).

- Rôle des incrétines

Les incrétines sont des hormones peptidiques sécrétées par certaines cellules de l'épithélium intestinal lors de la prise alimentaire. En agissant directement sur la cellule β du pancréas, ces hormones vont potentialiser l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline postprandiale. Ce concept de dialogue entre l'intestin et le pancréas formant alors un axe entéro-insulaire est né de l'observation faite dans les années 1960 qu'une charge en glucose orale conduit à une plus grande stimulation de la sécrétion d'insuline qu'une même charge administrée par voie intraveineuse (ELRICK *et al.*, 1964). Responsables de la majorité de l'effet insulinosécrétoire en réponse aux nutriments, le GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) et le GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1) partagent une large homologie de séquence. Le long du tractus intestinal, le GIP est exprimé dans les cellules K concentrées dans le duodénum et le jéjunum proximal. Le GLP-1 est lui produit plus en aval dans les cellules L du jéjunum et de l'iléon. Au niveau de la cellule β , le GIP et le GLP-1 se lient à des récepteurs spécifiques à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G capables d'induire l'adénylate cyclase et la phospholipase C, conduisant à l'activation respective de la PKA et de la PKC. Ces protéines kinases vont phosphoryler divers intervenants de la machinerie insulinosécrétoire dépendante du glucose afin de potentialiser son effet (inactivation des canaux potassiques, activation des canaux calciques). Les incrétines ont donc un effet synergique avec le glucose et n'ont pas d'effet sur la sécrétion d'insuline en son absence. En plus de l'effet insulinothépe, les incrétines augmentent également la transcription du gène de l'insuline, favorisent la prolifération des cellules β et inhibent leur apoptose avec pour résultante une augmentation de la masse β -pancréatique. L'attention de la recherche pharmaceutique s'est focalisée sur la potentialisation de l'effet incrétine à travers le développement d'analogues du GLP-1 et d'inhibiteurs de la DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4), une enzyme impliquée dans la dégradation du GLP-1 et du GIP de la circulation sanguine.

- Rôle des AGL

Les AGL sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β des îlots de Langerhans (Berne, 1975b; Malaisse *et al.*, 1985), provenant soit de la circulation sanguine, soit de l'hydrolyse des réserves intracellulaire des TG et de PL. Bien qu'il soit clairement établi que les AGL dans la cellule β soient essentiels pour une stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (GSIS) (Dobbins *et al.*, 1998) et que l'exposition à court terme de cellules β en présence d'AGL potentialise le GSIS (Prentki *et al.*, 2002; Roduit *et al.*, 2004), les AGL ne sont pas des sécrétagogues de l'insuline. En effet, leur action sur la sécrétion d'insuline est strictement gluco-dépendante et la rapidité de cet effet *in vitro* suggère un mode d'action comparable à celui des incrétines (Prentki *et al.*, 1992; Warnotte *et al.*, 1994; Warnotte *et al.*, 1999; Yaney *et al.*, 2000). Nous allons donc voir quels sont les mécanismes par lesquels les AGL modulent la sécrétion d'insuline.

Le consensus dans la voie de stimulation de la sécrétion d'insuline par le métabolisme du glucose est que la production d'ATP qui en résulte conduit à la fermeture des canaux potassiques et donc à la dépolarisation de la cellule (**figure 10**). Or cette voie n'explique pas pourquoi les AGL, substrats de la cellule β , ne stimulent par la sécrétion d'insuline sans présence de glucose. Il existe donc une voie alternative à la voie canaux potassiques-dépendante impliquée dans le GSIS. Classiquement, le pyruvate issu de la glycolyse est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et entre dans le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie. En réalité, une partie non négligeable du pyruvate est métabolisé *via* la pyruvate carboxylase (PC) en acide oxaloacétique (AOA) dans la voie de l'anaplérose / cataplérose (MacDonald *et al.*, 1992) (**figure 10, en bleu**). L'anaplérose se réfère aux processus par lesquels le cycle de Krebs est réapprovisionné en ses intermédiaires (AOA), alors que la cataplérose correspond à la sortie de ses intermédiaires en dehors du cycle. Parmi ceux-là, le malonyl-CoA va jouer un rôle très important entre les métabolismes glucidique et lipidique. Le malonyl-CoA est synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Le malonyl-CoA est un inhibiteur allostérique de la carnitine palmytoyltransférase 1 (CPT1) et donc de la β -oxydation des acyl-CoA à longues chaînes (acyl-CoA LC) par la mitochondrie, favorisant ainsi l'accumulation cytosolique des acyl-CoA LC. Ceci explique les observations d'une diminution de l'oxydation des acides gras dans les îlots stimulés par le glucose (Berne, 1975a; Berne, 1975b; Vara and Tamarit-Rodriguez, 1986). Ainsi le glucose provoque un shift de l'oxydation des lipides vers l'oxydation du glucose. L'accumulation des

acyl-CoA LC oriente leur métabolisme vers l'estérification en TG. Le glucose fournit de plus le glycérol-3-phosphate nécessaire à l'estérification.

Dans la cellule β , les TG sont majoritairement hydrolysés. En effet, il existe dans la cellule β un cycle futile estérification/lipolyse qui prévient la stéatose et dissipe l'énergie excessive des substrats en chaleur (**figure 10, en vert**). Pour être repris dans le cycle estérification/lipolyse, les AGL exogènes ou produits par la lipolyse subissent l'action de l'acyl-CoA synthase (ACS). Cette enzyme ATP-dépendante induit la production d'AMP et l'élévation du rapport AMP/ATP, ce qui stimule l'AMPKinase. Cette enzyme inhibe l'ACC et favorise la dégradation du malonyl-CoA, permettant ainsi l'oxydation des Acyl-CoA LC, évitant la stéatose. Mais surtout, ce cycle estérification/lipolyse est à l'origine de nombreux signaux lipidiques amplificateurs du GSIS (Martin *et al.*, 1992;Prentki and Corkey, 1996;Prentki *et al.*, 2002;Nolan *et al.*, 2006), comme les dérivés des esters des acyl-CoA LC. Ainsi l'augmentation des PL et du DAG peut activer des PKC qui vont phosphoryler des canaux ioniques (Yaney *et al.*, 2000) et les protéines clés dans la régulation de l'exocytose ou modifier directement l'état d'acylation de ces protéines (Deeney *et al.*, 2000).

Enfin, les AGL circulants peuvent se fixer sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G : le récepteur GPR40 (encore nommé FFAR1) au niveau de la cellule β (Itoh *et al.*, 2003;Steneberg *et al.*, 2005) (**figure 10, en rouge**). La transduction du signal AGL par ce récepteur augmente la concentration en calcium intracellulaire grâce à la libération de calcium depuis les réserves réticulaires *via* l'induction de la PLC et la production d'IP3 ; mais aussi grâce à la potentialisation de l'entrée du calcium depuis les canaux calciques voltage dépendants et l'inhibition des canaux potassiques repolarisant la membrane plasmique (Feng *et al.*, 2006). Là encore, l'effet des AGL nécessite au préalable l'activation par le glucose de l'influx calcique par les canaux calciques.

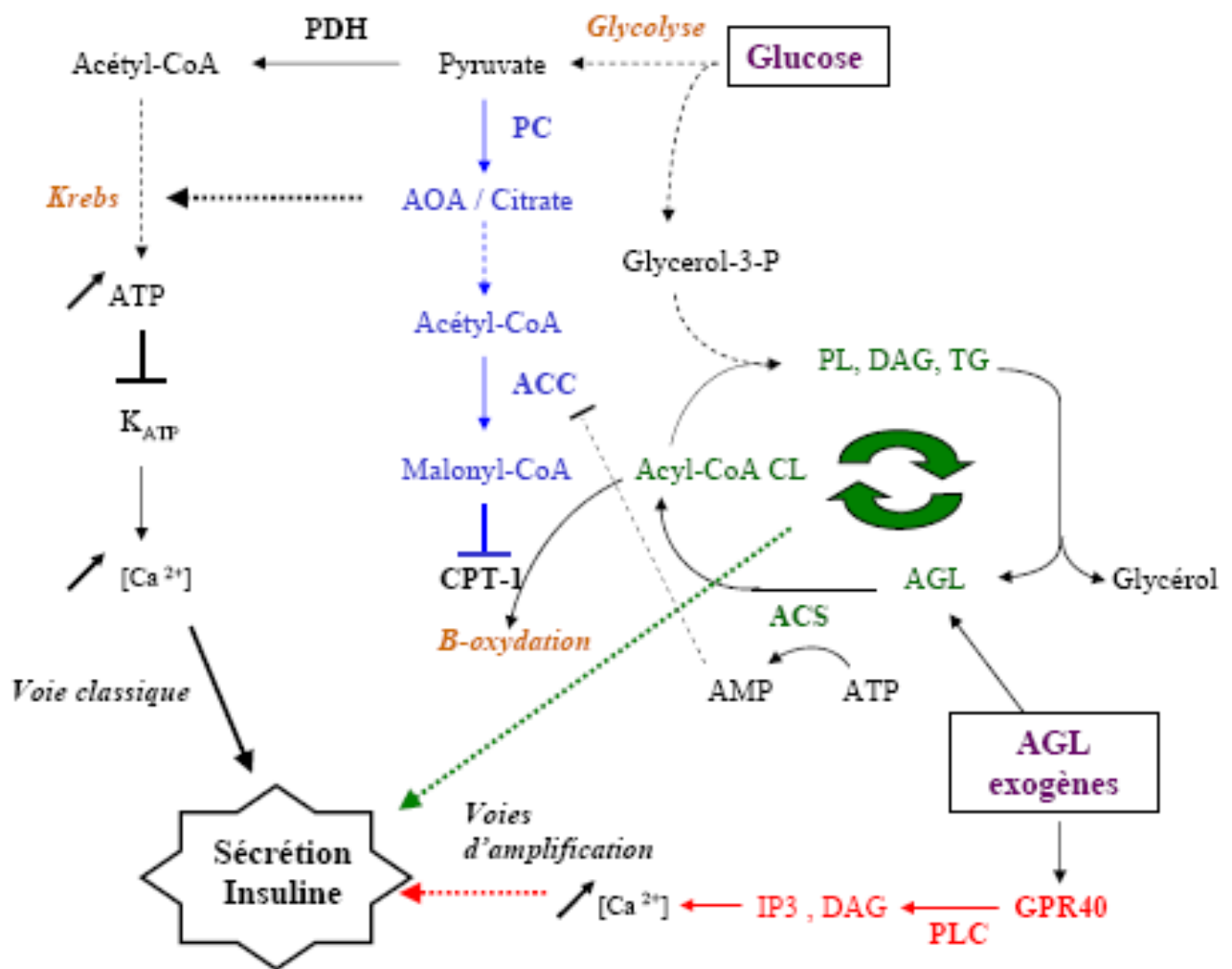


Figure 10 : Voies d'interactions métaboliques et d'amplification de la sécrétion d'insuline par les AGL

b) Dysfonction de la cellule β dans le diabète de type 2

- Mécanismes compensateurs de l'insulinorésistance

Dans les états d'insulinorésistance, la normoglycémie peut être maintenue par une augmentation de l'insulinosécrétion au travers d'un phénomène de compensation des cellules β . Ceci inclut à la fois une augmentation de la fonction même de la cellule β et une expansion de leur masse. Les voies mécanistiques conduisant à l'augmentation de la fonction et de la masse des cellules β sont indissociables et ont des origines communes (**figure 11**). Avec la suralimentation, l'augmentation des nutriments (et plus particulièrement le glucose et les AGL) va jouer un rôle important dans l'adaptation de la cellule β à l'insulinorésistance. Ainsi,

selon les mécanismes décrits précédemment, l'augmentation de l'utilisation du glucose, de son oxydation, de la voie anaplérose/cataplérose et du cycle des TG/AGL conduisent à une production accrue des molécules de signalisation nécessaires à l'exocytose de l'insuline. L'augmentation de l'apport en nutriments au niveau intestinal induit également une augmentation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules intestinales (van Citters *et al.*, 2002). En plus de l'augmentation du couplage entre les nutriments et la sécrétion, un accroissement concomitant de la biosynthèse d'insuline est nécessaire au maintien de la fonction β -cellulaire à ce stade. Le glucose et le GLP-1 semblent être les stimuli majeurs pour l'activation de la transcription du gène de l'insuline (Melloul *et al.*, 2002). L'activation du facteur de transcription PDX-1 (pancreas-duodenum homeobox-1) par le GLP-1 est impliquée dans cette régulation du gène de l'insuline (Li *et al.*, 2005). PDX-1 est important dans la prolifération et la survie des cellules β . Sa stimulation par le GLP-1 peut expliquer l'effet stimulateur des incrétines sur la masse des cellules β (Jhala *et al.*, 2003).

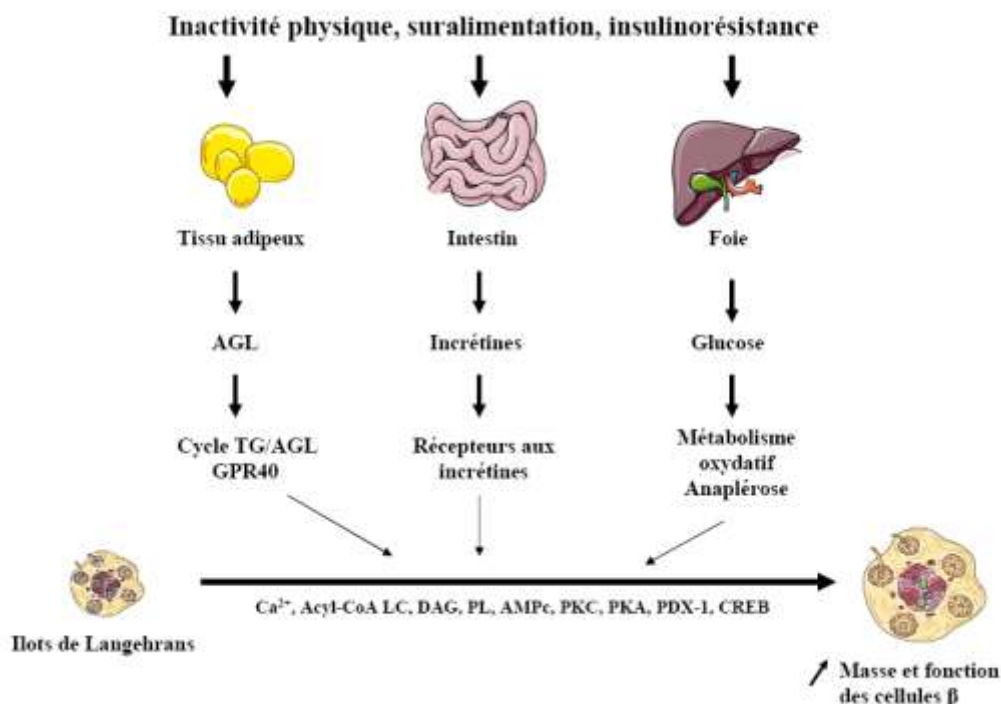


Figure 11 : Mécanismes de la compensation β -cellulaire dans l'insulinorésistance

- Lipotoxicité

La normoglycémie est maintenue dans les états d'insulinorésistance sous l'effet d'une hyperinsulinémie compensatrice par les cellules β . L'altération des processus de compensation, liée à une susceptibilité génétique et à un stress environnemental, va entraîner la survenue d'une intolérance au glucose avec le risque d'évoluer vers un diabète de type 2. Ce défaut de compensation est en partie expliqué par une apoptose accrue des cellules β , résultant en une perte d'environ 40% de la masse des cellules β chez l'intolérant au glucose et de 60% chez le diabétique de type 2 (Butler *et al.*, 2003). Outre ces anomalies quantitatives, les cellules β restantes présentent une dysfonction insulinosécrétoire, aggravant encore la capacité des îlots à compenser l'insulinorésistance. Les acides gras sont considérés comme des facteurs importants participant à l'étiologie du diabète de type 2 (McGarry, 1992; McGarry, 2002). Des études de pancréas isolés et perfusés réalisées *in vitro* montrent clairement que l'exposition prolongée des îlots de Langerhans aux acides gras entraîne une inhibition de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Girard, 1995). De la même manière que le foie ou le muscle, la surcharge en lipides dans les îlots pancréatiques est délétère à long terme, aussi bien sur leur survie (lipotoxicité) que sur la fonction β -cellulaire elle-même. Nous allons maintenant passer en revue les principaux mécanismes par lesquels les lipides provoquent une dysfonction de la cellule β .

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce rôle inhibiteur des acides gras sur l'insulinosécrétion en réponse au glucose. L'accumulation des acyl-CoA empêcherait la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants et contribuerait ainsi à une perte de sensibilité de la cellule β au glucose. Ensuite, l'exposition prolongée des cellules β aux acides gras va modifier l'expression de gènes du métabolisme du glucose et des lipides. On observe ainsi une diminution du transporteur Glut-2, de la glucokinase, de l'ACC (Prentki *et al.*, 2002) et une augmentation de la CPT-1 (Girard, 1995) conduisant à une moindre détection du glucose par la cellule β . De plus, l'augmentation du métabolisme oxydatif des AGL par les mitochondries va conduire à une surproduction d'espèces toxiques en oxygène. Afin de protéger la cellule de l'exposition aux espèces toxiques en oxygène et de limiter leur production, la mitochondrie va surexprimer la protéine découplante UCP2 (uncoupling protein 2) dans la cellule β (Krauss *et al.*, 2003; Lowell and Shulman, 2005). UCP2 aide à la détoxification des substrats énergétiques en dissipant l'énergie produite par leur oxydation en chaleur plutôt qu'en produisant de l'ATP. Cependant, en procédant de la sorte, la mitochondrie produit moins d'ATP ce qui provoque une diminution de la sécrétion d'insuline

(Krauss *et al.*, 2003;Lowell *et al.*, 2005). En d'autres termes, découpler la phosphorylation oxydative et diminuer la production d'ATP est le prix à payer pour réduire la production d'espèces toxiques en oxygène en condition de surcharge en substrats énergétiques.

Ces phénomènes sont aggravés par une apoptose des cellules β accrue du fait de l'augmentation de la production de radicaux libres sous l'action de certains acides gras. Le contenu élevé en lipides entraînerait une augmentation de la synthèse de céramide, l'excès de palmitoyl-CoA s'associant à la sérine pour former un céramide. Le céramide induit l'expression de la NOS inductible (iNOS) et la production de NO. Le NO, en se fixant au site de liaison de l'oxygène sur la cytochrome C oxydase de la mitochondrie inhibe la chaîne respiratoire. Ceci provoque un découplage des phosphorylations oxydatives, la mitochondrie libère alors du cytochrome C qui active les caspases responsables de l'apoptose (Girard, 2003).

- Stress du RE et dépôt amyloïdes

D'autres phénomènes concourent à la dysfonction β -cellulaire, tel le stress du réticulum endoplasmique. Les protéines de conformation anormale constituent une menace pour la cellule. Le RE est un lieu essentiel de synthèse et de maturation des protéines cellulaires sécrétées par la cellule. Les protéines nouvellement synthétisées aux conformations incorrectes seront transportées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome. Dans certaines conditions où la quantité de protéines mal conformées provoque la saturation des mécanismes de dégradation, ces protéines vont alors s'accumuler créant une situation de stress du RE. Les cellules soumises à ce stress se défendent *via* l'UPR (unfolded protein response) qui est l'activation des gènes codant pour les protéines de la voie sécrétrice et de la voie de dégradation des protéines. Si le stress est trop intense ou de trop longue durée, l'UPR conduit au déclenchement de l'apoptose des cellules (Eizirik *et al.*, 2008b).

Nous avons vu que du fait de l'IR, la demande insulinosécrétrice est importante et induit un hyperfonctionnement du RE. Cette production accrue d'insuline peut dépasser les capacités de maturation protéique du RE et conduire à la sécrétion de proinsuline puis à une apoptose β -cellulaire (Eizirik *et al.*, 2008a). L'amyline ou IAPP (islet amyloid polypeptide) est un peptide de 37 acides aminés cosécrété en même temps que l'insuline lors de la stimulation par le glucose. Lorsque l'IAPP est mal replié, son caractère hydrophobe est augmenté et son oligomérisation est favorisée. L'implication de la formation de ces dépôts

amyloïdes dans la physiopathologie du diabète de type 2 reste toujours sujet à discussion. Sur des analyses autopsiques, les dépôts amyloïdes sont retrouvés dans la plupart, mais pas tous, des îlots des patients diabétiques de type 2 (Knowles *et al.*, 2002). Des travaux récents suggèrent que l'apparition des dépôts amyloïdes impliquerait le stress du RE (Hayden *et al.*, 2005) mis en route suite à une demande accrue en insuline. Ces dépôts amyloïdes sont cytotoxiques au sein des îlots de Langerhans. Ils favorisent la déstructuration de l'architecture insulaire et une altération du transport des nutriments des capillaires vers la cellule.

c) Métabolisme du cholestérol et fonction β -cellulaire

- Effet direct du cholestérol sur la sécrétion d'insuline

Nous venons de voir que l'accumulation d'acides gras libres et de triglycérides au sein de la cellule β est néfaste sur sa fonction insulino-sécrétrice. Récemment, un nombre croissant de travaux suggère que la fonction β -cellulaire est influencée par le contenu intracellulaire en cholestérol. SREBP2 est le facteur de transcription qui stimule la synthèse endogène de cholestérol. En surexprimant SREBP2 spécifiquement dans la cellule β chez la souris (Tg- β -SREBP2), Ishikawa et collaborateurs (Ishikawa *et al.*, 2008) ont provoqué une augmentation des concentrations en cholestérol dans les îlots. Les souris Tg- β -SREBP2 deviennent diabétiques avec une diminution de la sécrétion d'insuline. Comparées aux souris sauvages, les souris Tg- β -SREBP2 ont une diminution du nombre et de la taille des îlots, ainsi qu'une diminution du contenu en insuline dans les cellules β . Ces changements phénotypiques attestent de troubles de la différenciation des cellules β provoqués par la surexpression de SREBP2. Les auteurs constatent en effet une diminution de l'expression des facteurs de transcription PDX-1 et BETA2, tous deux importants pour le développement et la survie de la cellule β .

De même, une autre étude montre clairement que l'accumulation de cholestérol dans la cellule β diminue la sécrétion d'insuline (Hao *et al.*, 2007). En utilisant un modèle d'hypercholestérolémie : les souris invalidées pour l'apo-E (apo-E^{-/-}), les auteurs induisent uniquement une augmentation du cholestérol dans les îlots des souris apo-E^{-/-} par rapport aux îlots des souris sauvages. En pratiquant des tests de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose *ex vivo* sur îlots isolés, on observe une altération de la sécrétion d'insuline chez les îlots de souris apo-E^{-/-}. Des résultats identiques sont retrouvés avec des lignées de cellules β

de rat, les INS-1, traitées avec du cholestérol en culture. En croisant ces souris apo-E^{-/-} avec des souris *ob/ob* obèses et diabétiques, les auteurs induisent une augmentation plus importante du cholestérol dans les îlots des souris *ob/ob*;apo-E^{-/-} par rapport aux îlots des souris apo-E^{-/-}, ceci étant associé à une abolition de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose *ex vivo*. A l'inverse, la déplétion en cholestérol dans des îlots isolés de souris sauvages traitées par une statine, la mévastatine, ou par un agent chélateur du cholestérol : la méthyl-β-Cyclodextrine (MβCD) potentialise la sécrétion d'insuline *ex vivo*. Ainsi, le traitement d'îlots de souris *ob/ob*;apo-E^{-/-} par la MβCD réduit le contenu en cholestérol et restaure la sécrétion d'insuline par rapport aux îlots des souris *ob/ob*;apo-E^{-/-}.

Chez l'homme, il existe très peu de données cliniques attestant d'un lien entre métabolisme du cholestérol et diabète. La première démonstration qu'une intervention sur le métabolisme du cholestérol influence l'apparition du diabète concerne une analyse post-hoc de l'étude WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) (Freeman *et al.*, 2001) dans laquelle un traitement par statine, la pravastatine, diminue l'incidence du diabète de type 2 de 30%. Néanmoins ces données sont controversées. En effet, il a été récemment retrouvé dans l'étude JUPITER (Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) avec la rosuvastatine, une augmentation de l'incidence des cas de diabète dans le bras statine (Ridker *et al.*, 2008a). Les statines sont les médicaments hypocholestérolémiants par excellence. En bloquant la synthèse endogène de cholestérol, elles diminuent la concentration en cholestérol intracellulaire. Ainsi ces données cliniques et expérimentales attestent du fait que modifier le contenu en cholestérol dans la cellule β influence la sécrétion d'insuline. Des études interventionnelles chez l'homme, ciblant spécifiquement le rôle des statines sur la fonction β cellulaire, seront nécessaires pour déterminer la nature exacte de ce lien.

- Rôle du transporteur ABCA1 sur la sécrétion d'insuline

Les concentrations intracellulaires en cholestérol ne sont pas seulement régulées par la synthèse en cholestérol mais également par son efflux. Le transporteur membranaire ABCA1 conduit l'efflux du cholestérol de la cellule vers l'apo-AI appauvrie en lipides qui est le constituant des HDL et le principal « accepteur » de cholestérol. Il s'agit de la première étape du transport reverse du cholestérol. Chez l'homme, les mutations homozygotes de *ABCA1* causent la maladie de Tangier caractérisée par une incapacité à éliminer le cholestérol

cellulaire, des niveaux bas de HDL-Cholestérol et un risque accru de maladies coronariennes (pour revue : (Brunham *et al.*, 2008). La maladie de Tangier est une maladie génétique rare, et aucune donnée n'existe sur un lien possible entre cette maladie causant des troubles du métabolisme du cholestérol et le métabolisme glucidique. Néanmoins, il existe un nombre de polymorphismes de *ABCA1* associés au diabète de type 2 dans plusieurs groupes ethniques (pour revue : (Brunham *et al.*, 2008). En particulier, les individus porteurs du variant R230C dans la population Mexicaine développent un diabète de type 2 précoce (Villarreal-Molina *et al.*, 2007).

Des études menées chez la souris montrent que l'inactivation globale pour *ABCA1* entraîne une intolérance au glucose sans effet sur la sensibilité à l'insuline (McNeish *et al.*, 2000). Le récepteur nucléaire LXR (Liver X Receptor) est un activateur majeur de la transcription de *ABCA1* (Costet *et al.*, 2000). Les souris invalidées pour LXR β ont moins d'ARNm de *ABCA1* dans les îlots. Ceci est associé avec une accumulation de cholestérol dans l'îlot, une intolérance au glucose et une diminution de la sécrétion d'insuline (Gerin *et al.*, 2005). A l'inverse, l'activation de LXR induit l'expression de *ABCA1* dans des lignées de cellules β , les MIN6, et stimule la sécrétion d'insuline dans les îlots isolés de rat (Efanov *et al.*, 2004).

ABCA1 est détecté dans le pancréas entier à de faibles niveaux d'expression, mais il est fortement exprimé dans les îlots de Langerhans (Efanov *et al.*, 2004; Brunham *et al.*, 2007). Brunham et collaborateurs se sont intéressés spécifiquement au rôle de *ABCA1* dans la cellule β (Brunham *et al.*) et ont mis en évidence un rôle important de *ABCA1* sur la fonction insulino-sécrétrice. En générant des souris invalidées pour *ABCA1* spécifiquement dans la cellule β , les auteurs n'altèrent pas de façon systémique le métabolisme du cholestérol puisque ces souris ont des concentrations en cholestérol plasmatique identiques aux souris sauvages. Par contre, ces souris développent une intolérance au glucose associée à des troubles de la sécrétion d'insuline *in vivo*. *Ex vivo*, les souris invalidées pour *ABCA1* dans la cellule β accumulent le cholestérol dans les îlots. Il n'y a pas de différence morphologique et les taux d'ARNm du gène de l'insuline sont identiques comparés aux souris sauvages. Les îlots isolés des souris invalidées pour *ABCA1* ont une sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et le chlorure de potassium altérée par rapport aux îlots des souris sauvage, suggérant des troubles de l'exocytose des granules d'insuline provoqués par l'accumulation de cholestérol. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle délétère de l'accumulation intracellulaire du cholestérol pour la sécrétion d'insuline.

La seconde information capitale de ces travaux est la démonstration que ABCA1 serait un lien moléculaire au niveau de la cellule β pour l'effet bénéfique des glitazones sur la sécrétion d'insuline. Chez les individus avec une intolérance au glucose, un traitement à la rosiglitazone réduit l'incidence du diabète de type 2 (Gerstein *et al.*, 2006). La rosiglitazone possède des effets bénéfiques protecteurs sur la fonction β -cellulaire chez l'homme (Cavaghan *et al.*, 1997) et le rat (Higa *et al.*, 1999). Premièrement, Brunham et collaborateurs montrent que la rosiglitazone stimule l'expression de ABCA1 dans les INS-1. Des souris sauvages nourries avec un régime riche en graisse développent une intolérance au glucose corrigée sous traitement par la rosiglitazone. Cependant, les souris invalidées pour ABCA1 dans la cellule β ne répondent plus au traitement à la rosiglitazone, suggérant qu'une partie des effets bénéfiques de la rosiglitazone sur la fonction β -cellulaire soit conduite par l'induction de l'expression de ABCA1 et la réduction du cholestérol intracellulaire (Brunham *et al.*).

- Rôle des lipoprotéines et du LDLR sur la sécrétion d'insuline

Nous avons vu que le diabète de type 2 s'accompagne de troubles du métabolisme des lipoprotéines. Ces troubles peuvent-ils influencer la fonction β -cellulaire *via* l'entrée du cholestérol dans la cellule β ? Le diabète de type 2 se déclare quand la masse fonctionnelle de cellules β ne peut plus compenser l'insulinorésistance. De nombreuses études expérimentales se sont intéressées aux effets des différentes classes de lipoprotéines sur la fonction et la survie des cellules β . Si la cellule β possède bien les acteurs de base du métabolisme du cholestérol comme SREBP2 et ABCA1, un certain nombre de travaux montrent que les récepteurs aux lipoprotéines sont présents et fonctionnels à la surface de la cellule β (**figure 12**). Parmi ceux-ci, le rôle du récepteur aux LDL (LDLR) est sans doute le plus étudié.

En 1997, Cnop et collaborateurs ont montré que les îlots isolés humains et de rats peuvent lier, internaliser et dégrader les LDL (Gruppig *et al.*, 1997). L'expression du LDLR dans la cellule β fut par la suite confirmée dans un grand nombre de modèles de cellules β : en culture primaire d'îlots et de cellules β isolées d'homme, de rat et de souris (Cnop *et al.*, 2002) ; (Roehrich *et al.*, 2003) ou dans des lignées tumorales de souris tels que les MIN-6 et les β TC3 (Roehrich *et al.*, 2003), de rat comme les INS-1 (Abderrahmani *et al.*, 2007) ou les HIT-15 chez le hamster (Okajima *et al.*, 2005). Les VLDL, les LDL et les HDL ont la capacité de modifier la fonction et la survie des cellules β . L'exposition aux LDL *in vitro* est

toxique pour les cellules β . La mort par nécrose est constatée chez les cellules β isolées de rat (Cnop *et al.*, 2002) et par apoptose dans les îlots isolés de souris (Roehrich *et al.*, 2003) avec une diminution de l'ARNm de l'insuline. De même, l'exposition aux VLDL apparaît délétère sur la cellule β (Roehrich *et al.*, 2003). Une étude récente montre que l'incubation d'îlots isolés avec des LDL altère la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose chez l'homme et la souris (Rutti *et al.*, 2009). De façon intéressante, les îlots isolés des souris invalidées pour le LDLR sont protégés de cet effet délétère des LDL sur la sécrétion d'insuline. Cependant, les contenus en cholestérol ne sont pas rapportés dans cette étude afin de valider l'hypothèse de l'influence du cholestérol intracellulaire sur la sécrétion d'insuline. Contrairement aux études précédentes, il n'y a pas d'effet toxique des LDL sur la mort des cellules β , ni de modification du contenu en insuline et de l'expression ARNm du gène de l'insuline par le traitement aux LDL (Rutti *et al.*, 2009). Il semble que les LDL perturbent néanmoins la prolifération des cellules β chez l'homme et la souris, action à priori indépendante de l'expression du LDLR puisque que les îlots isolés des souris LDLR^{-/-} subissent toujours une altération de la prolifération cellulaire en réponse à de fortes concentrations en LDL (Rutti *et al.*, 2009).

Dans cette étude, l'incubation des îlots pancréatiques de souris et humains en présence de HDL conduit à une diminution de l'apoptose des cellules β en condition normale, sans effet des HDL sur la prolifération cellulaire et la sécrétion d'insuline (Rutti *et al.*, 2009). L'apoptose induite par de fortes concentrations en glucose et par la cytokine IL-1 β est abolie par les HDL. Cette protection des HDL s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques de la iNOS et de Fas dans les îlots de souris (Rutti *et al.*, 2009). L'effet pro apoptotique des LDL et VLDL décrit précédemment implique l'activation de la voie JNK et l'induction du clivage de la caspase-3 (Roehrich *et al.*, 2003). Les HDL inhibent le clivage de la caspase-3 et protègent la cellule β contre l'effet apoptotique des LDL et des VLDL. Enfin, les LDL oxydées se montrent capables de réprimer l'expression du gène de l'insuline et de provoquer une diminution de la sécrétion d'insuline par l'activation de JNK (Abderrahmani *et al.*, 2007) (Okajima *et al.*, 2005). Là encore, la présence des HDL contrebalance les effets causés par les LDL oxydées (Abderrahmani *et al.*, 2007) ; (Okajima *et al.*, 2005). D'autres récepteurs aux lipoprotéines sont présents dans la cellule β du pancréas, tels que CD36, les récepteurs LRP1, VLDLR et ApoER ainsi que le récepteur SR-B1 (Roehrich *et al.*, 2003). Bien que menés essentiellement *in vitro*, l'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que les altérations du métabolisme des lipoprotéines rencontrées dans l'insulinorésistance (augmentation des VLDL et des LDL oxydées, diminution des HDL)

contribuent à l'aggravation du diabète de type 2, ceci en intervenant directement sur la fonction et la survie des cellules β .

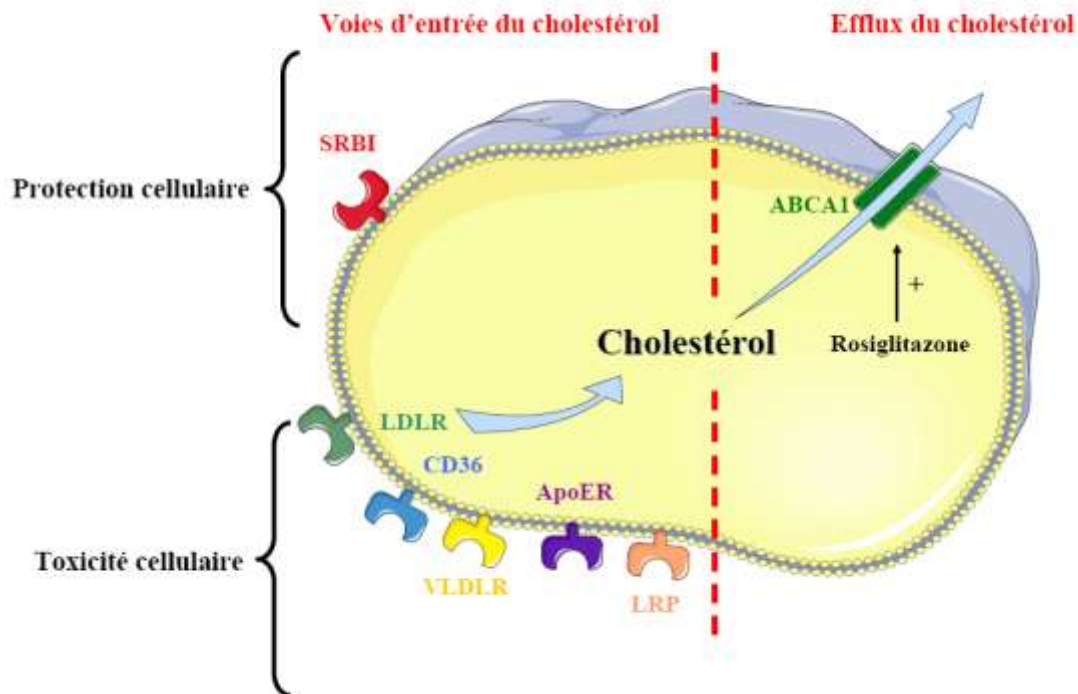


Figure 12 : Récepteurs et transporteurs du cholestérol dans la cellule β

- Mécanismes d'action du cholestérol sur la sécrétion d'insuline

Les mécanismes moléculaires intervenant dans la régulation de la sécrétion d'insuline par le cholestérol restent en partie non élucidés. Comme nous l'avons vu, les événements distaux impliqués dans le couplage stimulation / sécrétion d'insuline font intervenir deux mécanismes : le premier concerne les changements dans l'activité électrique de la cellule β (dépolérisation de la membrane et entrée du calcium dans la cellule) et le second l'exocytose des granules d'insuline régulée par les protéines SNARE. Le cholestérol est un composant structural essentiel, à la fois des granules de sécrétion, mais aussi de la membrane plasmique pour la formation des microdomaines enrichis en cholestérol (Salaun *et al.*, 2004). Ces rafts lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides sont le lieu d'accumulation des protéines SNARE qui forment des clusters de regroupement de ces protéines à la membrane plasmique (Lang, 2007). Il a été montré que la déplétion cellulaire en cholestérol par la M β CD augmente l'exocytose d'insuline dans la lignée β cellulaire HIT-15 par redistribution des canaux potassiques K_v2.1 et des SNARE en dehors des rafts lipidiques (Xia *et al.*, 2004). Pourtant, la

littérature s'avère plutôt négative sur les effets de la M β CD sur les phénomènes d'exocytose d'insuline. En effet, des cellules MIN-6 traitées par M β CD ont une diminution de la sécrétion d'insuline associée à la désintégration des clusters de syntaxine 1 (Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004). De même, dans les îlots isolés de souris, la redistribution de SNAP25 vers le cytosol suite à la dissociation des microdomaines entraîne également une altération de la sécrétion d'insuline (Takahashi *et al.*, 2004; Vikman *et al.*, 2009). Ces effets ne sont pas propres à la M β CD. Ainsi, la déplétion métabolique en cholestérol par l'utilisation du NB598, un inhibiteur de la squalene epoxydase, enzyme qui intervient plus en aval dans la synthèse du cholestérol, altère la sécrétion d'insuline dans les îlots isolés de souris. Ceci est dû à une relocalisation des protéines SNARE en dehors des rafts lipidiques et des canaux calciques Ca $_v$ qui sont alors moins activés (Xia *et al.*, 2008).

Un autre mécanisme est proposé par Hao *et al.* pour expliquer l'influence du cholestérol sur la sécrétion d'insuline (Hao *et al.*, 2007). Celui-ci concerne la phase précoce des événements déclencheurs de la sécrétion d'insuline, puisqu'il implique le métabolisme du glucose dans la cellule β plutôt que la phase d'excitation de la cellule. Plus particulièrement, c'est l'activité de la GK qui est mise en jeu. Cette enzyme est l'étape limitante de l'entrée du glucose dans la glycolyse et est donc cruciale pour la sensibilité de la cellule β à répondre au glucose. La déplétion en cholestérol dans les cellules INS-1 augmente l'activité de la GK, alors qu'à l'inverse son activité est diminuée quand ces mêmes cellules sont cultivées en présence de cholestérol. Sous sa forme dimérisée, la NOS neuronale (nNOS) qui est située sur les granules d'insuline fixe et inhibe la GK. L'augmentation du cholestérol intracellulaire stabilise les dimères de nNOS et accroît son interaction avec la GK (Hao *et al.*, 2007). Ceci réduit la sécrétion d'insuline en limitant la quantité de GK libre disponible pour participer au métabolisme du glucose. Ces effets s'avèrent réversibles puisque la déplétion en cholestérol diminue la dimérisation de la nNOS. En retour, ceci libère plus de GK dans le cytosol permettant la phosphorylation du glucose et donc la sécrétion d'insuline.

- Conclusion sur le rôle du cholestérol dans la sécrétion d'insuline

L'idée générale qui semble se dégager de l'ensemble de ces travaux est qu'une augmentation du cholestérol dans la cellule β altère la sécrétion d'insuline alors que la déplétion en cholestérol potentialise la sécrétion d'insuline.

Cependant, il apparaît des contradictions quant aux événements impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline par le cholestérol intracellulaire. Le type de modèle utilisé : étude *ex vivo* ou *in vitro*, culture primaire ou de lignées, cellule humaines ou murines, ainsi que les moyens mis en oeuvre pour moduler les concentrations de cholestérol : modèles génétiquement modifiés, traitement pharmacologique, effet aigu ou chronique, doivent être ainsi pris en compte pour discuter la variabilité de ces résultats

Chez l'homme, l'hypercholestérolémie familiale n'est pourtant pas reconnue comme étant associée au développement d'un diabète de type 2. Une explication mécanistique pourrait être la suivante : c'est parce que l'endocytose du LDL-cholestérol n'est plus possible que ces individus vont développer une hypercholestérolémie. Or le LDLR doit permettre l'endocytose des LDL dans la cellule pour induire une dysfonction de la cellule β . Ainsi, les îlots isolés de souris LDLR déficientes, qui sont un modèle d'hypercholestérolémie, sont protégés de la toxicité de l'incubation de LDL par rapport aux îlots de souris sauvages (Roehrich *et al.*, 2003). En ce qui concerne la maladie de Tangier et le rôle de ABCA1 dans la fonction β -cellulaire, on peut se demander pourquoi ces individus ne développent pas de diabète de type 2. Une hypothèse pour expliquer ceci est que les patients atteints de cette maladie ont une diminution du cholestérol total, avec en particulier des taux de LDL-C réduit de 40 à 70 % (Schaefer *et al.*, 2001). Cette baisse du LDL-Cholestérol peut être bénéfique pour empêcher une accumulation du cholestérol dans les cellules β et partiellement masquer un trouble du métabolisme du glucose.

En dehors de l'étude WOSCOPS qui rapporte un effet bénéfique de la pravastatine sur la réduction de l'incidence du diabète (Freeman *et al.*, 2001), seuls les travaux de Hao et collaborateurs montrent qu'un traitement à la mévastatine potentialise la sécrétion d'insuline (Hao *et al.*, 2007). Pourquoi n'y a-t-il pas alors plus d'exemple citant les statines comme efficaces pour prévenir le diabète de type 2 ? Trois études indépendantes ont montré qu'un traitement d'îlots isolés de rat ou de MIN-6 par des statines lipophiles (simvastatine, atorvastatine et lovastatine) sont toxiques sur la cellule β , alors que la pravastatine, hydrophile, est sans effet (Metz *et al.*, 1993; Yada *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2006). Quoiqu'il en soit, le lien entre métabolisme du cholestérol et sécrétion d'insuline apparaît étroit. Davantage de travaux doivent être menés afin d'éclaircir les mécanismes moléculaires de cette régulation. Une partie de mon projet de thèse a consisté en l'étude du rôle de PCSK9 dans le pancréas au travers du métabolisme du cholestérol (voir la partie travaux personnels).

4) Acides biliaires et métabolisme des lipides

a) Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles synthétisées exclusivement au niveau du foie à partir du cholestérol. La synthèse des acides biliaires représente donc l'étape ultime du catabolisme du cholestérol. La cascade de réactions qui convertit des molécules hydrophobes de cholestérol en composés miscibles dans l'eau leur confère des propriétés détergentes cruciales pour leur fonction première : la solubilisation et l'absorption intestinale des lipides alimentaires ainsi que des vitamines liposolubles A, D, E et K (Lefebvre *et al.*, 2009; Hylemon *et al.*, 2009). Les produits immédiats de la cascade de formation hépatique des acides biliaires sont les acides biliaires (AB) primaires. L'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) sont les AB primaires chez l'homme (**figure 13**). Ces AB peuvent être transformés respectivement par les bactéries intestinales en AB secondaires que sont l'acide déoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LA).

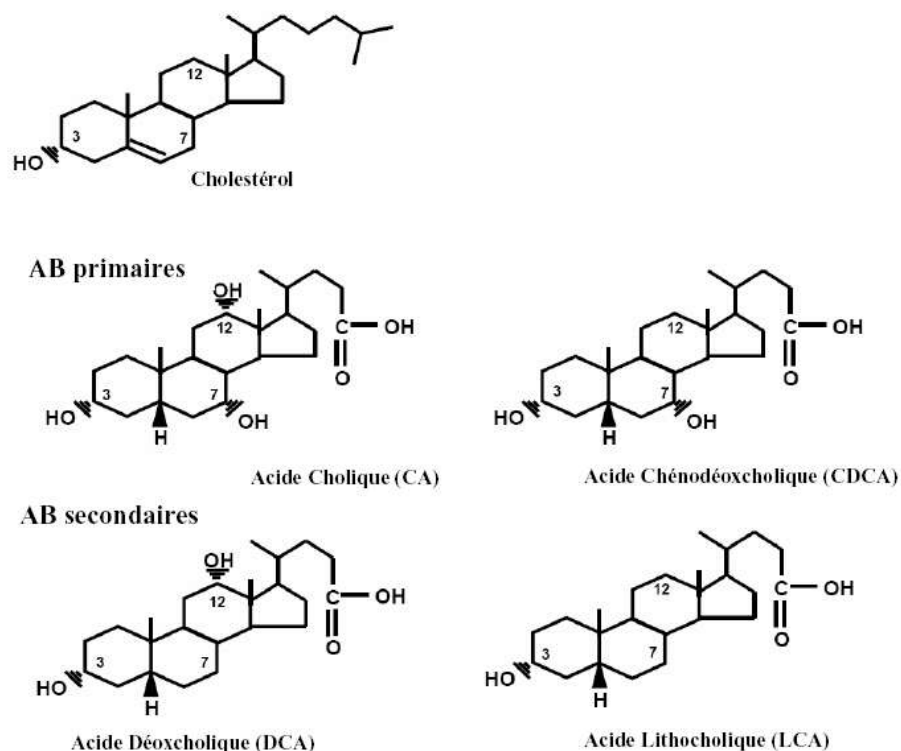


Figure 13 : Structure des principaux acides biliaires d'après (Hylemon *et al.*, 2009)

Stockés dans la vésicule biliaire durant la période de jeûne, les ABs sont libérés au cours de la prise alimentaire dans le duodénum *via* la bile. Les ABs sont ensuite majoritairement réabsorbés de façon active au niveau de l'iléon et retournent au foie par la veine porte complétant ainsi leur cycle entéro-hépatique (**figure 14**). On considère que 95% des acides biliaires sont réabsorbés par l'intestin et retournent au foie formant un pool d'ABs dans l'organisme (Lefebvre *et al.*, 2009; Hylemon *et al.*, 2009). Le nombre de cycles que peut effectuer ce pool d'ABs au travers la circulation entéro-hépatique est d'environ 12. Seulement 5% des ABs sortent du cycle pour être excrétés dans les fécès. Cette perte fécale, qui est alors compensée par une biosynthèse *de novo* d'ABs par le foie, représente la route majoritaire de transformation et d'élimination du cholestérol par l'organisme. Seulement, les caractéristiques physiques des ABs qui leur permettent de former des micelles, soumettent les cellules qui y sont exposées à de fortes concentrations à une certaine toxicité.

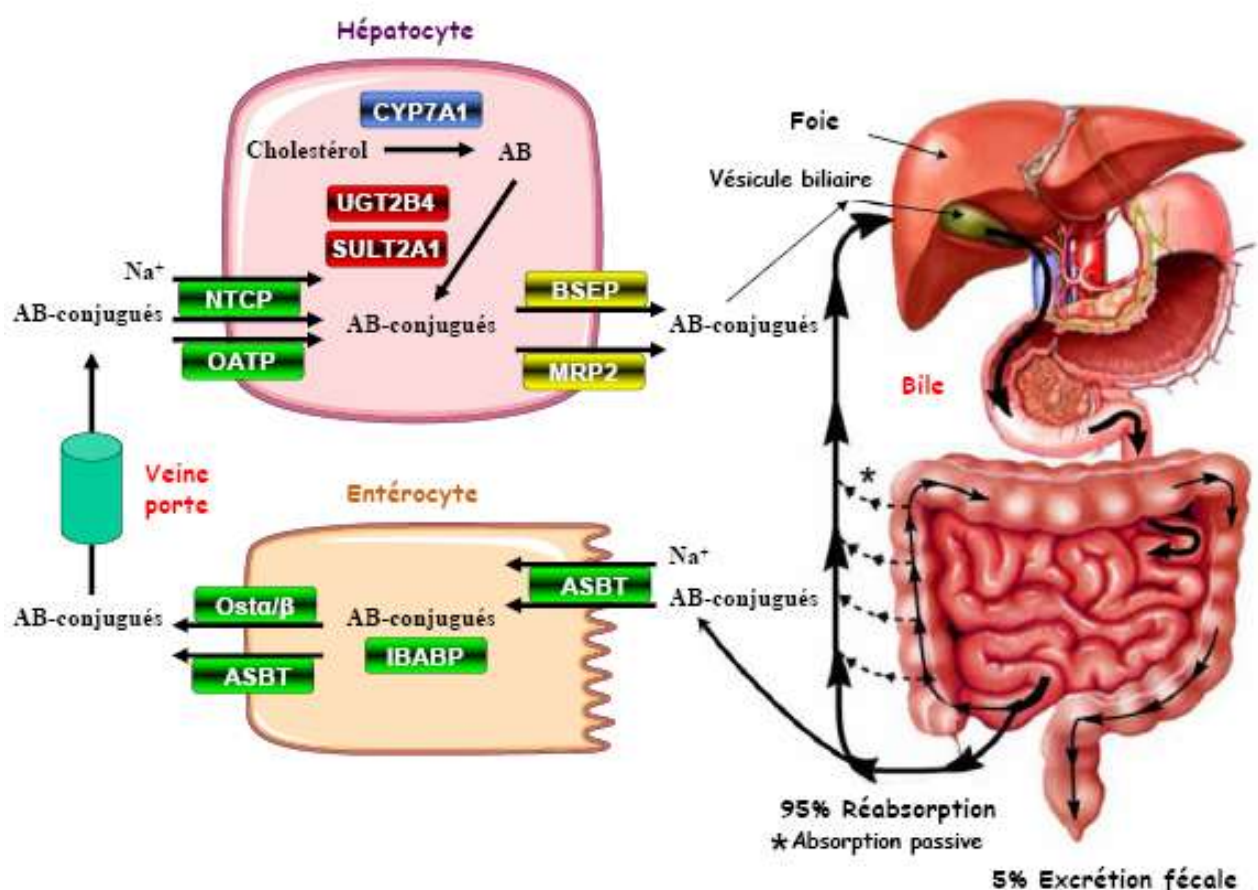


Figure 14 : Le cycle entéro-hépatique des acides biliaires d'après (Hylemon *et al.*, 2009)

Il existe 2 voies de formation des AB par les hépatocytes : la voie principale, dite voie neutre ou classique, et la voie alternative ou acide (**figure 15**). La voie neutre consiste en 16 réactions enzymatiques conduisant à la formation des AB primaires. La première étape, qui provoque une hydroxylation du carbone C7 du noyau stéroïdien est catalysée par la cytochrome P450 cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1). La CYP7A1 est localisée au niveau du RE lisse, elle est l'étape limitante de la voie neutre. Le ratio entre le CA et le CDCA produit par cette voie est contrôlé par l'enzyme stérol 12 α -hydroxylase (CYP8B1) (Hylemon *et al.*, 2009). Les enzymes de cette voie sont réparties dans plusieurs compartiments cellulaires incluant le RE, la mitochondrie, les peroxysomes et le cytoplasme. Représentant 25% de la production d'AB chez la souris et 6% chez l'homme, la voie alternative est initiée dans la mitochondrie par la stérol 27-hydroxylase (Lefebvre *et al.*, 2009). Il semble que l'étape limitante de cette voie soit le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie.

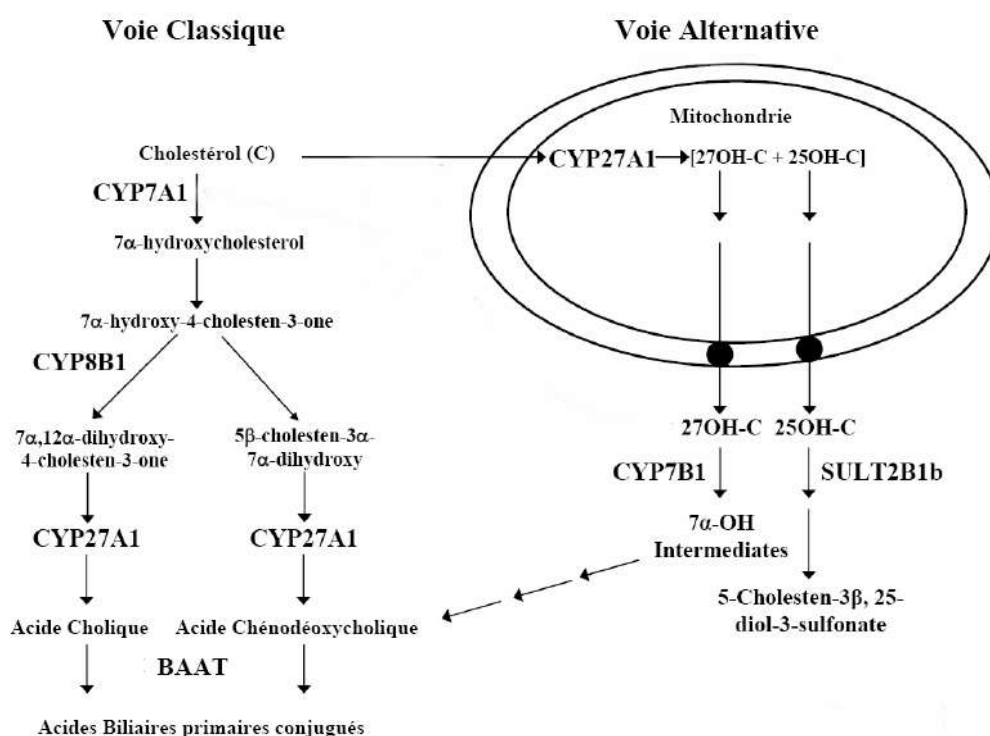


Figure 15 : Voies de synthèse des acides biliaires d'après (Hylemon *et al.*, 2009)

Avant leur sécrétion dans les canalicules biliaires, les AB primaires vont subir une étape de conjugaison avec la taurine ou la glycine ayant pour but d'augmenter leur caractère hydrophile. Cette réaction est catalysée par la bile acyl-CoA amino acid N-acyltransferase (BAAT). Le ratio entre AB glyco ou tauro-conjugués est déterminé par la biodisponibilité en

taurine puisque la BAAT possède une meilleure affinité pour cet acide aminé. Les AB sont également sujets à un autre type de réaction de conjugaison similaire au mécanisme de phase 2 de détoxification des xénobiotiques. Ce type de conjugaison est retrouvé dans des situations pathologiques comme les cholestases où les AB vont s'accumuler. Il s'agit du transfert d'un groupement sulfonyl (sulfatation) catalysé par la sulfotransférase SULT2A1 ou bien d'un groupement glucuronosyl sous l'action de l'UDP glucuronosyltransferase UGT2B4.

Les AB conjugués sont activement sécrétés par les hépatocytes vers les canalicules biliaires *via* des transporteurs de la famille ABC. Les AB monovalents sont transportés par la bile salt export pump (BSEP) alors que les AB divalents (avec 2 charges négatives) sont excrétés par la multidrug resistance associated protein MRP2 (pour revue : (Zollner *et al.*, 2006) (**figure 14**). Dans le tube digestif, les ABs conjugués sont réabsorbés de façon active par l'iléon. Du côté apical des entérocytes, leur réabsorption s'effectue par un transporteur dépendant du sodium (apical sodium-dependent BA transporter, ASBT, également appelé IBAT). Les ABs sont ensuite sécrétés du côté basolatéral par ASBT et également le transporteur hétérodimérique organic solute transporter (OST) composé des sous unité α et β . Les AB non conjugués sont réabsorbés de façon passive. Le rôle de vecteur de transport dans le cytosol de l'entérocyte est attribué à la protéine intestinale de liaison aux acides biliaires IBABP. Enfin, pour compléter le cycle, les AB sont recaptés de la circulation sanguine par le foie par l'intermédiaire du cotransporteur sodium dépendant Na-taurocholic cotransporting polypeptide NTCP ou de façon indépendante du sodium par les membres de la famille de transporteur aux anions organiques OATP (organic anion transporting polypeptides) (pour revues : (Zollner *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2009).

b) Le récepteur nucléaire FXR

- Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RN) sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui interviennent dans un large spectre de phénomènes physiologiques par modulation de l'expression de gènes. Ces RN sont activés par la fixation de leur ligand, qui sont généralement des petites molécules et hormones lipophiles. Les RN sont en effet localisés dans le cytosol et nécessitent alors leur translocation dans le noyau cellulaire suite à leur activation. Certains RN se trouvent directement dans le noyau. L'étude phylogénique des RN

a permis d'établir l'émergence de ces protéines bien avant la divergence entre vertébrés et invertébrés. Le séquençage du génome humain a conduit à l'identification de 48 RN, dont seulement 24 ont des ligands connus à ce jour (pour revue : (Germain *et al.*, 2006). Avant même le clonage de ces gènes, le premier RN fut identifié biochimiquement dans les années 1960 par l'équipe d'Elwood Jensen qui montrait que l'œstradiol était spécifiquement gardée dans ces cellules cibles par des récepteurs de haute affinité (JENSEN, 1962). Vingt ans plus tard, les premiers RN étaient clonés : il s'agit du récepteur aux glucocorticoïdes par l'équipe de Ron Evans (Hollenberg *et al.*, 1985) et du récepteur aux oestrogènes par Pierre Chambon et Geoffrey Greene (Green *et al.*, 1986). La classe des récepteurs nucléaires dont le ligand est encore inconnu est appelée récepteurs « orphelins ». Quand le ligand naturel est découvert, le récepteur est dit « adopté ». La nomenclature officielle des RN distingue 6 groupes de tailles inégales, de NR1 à NR6 auquel s'ajoute celui des RN atypiques NR0 (pour revue : (Germain *et al.*, 2006). De part le rôle essentiel des RN dans virtuellement tous les aspects du développement, du métabolisme et de la physiologie des mammifères, les altérations de la signalisation contrôlée par ces récepteurs sont associées aux maladies reproductives et métaboliques. Leur capacité à lier des ligands spécifiques fait des RN des cibles pharmacologiques potentielles.

- Structure des récepteurs nucléaires

Tous les récepteurs nucléaires possèdent une structure composée de 5 à 6 domaines homologues basés sur des séquences et des fonctions conservées. Ces structures sont désignées de A à F de la partie N-terminale vers la partie C-terminale (**Figure 16**) (pour revue : (Germain *et al.*, 2006).

La région A/B contient un domaine d'activation de la transcription (Activation Function 1, AF-1) qui peut fonctionner indépendamment de la fixation du ligand quand cette séquence est isolée du reste du récepteur. Cependant, dans le contexte du RN en entier, AF-1 est sous la dépendance de la liaison au ligand. Cette région est très peu conservée entre les différents RN.

La région centrale C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DNA-Binding Domain, DBD). C'est la région la plus conservée dans les RN, excepté pour les RN atypiques DAX1 (NR0B1) et SHP (NR0B2) qui en sont dépourvus. Le DBD permet la liaison à l'ADN au niveau de séquences spécifiques : les éléments de réponse aux hormones (Hormone

Response Elements, HRE). Le DBD consiste en 66 résidus hautement conservés composant 2 motifs en doigt de zinc riches en cystéines, 2 hélices α et une extension acide carboxylique. Cette région peut être divisée en plusieurs éléments séquentiels, les boîtes P, D, T et A qui définissent la spécificité à l'HRE.

La région D, qui est une région peu conservée, sert de charnière entre la région C et E. Elle permet à ces 2 domaines d'adopter différentes conformations sans créer d'obstruction stérique entre eux.

La région E correspond au domaine de liaison au ligand (Ligand-Binding Domain, LBD). Cette région est moins conservée que le DBD. Le LBD contient 4 structures distinctes fonctionnelles :

- un domaine de dimérisation, qui permet aux RN de former des homodimères ou des hétérodimères avec le récepteur RXR (Retinoid X Receptor).
- la poche de liaison au ligand qui interagit avec diverses petites molécules lipophiles.
- un domaine de recrutement des complexes protéiques corégulateurs de l'activité transcriptionnelle.
- un domaine d'activation de la transcription AF-2 qui est dépendant de la fixation du ligand pour permettre la capacité des RN à activer la transcription.

La région F, contiguë à la région E, n'est pas présente chez tous les récepteurs. Sa fonction n'est pas connue.



Figure 16 : Structure générale des récepteurs nucléaires, d'après (Moore *et al.*, 2006)

Une étape essentielle de l'activation des RN est leur interaction avec les séquences spécifiques de l'ADN, les HRE. Les HRE permettent le recrutement des RN proches des promoteurs de leurs gènes cibles. Ces éléments de réponse sont constitués de 2 copies d'une séquence consensus de 6 nucléotides soit en répétition directe, en répétition indirecte ou en répétition inversée. Ces 2 séquences sont séparées par un nombre variable de nucléotides. Ainsi la reconnaissance à un HRE est déterminée par la séquence nucléotidique consensus formant le motif, le nombre de paires de bases qui sépare les 2 séquences, et l'orientation

relative de ces 2 séquences. Les RN peuvent lier l'ADN sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères avec RXR. Ensuite, le changement conformationnel du LBD occasionné par la liaison au ligand permet le recrutement de complexes corégulateurs qui permettent le fonctionnement de la machinerie transcriptionnelle. Parmi ces enzymes qui vont modifier la chromatine, les plus couramment recrutées par les RN sont les protéines de la famille p160 (dont les steroid receptor coactivator, SRC), p300, les protéines CBP (cAMP response element-binding protein). Ces enzymes sont des histones acétyltransferases (HAT) qui vont provoquer des acétylations de la partie N-terminale des histones et ainsi affaiblir leur interaction avec l'ADN. La décondensation de la chromatine permet aux promoteurs cibles de recruter la RNA polymérase II et d'initier la transcription (**figure 17**). En plus de leur activation de l'expression de gènes dépendante du ligand, certains RN lient constitutivement des promoteurs cibles et exercent une fonction répressive de la transcription. La répression est conduite par l'interaction de RN avec des complexes de corépresseurs (NCoR pour nuclear receptor corepressor et SMRT pour silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) dont certains composants sont des histones déacetylases (HDAC). De tels complexes induisent des déacétylations des histones et la condensation de la chromatine, empêchant ainsi la transcription des promoteurs cibles. Cette répression de la transcription est levée quand le ligand se fixe au RN et permet alors l'expression des gènes cibles (pour revue : (Germain *et al.*, 2006).

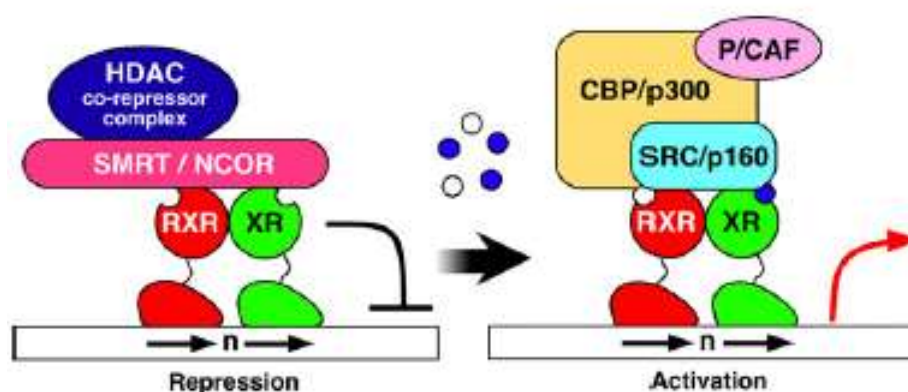


Figure 17 : Schéma classique du fonctionnement des RN, d'après (Sonoda *et al.*, 2008)

- Découverte et adoption du récepteur FXR

C'est en 1995, en identifiant des récepteurs nucléaires pouvant se lier à RXR, que 2 groupes indépendants clonaient à partir de banques d'ADNc un nouveau récepteur nucléaire orphelin (Forman *et al.*, 1995; Seol *et al.*, 1995). Basé sur le fait que des concentrations supraphysiologiques de farnésol, un intermédiaire de la voie du mévalonate, activaient faiblement ce RN, celui-ci fut alors nommé Farnesoid X Receptor (FXR). Quelques années plus tard, en 1999, les ligands endogènes de FXR devaient être identifiés comme étant les acides biliaires par 3 équipes indépendantes (Parks *et al.*, 1999; Makishima *et al.*, 1999); (Wang *et al.*, 1999). En effet, ceux-ci sont capables d'activer FXR à des concentrations physiologiques (10 à 100 μ M). L'adoption de FXR était faite, et les acides biliaires allaient passer du rôle de simples molécules détergentes à celui de véritables hormones.

Chez l'homme, le gène codant pour FXR (NR1H4) est situé sur le chromosome 12q23.1 et possède 11 exons (**figure 18A**). L'existence de 2 promoteurs alternatifs qui initient la transcription au niveau de l'exon 1 ou de l'exon 3 et la présence d'épissage alternatif à la fin de l'exon 5 conduit à la formation de 4 isoformes (FXR α 1 à α 4). Les isoformes FXR α 1 et 2 issus du même pré-ARNm codent pour des protéines qui sont dépourvues de 37 acides aminés situés en N-terminal par rapport aux isoformes FXR α 3 et 4 (**figure 18B**). Du fait de l'épissage alternatif, les isoformes FXR α 1 et 3 ont 4 acides aminés supplémentaires : MYTG dans la région charnière D, que ne possèdent pas les isoformes FXR α 2 et 4. Ces 4 isoformes ne sont pas comparables en termes d'expression tissulaire, d'activation par leur ligand et de régulation génique. Un second gène FXR β est présent chez tous les mammifères sauf chez l'homme et les primates où il est présent sous la forme d'un pseudogène. FXR est fortement exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et les surrénales et plus faiblement dans le tissu adipeux. Son expression n'est pas détectée dans le cerveau, le cœur, les poumons et les muscles squelettiques.

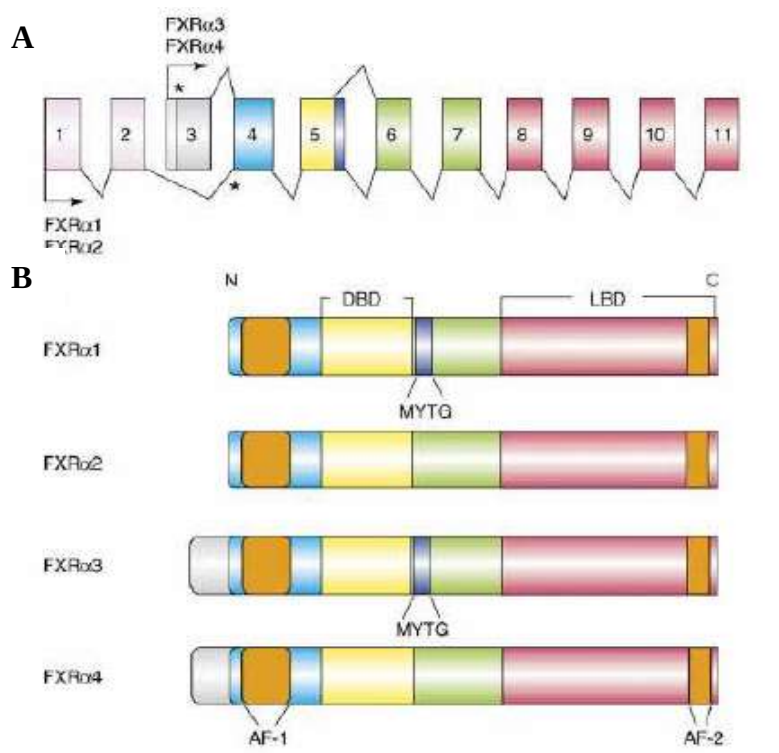


Figure 18 : Les différents isoformes de FXR, d'après (Lee *et al.*, 2006)

Parmi les agonistes naturels de FXR, le CDCA est le plus puissant ($EC_{50} = 50 \mu M$), suivi du CA et du DCA et enfin du LCA. L'acide ursodéoxycholique (UDCA), un 7β épimère du CDCA, est complètement inactif sur FXR. Plusieurs substances naturelles sont capables d'activer FXR : le coumestrol, un phytoestrogène, le cafestol, un diterpène isolé des infusions non filtrées de café, les procyanidines, des flavonoides issus des grains de raisin ou encore le xanthohumol issu de la bière de houblon. La guggulstérone, principe actif du guggulipide, extrait de la résine du *Commiphora mukul* a d'abord été identifiée comme antagoniste de FXR puis comme agoniste partiel (pour revue : (Lefebvre *et al.*, 2009). Le stigmastérol, un phytostérol dérivé d'huile lipidique, est lui aussi un antagoniste naturel de FXR. Des agonistes synthétiques de FXR ont été développés : des dérivés d'AB comme le 6α -éthyl CDCA et des composés non stéroïdiens comme le GW 4064, la feraxamine et le nouvel agoniste WAY-362450 (**figure 19**).

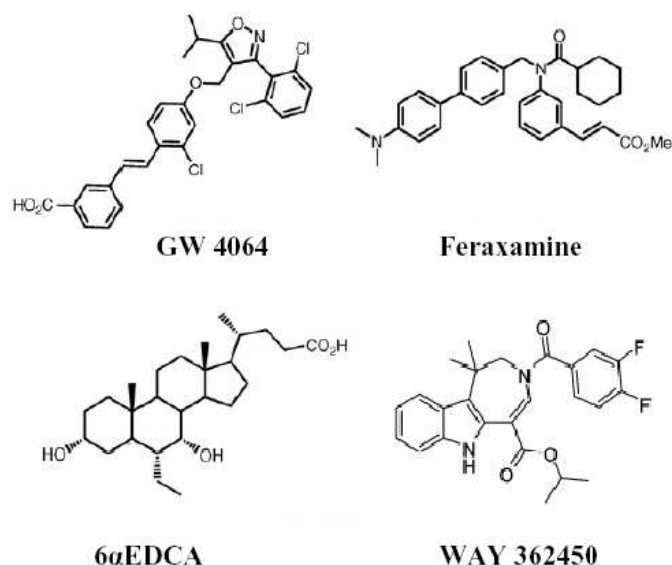


Figure 19 : Structures des agonistes synthétiques de FXR

- Régulation du métabolisme des acides biliaires par FXR

La découverte que les ABs sont les ligands naturels de FXR, associée au fait que ce RN soit majoritairement exprimé au niveau du système entéro-hépatique, a conduit à l'hypothèse que FXR jouerait un rôle dans le contrôle de l'homéostasie des ABs. Agissant comme un senseur intracellulaire aux ABs, FXR protège les hépatocytes d'une surcharge toxique en AB en supprimant leur synthèse *de novo*, en accélérant leur détoxification et leur excrétion hépatique, et enfin en inhibant leur réabsorption intestinale et hépatique (pour revue : (Lefebvre *et al.*, 2009). L'activation de FXR par ses ligands entraîne sa fixation au niveau d'éléments de réponse appelés FXRE (FXR response Element). Un FXRE typique consiste en une répétition indirecte de la séquence hexanucléotidique AGGTCA espacée d'une paire de bases (IR1). Différents modes de régulation de l'expression de gènes existent pour FXR (**figure 20**). FXR peut agir sous forme de monomères ou d'hétérodimères avec RXR. Certains gènes sont directement activés, d'autres réprimés. FXR peut aussi réprimer l'expression de gènes de façon indirecte via l'induction de l'expression du récepteur nucléaire atypique SHP (Small Heterodimer Partner).

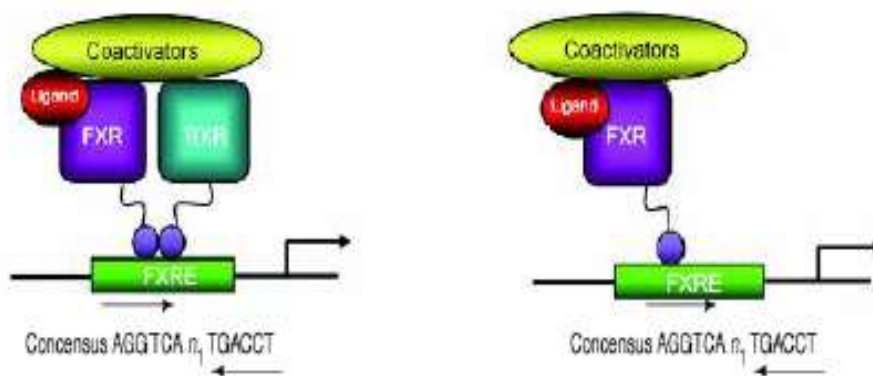


Figure 20 : Modes de régulation de la transcription de FXR, d'après (Wang *et al.*, 2008a)

L'expression de CYP7A1 est régulée de façon positive par le Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1). SHP se lie à LRH-1 et l'inactive, inhibant ainsi l'expression de CYP7A1 et la synthèse des ABs (Goodwin *et al.*, 2000). Dans l'entérocyte, FXR activé par les ABs stimule l'expression et la sécrétion de FGF-15 (Fibroblast Growth Factor-15) (FGF-19 chez l'homme) murin dans la veine porte. Au niveau du foie, FGF-15/19 se lie à son récepteur membranaire FGFR-4 et inhibe l'expression de la CYP7A1 *via* la voie JNK (Inagaki *et al.*, 2005). Ainsi les ABs exercent un rétro-contrôle négatif en réprimant eux-mêmes leur propre synthèse. FXR protège de la cytotoxicité des AB en surexprimant les gènes de l'excrétion cellulaire des ABs comme BSEP et MRP2 dans l'hépatocyte et OST α/β dans l'entérocyte et en inhibant leur réabsorption par l'intestin en réprimant ASBT ainsi que NTCP et OATP dans le foie. Enfin, FXR stimule la détoxification des ABs dans les hépatocytes grâce au mécanisme de conjugaison initié par UGT2B4 et SULT2A1 et protège les entérocytes en stimulant IBABP qui chélate les ABs (**figure 21**) (pour revue : (Lefebvre *et al.*, 2009)). Les souris déficientes pour FXR présentent un pool d'AB diminué, une augmentation des taux d'ABs plasmatiques et une réduction de l'excrétion fécale des ABs, le tout corrélé avec une diminution de l'expression des protéines de transport des ABs de l'hépatocyte vers les canalicules biliaires (Sinal *et al.*, 2000). De plus, les souris invalidées pour FXR nourries avec un régime enrichi en CA ne répriment pas CYP7A1 et n'induisent pas non plus IBABP, confirmant ainsi le rôle capital de FXR dans l'homéostasie des ABs.

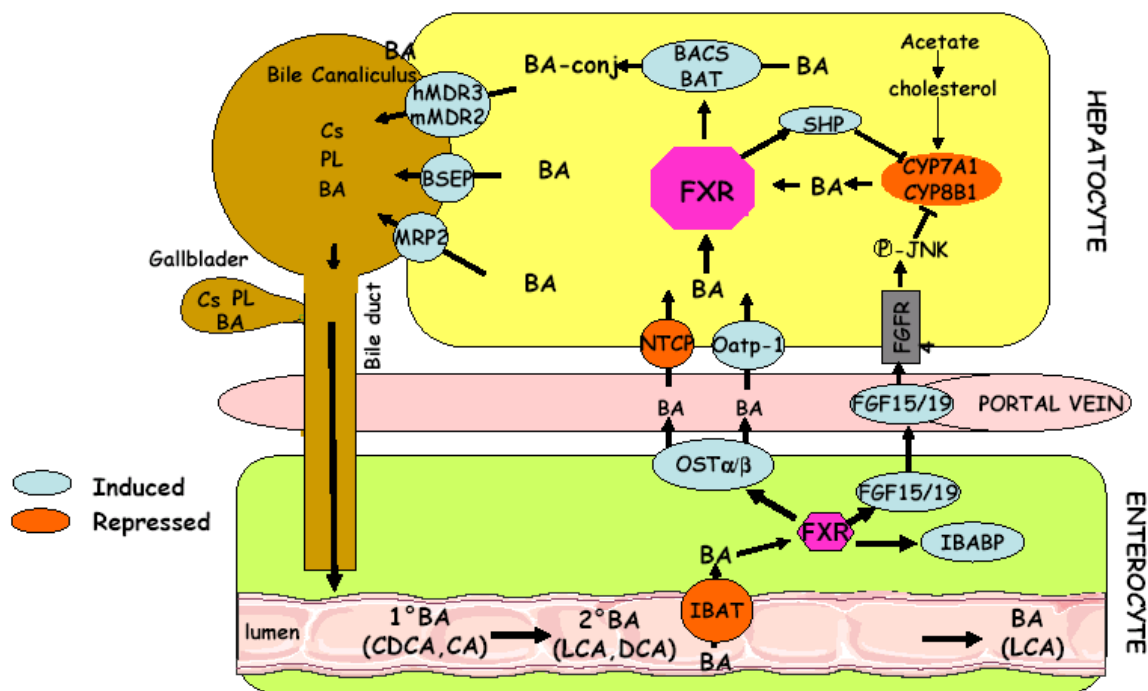


Figure 21 : Régulation de cycle entéro-hépatique des AB par FXR, d'après (Cariou, 2008)

c) Interactions entre le métabolisme des acides biliaires et des lipides

- Effet des acides biliaires sur le métabolisme des lipides

Un certain nombre d'observations cliniques suggèrent une relation entre le métabolisme des ABs et celui des lipides. Dans un premier temps, des altérations du cycle entéro-hépatique des ABs sont constatées dans les troubles métaboliques. Ces altérations comprennent des variations de la concentration et de la composition des ABs dans le plasma et dans la bile. Des études cinétiques du CA et du CDCA ont été menées chez des patients atteints d'une hypertriglycéridémie familiale. Il a été observé une augmentation du turn-over des AB chez ces individus, associée à une augmentation de leur synthèse hépatique alors que l'absorption intestinale des ABs est diminuée (Angelin *et al.*, 1987; Duane, 1995). On constate même la disparition de l'augmentation des AB dans le plasma en période postprandiale (Angelin *et al.*, 1987). Des biopsies iléales pratiquées chez les patients hypertriglycéridémiques vont dans ce sens en montrant une diminution de l'expression ARNm du transporteur ABST (Duane *et al.*, 2000). Dans une étude, l'hyperinsulinémie, les

dyslipidémies et l'obésité sont classés comme facteurs de risque de pathologies de la vésicule biliaire (Boland *et al.*, 2002).

Mais la relation inverse existe aussi dans les liens qui unissent métabolisme lipidique et ABs. Des mutations homozygotes du gène codant la CYP7A1 altérant la synthèse des ABs sont associées à une augmentation des TG plasmatiques chez l'homme (Pullinger *et al.*, 2002) et la souris (Repa *et al.*, 2000). Par ailleurs, les résines séquestrant les ABs de type cholestyramine (Questran) diminuent le LDL-C plasmatique. Tout comme les résections iléales qui réduisent la réabsorption intestinale des ABs, l'effet désiré avec ces résines est de stimuler le catabolisme hépatique du cholestérol suite à la diminution du pool hépatique d'ABs. Seulement, les patients hypercholestérolémiques traités par la cholestyramine (Miller and Nestel, 1975; Angelin *et al.*, 1978) ou ayant subi une résection iléale (Grundy *et al.*, 1971; Akerlund *et al.*, 1994) présentent une hypertriglycémie. Ces observations contre-indiquent l'utilisation de telles résines chez des patients hypertriglycémiques (Bell *et al.*, 1973; Albers *et al.*, 1982). De façon intéressante, seul le CDCA entraîne à l'inverse la diminution des TG. L'acide ursodesoxycholique, qui a une faible activité transactivatrice vis-à-vis de FXR, n'a aucun effet sur le métabolisme des TG (Carulli *et al.*, 1981; Leiss and von, 1982). Des résultats concluants ont été ainsi obtenus avec le CDCA chez des patients ayant une hypertriglycémie familiale (Bateson *et al.*, 1978). Sur le plan mécanistique, des études sur des hépatocytes primaires humains et de rongeurs indiquent clairement que les ABs diminuent la sécrétion des VLDL *in vitro* (Lin *et al.*, 1996a; Lin *et al.*, 1996b). Des études cinétiques du métabolisme des lipoprotéines menées chez l'homme ont démontré que l'administration de cholestyramine provoque une augmentation de la production hépatique des VLDL (Beil *et al.*, 1982), alors que le traitement d'individus normolipidiques et hypertriglycémiques par le CDCA provoque une diminution de la production des VLDL (Angelin *et al.*, 1978; Angelin and Leij, 1980). Ainsi l'interruption du cycle entéro-hépatique des ABs et l'administration de CDCA, agoniste de FXR, ont des effets opposés sur le métabolisme des TG chez l'homme.

- FXR et métabolisme des TG

La génération des souris invalidées pour le gène de FXR (FXR^{-/-}) a permis de démontrer que FXR jouait le rôle de lien moléculaire entre le métabolisme des ABs et celui des lipides. Les souris FXR^{-/-} sont viables, fertiles, se développent normalement mais

présentent une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie (Sinal *et al.*, 2000). Elles sont également caractérisées par une augmentation des TG et du cholestérol hépatiques et par un profil lipoprotéique pro-athérogène. L'analyse des fractions lipoprotéiques montre essentiellement une augmentation des VLDL-TG et une augmentation importante du HDL-C. Un test d'inhibition de la lipolyse des VLDL *in vivo* démontre que l'hypertriglycéridémie des souris FXR^{-/-} est la conséquence d'une augmentation de la production hépatique de VLDL. Ces altérations sont la conséquence directe de l'absence de FXR et ne peuvent être attribuées à une déplétion du pool des AB puisque celui-ci est même augmenté chez les souris FXR^{-/-} (Lambert *et al.*, 2003; Kok *et al.*, 2003). De plus, l'administration d'agonistes de FXR (CDCA, GW 4064 ou WAY 362450) réduisent les niveaux de TG plasmatiques chez la souris et le rat (Maloney *et al.*, 2000a; Maloney *et al.*, 2000b; Kast *et al.*, 2001a; Kast *et al.*, 2001b; Flatt *et al.*, 2009). Cet effet est clairement dépendant de FXR puisqu'il n'est pas retrouvé chez les souris FXR^{-/-} (Kast *et al.*, 2001b; Claudel *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006a). Une amélioration de l'hypertriglycéridémie est également rencontrée dans les modèles d'obésité et d'insulinorésistance que sont les souris *db/db* (Zhang *et al.*, 2006a), KK-A^y (Watanabe *et al.*, 2004) et *ob/ob* (Cariou *et al.*, 2006a). Le hamster doré de Syrie soumis à un régime riche en fructose développe une insulinorésistance et une hypertriglycéridémie, mimant ainsi la dyslipidémie mixte du syndrome métabolique. Un traitement au CDCA chez cet animal abaisse les taux de cholestérol et de TG plasmatiques (Bilz *et al.*, 2006). De plus, des études réalisées avec des agonistes naturels de FXR confirment l'effet hypotriglycéridémiant de FXR puisque qu'un traitement aux procyanidines réduit clairement les TG plasmatiques chez la souris (Del Bas *et al.*, 2009). L'administration de xanthohumol diminue l'hypertriglycéridémie chez les souris KK-A^y (Nozawa, 2005) alors que le coumestrol réduit la production de VLDL *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2004). Ainsi, l'effet hypotriglycéridémiant de FXR est conservé dans différents modèles animaux de dyslipidémie.

Les TG circulants sont le reflet de la production hépatique des VLDL et de la clairance de ces lipoprotéines. Les TG hépatiques sont un composant primordial pour l'assemblage et la sécrétion des VLDL. Les AGL plasmatiques sont une source de synthèse des TG au niveau du foie. Une diminution des AGL circulants est induite dans des modèles de rongeurs insulinorésistants traités par des agonistes de FXR (Bilz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006b) et pourrait diminuer l'apport d'AGL extrahépatiques vers le foie. En effet, des travaux démontrent que FXR contrôle la différenciation adipocytaire (Rizzo *et al.*, 2006a; Cariou *et*

al., 2006a; Cariou *et al.*, 2006b; Rizzo *et al.*, 2006b). Les souris FXR^{-/-} ont des taux plasmatiques d'AGL élevés, conséquence d'une quantité moindre de tissu adipeux et d'adipocytes de plus petite taille que les souris sauvages (Cariou *et al.*, 2006c). Il n'est donc pas exclu qu'un défaut de stockage des TG au niveau des adipocytes soit impliqué dans l'hypertriglycémie des souris FXR^{-/-}.

Mais la production de TG est aussi dépendante de la lipogenèse *de novo* dans le foie. Plusieurs études menées *in vivo* et *in vitro* chez les rongeurs ont montré que FXR diminue la lipogenèse *de novo* hépatique (Watanabe *et al.*, 2004; Duran-Sandoval *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; Bilz *et al.*, 2006). FXR réprime l'expression hépatique du facteur de transcription SREBP-1c et de ses gènes cibles (**figure 22**) (Watanabe *et al.*, 2004; Duran-Sandoval *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; Bilz *et al.*, 2006), alors que l'expression de SREBP-1c est augmentée dans le foie des souris FXR^{-/-} (Watanabe *et al.*, 2004; Duran-Sandoval *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; Bilz *et al.*, 2006). SREBP-1c est un facteur de transcription qui active l'expression des gènes de lipogenèse. Ce mécanisme contribue donc à la diminution de la sécrétion des VLDL-TG par le foie suite à l'activation de FXR. La répression de SREBP-1c en réponse à l'activation de FXR serait indirecte et passerait par l'induction de SHP qui antagonise l'effet du récepteur LXR sur l'induction de SREBP-1c. Ainsi l'activation de SREBP-1c par un agoniste de LXR est totalement abolie suite à un traitement par les AB et ce de manière SHP-dépendante (Watanabe *et al.*, 2004). Il a cependant été observé que le gène codant la fatty acid synthase (FAS), une enzyme lipogénique, possède un élément de réponse à FXR et est induit par FXR (Matsukuma *et al.*, 2006). En outre, cette régulation SHP-dépendante de SREBP-1c est controversée par des travaux plus récents qui montrent que l'inactivation de SHP chez les souris obèses *ob/ob* prévient la stéatose hépatique dans ce modèle en diminuant les gènes de la lipogenèse *de novo* dont SREBP-1c et FAS (Huang *et al.*, 2007).

Dans une autre étude qui ne retrouve pas de variation de l'expression hépatique de SREBP-1c chez les souris FXR^{-/-}, un autre mécanisme a été mis en évidence pour la régulation de la lipogenèse *de novo* par FXR. Les souris FXR^{-/-} ont une production hépatique de VLDL et des taux de TG plasmatiques plus élevés que les souris sauvages au cours d'une réalimentation riche en hydrates de carbone suite au jeûne (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). Dans ces conditions, l'induction hépatique des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse est également plus précoce chez les souris FXR^{-/-}. En conséquence, l'absence de FXR entraîne une augmentation du flux glycolytique et des substrats pour la lipogenèse au cours de la réalimentation, ce qui contribue à l'hypertriglycémie des souris FXR^{-/-}. Ainsi, FXR réprime l'induction de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse en réponse

au glucose en inhibant directement les éléments de réponse aux carbohydrates (Carbohydrate Response Element, ChoRE) (Duran-Sandoval *et al.*, 2005).

FXR régule également un autre facteur de transcription acteur du métabolisme des triglycérides : PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α). L'activation de PPAR α entraîne une diminution des TG plasmatiques et hépatiques en induisant la transcription des gènes de l'oxydation des acides gras dans le foie. La stimulation de PPAR α par FXR n'est retrouvée que chez l'homme *in vitro*, aucun élément de réponse de FXR n'ayant été identifié sur le promoteur du gène PPAR α murin (Pineda, I *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006). Chez la souris, FXR induit l'expression de la PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4), un gène cible de PPAR α qui est impliqué dans l'oxydation des acides gras (Savkur *et al.*, 2005).

Enfin, FXR intervient aussi plus en aval, au niveau de l'assemblage des VLDL. La synthèse et la sécrétion des VLDL par les hépatocytes dépend de l'activité d'une enzyme du réticulum endoplasmique : MTP, qui assemble l'apo-B et les TG. Le traitement de cellules hépatiques humaines par des agonistes de FXR diminue l'expression de la MTP mais également l'expression de l'apo-B (Hirokane *et al.*, 2004). Ces résultats sont corrélés avec la diminution de la sécrétion des VLDL dans le milieu de culture (Hirokane *et al.*, 2004).

FXR n'intervient pas seulement sur la production hépatique des TG. Son effet hypotriglycéridémiant passe aussi par une stimulation de la clairance des TG circulants (**figure 22**). La lipoprotéine lipase est l'enzyme clé de l'hydrolyse des TG contenus dans les VLDL, transformant ces dernières en particules plus petites et plus denses : les IDL. L'activité de la LPL est régulée notamment par des cofacteurs présents dans la composition des lipoprotéines. Ainsi, l'apo-CIII et l'ANGPTL3 (angiopoietin-like protein 3) sont des inhibiteurs de la LPL, alors que l'apo-CII et l'apo-AV sont des activateurs de cette enzyme. Chez l'homme et la souris, l'activation de FXR réprime l'expression de l'apo-CIII (Claudel *et al.*, 2003) et de l'ANGPTL3 (Watanabe *et al.*, 2004). FXR interagit avec le promoteur de l'apo-AV *in vitro* chez l'homme (Prieur *et al.*, 2003). Cependant, s'il est montré l'existence d'un élément de réponse à FXR et la possibilité pour FXR d'augmenter l'activité du promoteur de l'apo-AV, la stimulation de FXR par ses agonistes n'induit pas l'expression de l'ARNm de l'apo-AV. Par contre, le traitement avec des agonistes de FXR entraîne une augmentation de l'expression de l'apo-CII dans le foie de souris *in vivo* et *in vitro* (Kast *et al.*, 2001b). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de FXR augmente l'activité de la LPL.

D'autres mécanismes sont impliqués dans les effets lipidiques de FXR. Le récepteur aux VLDL intervient dans la captation des VLDL plasmatiques. Bien que faiblement exprimé au niveau hépatique, le VLDLR a été identifié comme une cible indirecte de FXR *in vitro* chez l'homme et *in vivo* dans le foie de souris (Prieur *et al.*, 2003; Sirvent *et al.*, 2004a). De même, FXR induit l'expression hépatique et l'activité du syndecan-1, un protéoglycan transmembranaire impliqué dans la capture des remnants des VLDL (Anisfeld *et al.*, 2003).

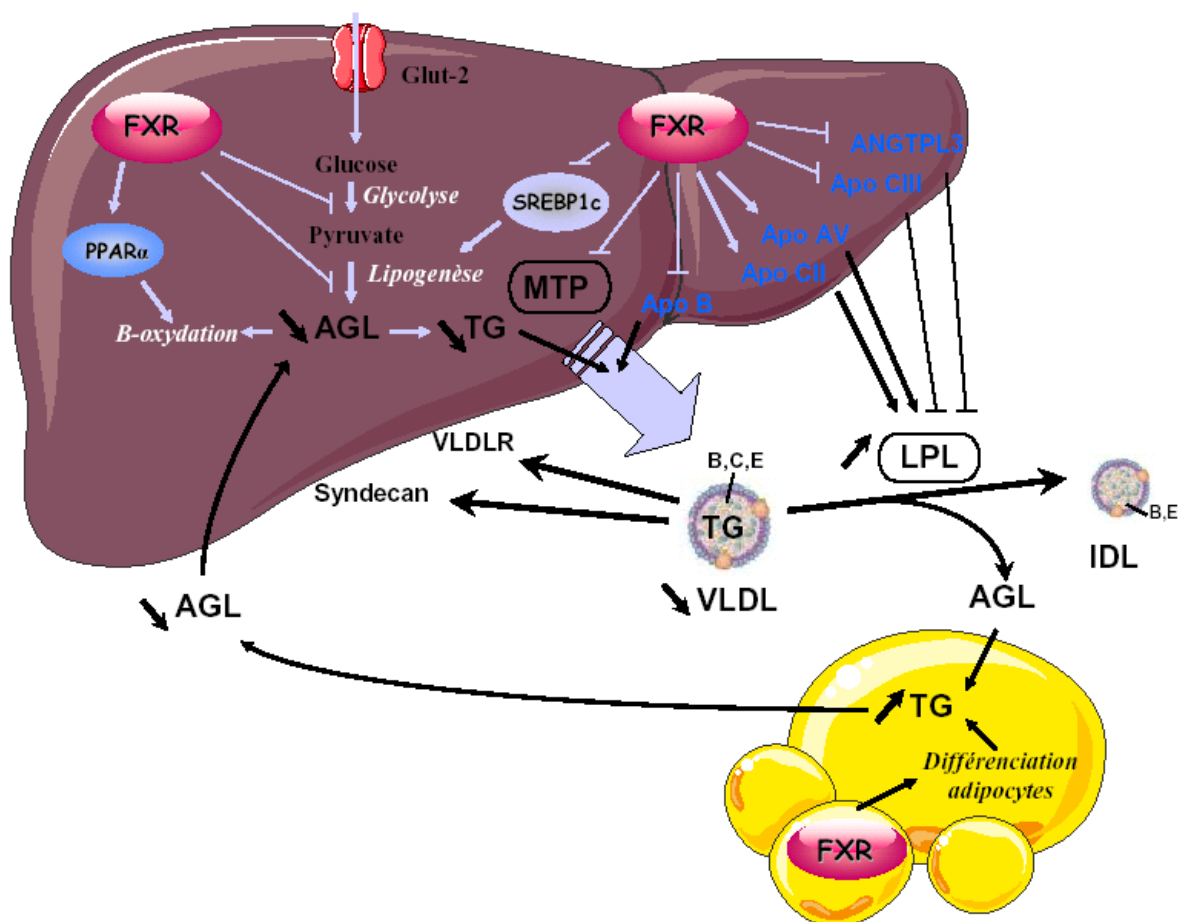


Figure 22 : Effets hypotriglycéridémifiants de FXR

- FXR et métabolisme du cholestérol

La modulation de FXR a une conséquence directe sur le métabolisme du cholestérol. En effet, les AB répriment leur propre synthèse *via* FXR en inhibant l'expression de l'enzyme limitante de cette étape : la CYP7A1. La transformation du cholestérol hépatique en AB

représente sa seule forme d'excrétion de l'organisme. Ainsi, l'effet des résines séquestrant les AB est de stimuler cette voie en interrompant le cycle entéro-hépatique des AB. La diminution des concentrations intracellulaires en cholestérol stimule le facteur de transcription SREBP- 2, entraînant alors l'augmentation du LDLR et la baisse du LDL-C plasmatique.

De façon apparemment contradictoire, il a été montré *in vitro* que les ABs stimulent directement l'expression et l'activité du LDLR dans des hépatocytes humains et murins (Carlson and Kottke, 1989; Taniguchi *et al.*, 1994; Nakahara *et al.*, 2002). Il est ainsi observé que la stimulation de la voie des MAP-Kinases ERK 1/2 par le CDCA semble stabiliser l'ARNm du LDLR (Nakahara *et al.*, 2002). De façon intéressante, il a récemment été montré que FXR stimule l'expression de Insig-2, protéine qui inhibe la maturation et l'activité de SREBP-2 (Hubbert *et al.*, 2007). Ainsi, l'activation de FXR chez la souris empêche la maturation de SREBP-2 et diminue l'expression de l'HMGCoA reductase ainsi que la biosynthèse de cholestérol *in vitro*. FXR contrôlerait également l'absorption intestinale du cholestérol. En effet, il est observé une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol chez les souris FXR^{-/-} (Lambert *et al.*, 2003). Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore élucidés.

Par rapport à ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* chez la souris, les études chez l'homme ont trouvé des résultats discordants concernant l'effet du CDCA sur les taux de LDL-C. Un traitement de courte durée (20 semaines) n'altère pas le LDL-C (Wang *et al.*, 2006), alors qu'un traitement prolongé (2 ans) chez des patients ayant des lithiases biliaires s'accompagne d'une augmentation de 10% du LDL-C (Schoenfield and Lachin, 1981). Si la stimulation de FXR réprime la CYP7A1, alors les antagonistes de FXR devraient augmenter la voie de transformation du cholestérol en ABs et diminuer le LDL-C. La guggulstérone, originellement décrite comme un antagoniste de FXR et utilisée en médecine traditionnelle indienne, n'offre pas là non plus de réponse claire. Certaines études chez l'homme avec la guggulstérone retrouvent une diminution de 10 à 30% du LDL-C alors que d'autres ne suggèrent aucun effet de la guggulstérone (pour revue : (Lefebvre *et al.*, 2009). Dans une étude, on observe même une augmentation du LDL-C de 10% avec le traitement guggulstérone sans changement significatif sur la triglycéridémie (Szapary *et al.*, 2003). D'autres études bien conduites sur un plan méthodologique seront donc nécessaires pour déterminer le rôle exact de l'activation de FXR sur le métabolisme du LDL-C.

FXR module également le métabolisme des HDL. Les souris FXR^{-/-} ont une augmentation du HDL-C, possible conséquence d'une altération du transport inverse du

cholestérol. Il est en effet observé une diminution de la capture sélective du HDL-C par le foie, mécanisme effectué par le récepteur SR-B1, dont l'expression hépatique est diminuée chez les souris FXR^{-/-} (Lambert *et al.*, 2003). SR-B1 est stimulé par les ABs chez la souris (Fuchs *et al.*, 2001), ce qui a été démontré comme étant un effet dépendant de FXR (Lambert *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006a). Néanmoins, une étude menée *in vivo* et *in vitro* chez l'homme et le rat présente les résultats inverses suite à l'activation de FXR par ses agonistes (Malerod *et al.*, 2005). Les ABs régulent négativement l'apo-AI qui est l'apolipoprotéine principale des HDL (Srivastava *et al.*, 2000), effet là aussi conduit par FXR (Caudel *et al.*, 2002).

Les études *in vivo* dans les modèles de souris insulino-résistantes montrent qu'un traitement au GW 4064 améliore l'hypercholestérolémie (Cariou *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006a; Cariou *et al.*, 2006d), malheureusement, cet effet est lié à une diminution du HDL-C (Watanabe *et al.*, 2004). Comme indiqué précédemment, le hamster doré de Syrie est un bon modèle animal pour étudier la dyslipidémie mixte. En effet, lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en fructose, ces animaux développent une insulino-résistance et une hypertriglycéridémie massive. Un traitement par le CDCA prévient l'apparition de l'hypertriglycéridémie et diminue le cholestérol des VLDL, des IDL et des LDL sans influencer le HDL-C (Bilz *et al.*, 2006). Chez l'homme, un traitement par le CDCA diminue en effet les niveaux de HDL-C (Bateson *et al.*, 1978; Leiss *et al.*, 1982). A l'inverse, le HDL-C est augmenté suite à l'administration de cholestyramine (Angelin *et al.*, 1978; Shepherd *et al.*, 1979).

D'un autre côté, FXR contrôle positivement chez la souris l'expression hépatique de la PLTP, qui contribue au remodelage des HDL (Laffitte *et al.*, 2000; Urizar *et al.*, 2000; Kast *et al.*, 2001b). La lipase hépatique et la CETP ont toutes deux des actions négatives sur le métabolisme des HDL, notamment dans l'insulino-résistance où leur activité est augmentée. FXR est capable de réprimer l'expression de chacune de ces protéines (Sirvent *et al.*, 2004b) (Kinoshita *et al.*, 2004).

Ainsi, si l'activation de FXR semble avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme des TG, elle s'accompagne d'effets indésirables sur le métabolisme du HDL-C et potentiellement sur celui du LDL-C. Récemment, des travaux ont étudié les effets de l'agoniste spécifique de FXR, le WAY-362450, dans divers modèles d'insulino-résistance que sont les souris *db/db* et *KK-A^y* ainsi que le hamster nourri avec un régime riche en fructose (Evans *et al.*, 2009). On retrouve un effet hypotriglycéridémiant très clair chez les animaux traités au WAY-362450 avec en plus une baisse de la cholestérolémie. Cette baisse concerne

le VLDL-C et LDL-C mais aussi le HDL-C. Pourtant, chez les souris, il est montré que le WAY-362450 va induire l'expression de SRBI sans modifier l'apo-AI, suggérant une augmentation du retour inverse du cholestérol pour expliquer la diminution du HDL-C.

- FXR et homéostasie du glucose

FXR et métabolisme hépatique du glucose

Plusieurs données indiquent l'existence d'un cross-talk entre le métabolisme des ABs et celui des glucides. Chez l'animal, l'expression hépatique de FXR est régulée par le statut nutritionnel. FXR est plus exprimé pendant le jeûne alors que son expression diminue lors de la renutrition (Zhang *et al.*, 2004). *In vitro*, l'expression de FXR est stimulée par le glucose et réprimée par l'insuline dans des hépatocytes primaires de rat (Duran-Sandoval *et al.*, 2004). De plus, l'expression hépatique de FXR est modulée au cours du diabète : il est retrouvé une diminution de l'expression de FXR dans le foie de souris ZDF, qui développent un diabète de type 2, mais aussi chez des souris où un diabète insulino-pénique est induit par l'injection de streptozotocine (Duran-Sandoval *et al.*, 2004). Un traitement à l'insuline restaure l'expression de FXR chez les souris traitées à la streptozotocine. Dans une autre étude, il est trouvé à l'inverse une augmentation de l'expression hépatique de FXR chez les souris diabétiques *db/db* (Zhang *et al.*, 2006a).

Des modifications du métabolisme des ABs sont observées avec l'apparition du diabète. Le pool d'ABs est augmenté chez les souris spontanément diabétiques NOD (non obese diabetic) (Uchida *et al.*, 1985) ainsi que chez les rats traités à la streptozotocine (Villanueva *et al.*, 1990). Chez l'homme, une étude réalisée sur 6 indiens Pima diabétiques trouve aussi un pool d'ABs augmenté avec l'hyperglycémie non traitée. Le pool d'ABs est diminué suite à l'insulinothérapie. Concernant la composition de la bile, ces travaux ont montré que la bile est plus enrichie en cholestérol chez ces individus, ce qui favorise la formation de lithiases biliaires (Bennion and Grundy, 1977). A l'inverse, le pool d'AB n'est pas modifié par le traitement à l'insuline chez 14 patients diabétiques de type 2 dans une autre étude (Abrams *et al.*, 1982). Il est également rapporté une augmentation du risque de lithiases biliaires avec l'insulinorésistance (Ruhl and Everhart, 2000). Enfin, on voit apparaître une augmentation de la fréquence de diabète de type 2 chez les patients atteints de lithiases biliaires (De *et al.*, 1997).

L'utilisation des résines chélatrices des ABs s'avère bénéfique sur le contrôle glycémique chez l'homme. Une étude randomisée en double aveugle suggère que l'administration de cholestyramine chez des patients atteints de diabète de type 2 et dyslipidémiques améliore le profil glycémique (Garg and Grundy, 1994). Cette étude a été confirmée par les études plus récentes avec le colesevelam, une autre résine, qui diminue significativement le pourcentage d'hémoglobine glyquée au bout de 12 semaines de traitement chez des diabétiques de type 2 (Zieve *et al.*, 2007).

Concernant l'effet direct des ABs sur la glycémie, des études ont montré que des traitements aux ABs, *in vitro* chez l'homme ou *in vivo* chez la souris, répriment l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogénèse comme la Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) ou la glucose 6 phosphatase (G6Pase) (De *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Yamagata *et al.*, 2004). Certains de ces travaux décrivent l'induction de SHP comme nécessaire à la répression des gènes de la néoglucogénèse par les ABs (Kim *et al.*, 2004; Yamagata *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006), ce qui est confirmé par la surexpression de SHP dans les hépatocytes (Park *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). Ainsi, les travaux de Ma et collaborateurs prouvent qu'un traitement au CA chez la souris diminue l'expression des gènes de la néoglucogénèse (PEPCK et G6Pase) en parallèle d'une baisse de la glycémie, et ce de façon FXR et SHP dépendante (Kim *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006). Dans cette étude, alors que les souris FXR^{-/-} présentent une glycémie plus élevée à l'état nourri, dans les conditions de jeûne aucune différence n'est observée à 8 semaines, mais à 12 semaines la glycémie de ces souris demeure plus élevée que celle des souris sauvages. Le rôle de FXR dans la régulation de la néoglucogénèse reste cependant très controversé. *In vitro*, l'activation de FXR par le GW4064 stimule l'expression de la PEPCK et la production de glucose dans des hépatocytes primaires humains ou de rats. L'augmentation de l'expression de la PEPCK est retrouvée *in vivo* chez la souris traitée au GW 4064 sans changement de la glycémie (Duran-Sandoval *et al.*, 2004; Stayrook *et al.*, 2005). Allant dans le même sens, les souris invalidées pour FXR expriment moins la PEPCK dans le foie *in vivo* et *in vitro* dans des hépatocytes primaires (Duran-Sandoval *et al.*, 2004; Cariou *et al.*, 2005). Zhang et collaborateurs montrent que les souris sauvages traitées par GW 4064 ou exprimant une forme constitutivement active de FXR vont avoir une baisse de la glycémie associée à une diminution de l'expression hépatique de la G6Pase alors que la PEPCK est augmentée dans ces conditions (Zhang *et al.*, 2006a). Les résultats sont plus concordants quand on s'intéresse au rôle de FXR dans les modèles de diabète. Les traitements au GW 4064 réduisent la glycémie et améliorent la

sensibilité à l'insuline chez les souris *db/db*, *KK-A^y*, (Zhang *et al.*, 2006a) et *ob/ob* (Duran-Sandoval *et al.*, 2004; Cariou *et al.*, 2006a). Le traitement au GW 4064 chez les souris *db/db* diminue l'expression hépatique de la G6P et également de la PEPCK (Zhang *et al.*, 2006a). Ces effets sur la baisse de glycémie peuvent en partie être la conséquence indirecte de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans ces modèles, puisqu'en effet l'activation de FXR va entraîner une diminution des AGL circulants (Cariou *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006a), perturbateurs de la voie de signalisation à l'insuline dans le foie et les organes périphériques.

En dehors de son rôle sur la néoglucogenèse, FXR intervient aussi sur la glycogénogenèse hépatique. La stimulation de FXR augmente le stock de glycogène dans le foie des souris *db/db* (Zhang *et al.*, 2006a). A l'inverse, on constate que le stock de glycogène hépatique est diminué chez les souris invalidées pour FXR (Cariou *et al.*, 2005; Duran-Sandoval *et al.*, 2005). Lorsque l'on s'intéresse aux modifications de la glycémie au cours du jeûne chez les souris FXR^{-/-}, on s'aperçoit que ces souris s'adaptent mal au jeûne puisqu'elles présentent une hypoglycémie transitoire à 3h de jeûne et retrouvent une glycémie identique aux souris sauvages à partir de 24h de jeun (Cariou *et al.*, 2005). De plus, lors de la réalimentation après une nuit de jeûne, les souris invalidées pour FXR ont une glycémie plus basse que les souris sauvages dans cette condition, ce qui est associé à une augmentation de l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques et une répression des gènes de la glycogenèse. *In vitro*, l'activation de FXR empêche l'induction des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse en réponse au glucose en interférant avec les éléments de réponse au glucose (Duran-Sandoval *et al.*, 2005). La présence de FXR semble donc nécessaire pour orienter le glucose vers la glycogénogenèse suite à la prise alimentaire et pour maintenir un stock de glycogène hépatique assurant le maintien de la glycémie au cours du jeûne (**figure 23**). Enfin, FXR régule l'homéostasie du glucose également au niveau de l'intestin. Les souris invalidées pour FXR présentent une absorption intestinale du glucose ralentie avec un pic d'apparition du glucose dans le plasma retardé par rapport aux souris sauvages (van Dijk *et al.*, 2009). Ces observations peuvent expliquer la moindre élévation de la glycémie après un repas chez les souris FXR^{-/-} par rapport aux souris sauvages.

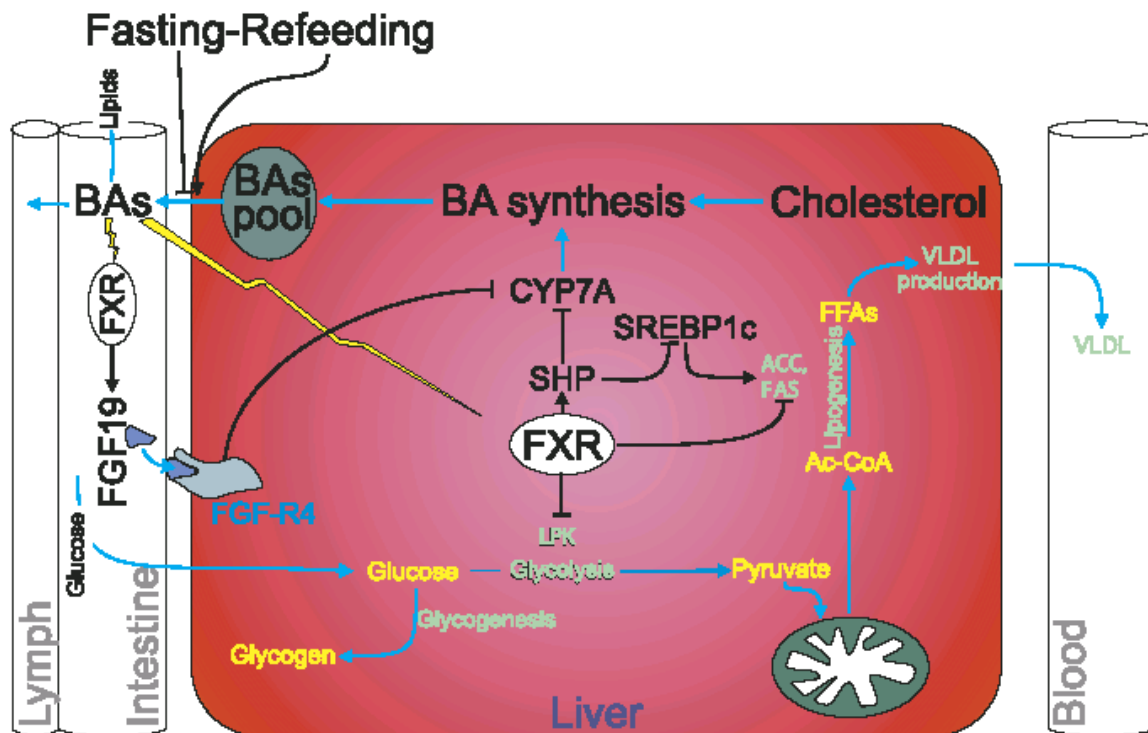


Figure 23 : FXR contrôle la réponse adaptative du foie lors de la transition jeûne réalimentation, d'après (Lefebvre *et al.*, 2009)

FXR et sensibilité à l'insuline

Trois études indépendantes ont démontré que FXR régule la sensibilité à l'insuline (Ma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006a) (Cariou *et al.*, 2006a). Les souris invalidées pour FXR développent une intolérance au glucose et une insulino-résistance. Ces souris ont également une augmentation des AGL plasmatiques (Ma *et al.*, 2006; Cariou *et al.*, 2006a) pouvant être à l'origine de cette perte de sensibilité à l'insuline. Dans les travaux de Ma, la perte de sensibilité à l'insuline concerne le foie et les organes périphériques alors que dans l'étude de Cariou et collaborateur elle est uniquement périphérique, avec une altération de la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux. Dans la troisième étude, la perte de sensibilité à l'insuline est exclusivement hépatique (Zhang *et al.*, 2006a). Ces différences restent inexpliquées mais résultent en partie des différences de fond génétique des souris. L'augmentation des AGL circulants est associée à une augmentation des TG dans le muscle (Ma *et al.*, 2006) et à une diminution de la masse adipeuse (Cariou *et al.*, 2006a) chez les souris FXR^{-/-}. Il est maintenant clair que FXR est important dans la différenciation du tissu adipeux et la capture des AGL. Deux études confirment que FXR est exprimé dans le tissu adipeux et que son expression augmente durant la différenciation adipocytaire (Cariou *et al.*,

2006a;Rizzo *et al.*, 2006b). Des adipocytes 3T3-L1 traités au GW 4064 ont une augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la capture de glucose (Cariou *et al.*, 2006a;Rizzo *et al.*, 2006b). Récemment, une étude a identifié le transporteur au glucose Glut-4 comme une cible de FXR dans des cultures d'hépatocytes et d'adipocytes (Shen *et al.*, 2008).

Au final, une conséquence des troubles énergétiques rencontrés chez les souris FXR^{-/-} est leur incapacité à réguler leur thermogenèse. Les souris FXR^{-/-} possèdent des stocks hépatiques de glycogène réduits et une diminution des stocks de TG au niveau du tissu adipeux. Ainsi, ces souris sont incapables de réguler leur température correctement : on constate ainsi une entrée en torpeur accélérée dans des conditions de jeûne ou d'intolérance au froid (Duran-Sandoval *et al.*, 2005;Cariou *et al.*, 2007a).

d) Autres rôles de FXR

- Rôle de FXR dans les vaisseaux et l'athérosclérose

L'expression de FXR a été rapportée dans la paroi vasculaire chez l'homme, notamment au niveau des plaques d'athérosclérose (Bishop-Bailey *et al.*, 2004). On trouve FXR aussi bien dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire que dans les cellules endothéliales. Bien que moins exprimé que dans le foie, FXR est fonctionnel et nombre d'effets potentiellement bénéfiques ont été observés suite à l'activation de FXR *in vitro* (**tableau IV**). Néanmoins, les données obtenues *in vivo* dans différents modèles de souris FXR^{-/-} sont plus contradictoires et le rôle exact de FXR dans la physiopathologie de l'athérosclérose n'est pas clarifié à l'heure actuelle.

In vitro, l'activation de FXR induit l'apoptose des cellules musculaires lisses (CML) (Bishop-Bailey *et al.*, 2004). L'induction de SHP et de la PLTP montrent que FXR est fonctionnel dans ces cellules. Dans une autre étude sur des CML d'aorte de rat, le GW 4064 et le 6ECDCA inhibent la réponse inflammatoire et la migration des CML. L'activation de FXR inhibe l'induction de l'expression de la iNOS et de la cyclooxygénase 2 (COX-2) dépendante de l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B par l'IL-1. Cet effet inhibiteur de la réponse inflammatoire à l'IL-1 passe par la voie SHP induite par FXR (Li *et al.*, 2007b). La décorine, un protéoglycan qui compose la matrice extracellulaire est stimulée par FXR dans les CML (He *et al.*, 2008). Enfin, l'activation de FXR dans les CML conduit à

l'augmentation du récepteur à l'angiotensine II de type 2 (ATR2). ATR2, contrairement à ATR1, n'induit pas d'effet vasoconstricteur et proliférateur des CML. L'activation de FXR provoque ainsi une diminution de la voie des MAPK ERK quand les CML sont traitées à l'angiotensine II, ce qui suggère un amoindrissement des effets hypertenseurs classiques de ATR1 (Zhang *et al.*, 2008b).

Le tonus vasculaire est régulé par les cellules endothéliales qui sécrètent diverses molécules comme l'endothéline 1, vasoconstrictrice et contribuant à la dysfonction endothéliale, ou comme le NO, vasodilatateur et qui possède en outre des effets athéroprotecteurs. Dans les cellules endothéliales pulmonaires de rat, l'activation de FXR par le CDCA réprime l'expression de l'ET-1 (He *et al.*, 2006), alors que dans les cellules endothéliales d'aorte bovine, FXR stimule l'expression de la eNOS ainsi que la production de NO (Li *et al.*, 2008). FXR augmente l'expression de la MMP9 dans les cellules endothéliales, une métalloprotéase qui dégrade la matrice extracellulaire pour permettre la migration des cellules endothéliales. Le mécanisme passe par la levée de l'inhibition du gène de la MMP9 par SHP et permet ainsi la migration des cellules endothéliales *in vitro* (Das *et al.*, 2006). Des études complémentaires ont montré que la voie FXR-MMP9 induit la phosphorylation et active FAK (focal adhesion kinase), une protéine indispensable à la motilité des cellules endothéliales (Das *et al.*, 2009). Enfin, il a été rapporté que l'activation chronique de FXR dans les cellules endothéliales altère la relaxation dépendante de l'endothélium du fait d'une perte de sensibilité des CML au NO, ce qui suggère un effet négatif de FXR à long terme sur la vasodilatation NO dépendante (Kida *et al.*, 2009).

FXR peut aussi impacter la fonction vasculaire de façon indirecte via son action au niveau hépatique. La diméthylarginine asymétrique (ADMA) est un inhibiteur naturel de la eNOS. L'ADMA est épurée du plasma par le foie et les reins en empruntant un transporteur aux acides aminés cationiques (CAT). L'ADMA est ensuite catabolisée par la diméthylarginine diméthylaminohydrolase-1 (DDAH1). *In vivo*, l'activation de FXR régule positivement l'expression de CAT-1 et de la DDAH1 provoquant une baisse des concentrations plasmatiques en ADMA chez le rat (Hu *et al.*, 2006) et la souris (Li *et al.*, 2009). Cette diminution de l'ADMA s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la eNOS et de la production de NO (Li *et al.*, 2009). Il est également intéressant de constater que FXR réprime le gène de l'angiotensinogène dans le foie de souris transgéniques pour le gène humain (Shimamoto *et al.*, 2004) alors que le gène codant le kininogène est stimulé chez

l'homme (Zhao *et al.*, 2003). Le kininogène intervient à la fois comme activateur dans la voie des bradykinines vasodilatatrices et comme inhibiteur de la cascade de coagulation. Au contraire, il est montré que FXR stimule aussi le fibrinogène, élément clé de la cascade de coagulation (Anisfeld *et al.*, 2005). D'autres effets potentiellement délétères de FXR dans la fonction vasculaire et l'athérosclérose sont rapportés, comme la répression de la paraoxonase-1 (PON1). La PON1 est produite par le foie et circule associée aux HDL et contribue à leurs propriétés anti-inflammatoire et athéroprotectrice. La voie mise en jeu implique la production intestinale de FGF-15/19 et l'activation *via* leur récepteur de la voie JNK pour réprimer le gène PON1 (Shih *et al.*, 2006).

Effets de FXR Organes	Effets +	Effets -	Fonction physiologique
Cellules Musculaires Lisses	↓ NFκB, iNOS et COX2 ↑ ATR2		- Diminution de l'inflammation - Effet hypotenseur
Cellules Endothéliales	↓ ET-1 ↑ eNOS ↑ MMP9		- Effet vasodilatateur - Effet vasodilatateur - Migration des cellules endothéliales
Foie	↑ Kininogène ↑ CAT-1 et DDAH-1	↓ PON-1 ↑ Fibrinogène	- Effet vasodilatateur - Catabolisme de l'ADMA - Diminution de l'action anti-inflammatoire des HDL - Effet pro-coagulant

Tableau IV : Effets de l'activation de FXR sur la fonction vasculaire

Plusieurs études ont été réalisées *in vivo* pour déterminer le rôle de FXR dans l'athérosclérose. Bien que les souris invalidées pour FXR développent un profil lipidique pro-athérogène, aucune trace de développement de cette pathologie n'est retrouvée même chez les souris soumises à un régime riche en gras ou en cholestérol (Hanniman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006c). Les souris déficientes pour l'ApoE ou pour le LDLR sont des modèles établis d'athérosclérose chez cette espèce. De façon intéressante, en croisant des souris déficientes

pour FXR et l'ApoE (FXR^{-/-}/ApoE^{-/-}) nourries avec un régime riche en cholestérol (1.25%), les auteurs constatent que ces souris développent plus de lésions athéromateuses et survivent moins longtemps (Hanniman *et al.*, 2005). A l'inverse, et de façon surprenante, une autre étude utilisant la même approche du modèle doublement invalidé pour FXR et l'apo-E montre une diminution des lésions athéromateuses et de la formation de cellules spumeuses (Guo *et al.*, 2006). Cet effet athéroprotecteur de la déficience de FXR n'est présent que chez les femelles dans cette étude. D'autres travaux ont utilisé le modèle des souris déficientes pour le LDLR pour générer des souris doublement déficientes avec FXR (FXR^{-/-};LDLR^{-/-}), là aussi nourries avec un régime riche en cholestérol (1.25%) (Zhang *et al.*, 2006c). Les auteurs constatent une diminution des lésions d'athérosclérose chez les souris FXR^{-/-};LDLR^{-/-} avec un effet uniquement chez les mâles. Les raisons de ces différences entre ces études restent inexpliquées. Une fois encore, les résultats sont plus concordants dans les expériences utilisant des traitements *in vivo* avec des agonistes de FXR. Ainsi, 2 études indépendantes ont utilisé les modèles de souris déficientes pour l'ApoE (Mencarelli *et al.*, 2009) ou pour le LDLR nourries par un régime de type occidental (0.15% cholestérol) (Hartman *et al.*, 2009) traitées respectivement avec des agonistes de FXR comme le 6αECDCA ou le WAY-362450. Dans les 2 cas, l'activation de FXR réduit les lésions athéromateuses au niveau aortique.

- Rôle de FXR dans l'inflammation et la stéatohépatite

Si l'accumulation de TG dans le foie est l'étape commune aux stéatoses hépatiques non alcooliques, le développement d'une inflammation consécutive est l'étape qui conduit aux stéatohépatites (NASH). Nous avons vu le rôle crucial de FXR dans le contrôle de la lipogenèse *de novo*, avec une stéatose marquée chez les souris FXR^{-/-} (Sinal *et al.*, 2000). De façon intéressante, FXR contrôle également les voies de signalisation de l'inflammation au niveau hépatique. Ainsi, l'expression hépatique de FXR est réprimée dans la phase aigüe de l'inflammation induite par injection de LPS chez la souris (Kim *et al.*, 2003). Il est retrouvé une diminution de l'expression de FXR *in vivo* et *in vitro* suite à l'injection de LPS chez la souris (Wang *et al.*, 2008b;Hartman *et al.*, 2009). Des premiers travaux montrent que FXR stimule l'expression hépatique des molécules d'adhésion cellulaire ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) (Qin *et al.*, 2005) qui permettent le recrutement des monocytes. Des travaux plus récents ont montré que FXR est un médiateur négatif de l'inflammation. Il est également décrit une diminution de la

réponse inflammatoire en réponse au LPS chez les souris traitées au WAY-362450, alors que l'activation de FXR *in vitro* dans des hépatocytes inhibe l'induction de la CRP par l'IL-6 (Hartman *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). L'activation de FXR dans des hépatocytes humains empêche l'induction des gènes tel que la iNOS et COX-2 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme le LPS. Ces gènes sont sous la dépendance de NF- χ B ; FXR antagonise l'action de ce facteur de transcription induit dans la réponse inflammatoire en supprimant ses interactions avec l'ADN. L'invalidation de FXR chez la souris exacerbe la réponse inflammatoire suite à un traitement au LPS *in vitro* et *in vivo* avec une augmentation de l'expression de la iNOS, de COX-2, de cytokines pro-inflammatoires et des lésions nécrotiques dans la foie. De plus, la surexpression hépatique d'une forme constitutivement active de FXR inhibe la réponse au LPS chez les souris sauvages. Il est intéressant de constater qu'à l'inverse, l'activation de NF- χ B *in vitro* chez l'homme et la souris bloque la régulation de gènes contrôlés par FXR en réponse à ses ligands.

Afin de préciser le rôle de FXR dans la physiopathologie de la NASH, des souris LDLR^{-/-} nourries avec un régime riche en gras ont été utilisées comme fond génétique pour voir l'effet de l'invalidation de FXR (Hartman *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2009). Les marqueurs de la NASH ont été suivis : stéatose hépatique, lésions hépatocellulaires (ballonisation, corps de Mallory), inflammation et fibrose. Les souris LDLR^{-/-} sous régime riche en gras ne développent qu'une stéatose sans infiltration de cellules inflammatoires dans le foie. Les souris invalidées pour FXR sous régime normal développent une stéatose hépatique et l'infiltrat inflammatoire reste modeste. Par contre, les souris invalidées pour FXR et le LDLR sous régime gras développent une stéatohépatite sévère attestant du rôle hépatoprotecteur de FXR (Hartman *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2009).

Dans une étude récente, les auteurs utilisent le modèle nutritionnel de régime dépourvu en méthionine et en choline pour induire une stéatose chez la souris (Hartman *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Un tel régime altère la synthèse et la sécrétion des VLDL-TG et bloque la β -oxydation mitochondriale, conduisant à l'accumulation des TG hépatiques. Ces souris développent des lésions histologiques caractéristiques de la NASH : stéatose macrovésiculaire, inflammation lobulaire et fibrose péricellulaire. De plus, on a une augmentation des marqueurs de l'inflammation dans le foie comme MCP-1 et VCAM-1, ainsi que dans la circulation sanguine. Un traitement par le WAY-362450 diminue les lésions inflammatoires hépatiques et les marqueurs de l'inflammation circulants de façon FXR dépendante puisque que ces effets bénéfiques ne sont pas retrouvés chez les souris FXR^{-/-}. Ce modèle nutritionnel à l'avantage de montrer spécifiquement les effets anti-inflammatoires liés

à l'activation de FXR car aucun changement n'est observé sur les TG hépatiques en réponse à l'activation de FXR dans ce modèle (Hartman *et al.*, 2009;Zhang *et al.*, 2009).

Ces données suggèrent un rôle important de FXR dans la prévention de la stéatohépatite. FXR agit aussi bien sur l'événement initiateur de la NASH : la stéatose, mais également sur l'inflammation consécutive à l'accumulation des TG dans le foie. De par l'inflammation qui survient dans la NASH , il existe un risque de progression vers une fibrose hépatique, et à plus long terme vers son cortège de complications comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Nous allons voir quelles sont les implications de FXR dans ses pathologies.

- Rôle de FXR dans la fibrose hépatique

La fibrose hépatique est un processus qui comprend à la fois une augmentation et une désorganisation des dépôts de matrice extracellulaire. L'activation des cellules stellaires hépatiques, qui sont la source majeure de matrice extracellulaire, par les processus inflammatoires est à l'origine de cette fibrogénèse. Dans les travaux sur les modèles de NASH décrits précédemment, l'absence de FXR ou au contraire son activation vont respectivement accentuer (Hartman *et al.*, 2009;Kong *et al.*, 2009) ou réduire (Hartman *et al.*, 2009;Zhang *et al.*, 2009) la fibrose hépatique. Des travaux ont montré que FXR est exprimé dans les cellules stellaires chez l'homme et le rat, et que l'activation de FXR réduit la production de matrice extracellulaire par ces cellules. L'activation de FXR prévient et diminue la fibrose hépatique chez le rat (Fiorucci *et al.*, 2005a;Fiorucci *et al.*, 2005b).

- Rôle de FXR dans la carcinogenèse

Deux études indépendantes ont clairement établi un lien entre FXR et le développement de tumeurs hépatiques. En effet, vers l'âge de 13-15 mois, les souris déficientes pour FXR développent spontanément des tumeurs du foie incluant des adénomes hépatocellulaires et des cholangiocarcinomes (Yang *et al.*, 2007). Des résultats similaires sont trouvés dans une autre étude, avec une augmentation de l'incidence de lésions hépatiques dégénératives et de tumeurs hépatiques chez des souris FXR^{-/-} âgées de 12 mois (Kim *et al.*, 2007). Le constat est le même au niveau de l'intestin : deux études montrent que la déficience pour FXR chez la souris augmente la tumorigenèse intestinale (Modica *et al.*, 2008;Maran *et*

al., 2009). On constate un accroissement de la prolifération des cellules du colon, potentiellement secondaire à une augmentation de la régulation de l'expression de gènes du cycle cellulaire et de l'inflammation comme la cycline D1 et l'IL-6. Des souris invalidées pour FXR traitées avec un carcinogène du colon, l'azoxymethane, ont une augmentation du nombre et de la taille des adénocarcinomes dans le colon et le rectum. La perte de FXR augmente aussi le nombre de nodules lymphoïdes dans l'intestin (Maran *et al.*, 2009). Ces données montrent clairement les effets préventifs de l'action de FXR dans la carcinogenèse hépatique et intestinale.

- Rôle de FXR dans la régénération hépatique

Le foie des rongeurs a une remarquable capacité à régénérer suite à une hépatectomie partielle. Huang et collaborateur ont récemment montré que les ABs jouent un rôle dans ce processus. Une nourriture enrichie en CA (0.2%) stimule la régénération hépatique chez des souris partiellement hépatectomisées, alors qu'un régime contenant de la cholestyramine, altère la régénération hépatique (Huang *et al.*, 2006). De façon concordante avec ces données, les souris FXR^{-/-} ont une capacité régénérative hépatique diminuée. Les ABs requièrent l'induction du facteur de prolifération FoxM1b et de son gène cible cdc25B, et ceci de manière FXR dépendante. Les auteurs suggèrent que FXR, et possiblement d'autres récepteurs nucléaires, régule la masse et/ou la régénération du foie par un « sensing » des quantités de métabolites disponibles comme les ABs.

e) Voies de signalisation des AB alternatives à FXR

En dehors de FXR, un certain nombre de voies de signalisation des ABs ont été identifiées dans le foie. Nous avons déjà vu que les ABs activent la voie JNK suite à la production intestinale de FGF-15/19 qui se lie ensuite à son récepteur FGFR-4 au niveau du foie. De même, la voie des MAP Kinases ERK 1/2 est également induite dans les hépatocytes en réponse aux ABs. Il semble que l'activation de récepteurs de la famille EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) soit le mécanisme responsable l'induction de la voie des MAPK (Werneburg *et al.*, 2003; Dent *et al.*, 2005). Outre la régulation de l'expression du LDLR, l'activation des MAPK pourrait protéger l'hépatocytes de la toxicité des AB (Qiao *et al.*, 2001; Qiao *et al.*, 2002). Mais d'autres récepteurs nucléaires sont susceptibles d'être activés

par des concentrations élevées d'ABs. Il s'agit des récepteurs VDR (Vitamin D Receptor, NR1I1), CAR (Constitutive Androstane Receptor, NR1I3) et PXR (Pregnane X Receptor, NR1I2). Le premier intervient dans le métabolisme de la vitamine D et est activé par la 1 α ,25-dihydroxy vitamine D₃. CAR et PXR ne possèdent pas de ligand spécifique. Ils sont activés par les xénobiotiques dont ils contribuent à la détoxification. La rifampicine est un agoniste spécifique de PXR. Ainsi activés dans des situations de toxicité cellulaire induite par les ABs, CAR, PXR et VDR stimulent l'expression de la CYP3A4 pour oxyder les ABs, stimulent les mécanismes de conjugaison pour les détoxifier et potentialisent leur excrétion cellulaire (pour revue : (Zollner *et al.*, 2006). Enfin, il a été rapporté que les ABs activent la kinase Akt dans les hépatocytes. Cette activation se fait par l'induction d'une protéine Gi dont le récepteur membranaire n'a pas été identifié (Dent *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007). L'activation de Akt par les ABs mime les effets de l'insuline sur l'activation de la glycogène synthase et la répression des gènes de la néoglucogenèse.

Accentuant encore le rôle de molécules de signalisation des ABs, l'existence d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires aux ABs a été démontrée par 2 groupes indépendants (Maruyama *et al.*, 2002; Kawamata *et al.*, 2003). Nommé TGR5 ou mBAR, ce récepteur membranaire a une plus forte affinité pour les ABs secondaires LCA et DCA. Le gène codant TGR5 est fortement exprimé dans la rate, l'intestin, le foie, les reins, le tissu adipeux, le muscle squelettique et les leucocytes. Par contre, son expression est faible dans les hépatocytes. Les auteurs montrent que l'activation de TGR5 stimule la production d'AMPc et active les PKA. En 2006, Watanabe et collaborateurs (Watanabe *et al.*, 2006) ont démontré le rôle des ABs et de TGR5 dans le contrôle de la dépense énergétique par le tissu adipeux brun chez la souris. En effet, l'addition de CA dans la nourriture augmente la dépense énergétique et prévient de l'obésité induite par un régime riche en gras chez les souris sauvages. Cette action du CA est indépendante de FXR : l'expression de FXR n'est pas détectée dans le tissu adipeux brun. De plus, le traitement des souris avec le GW4064 n'induit pas la réponse thermogénique dans le tissu adipeux brun et ne protège pas de la prise de poids induit par le régime riche en gras. Cet effet métabolique dépend de l'induction par l'AMPc de l'enzyme DIO2 (type 2 iodothyronine deiodinase) qui convertit l'hormone thyroïdienne T₄ inactive en sa forme T₃ active. L'hormone T₃ régule la thermogenèse dans le tissu adipeux brun en augmentant l'expression de la protéine découplante UCP-1 et ainsi la consommation de substrats énergétiques par la mitochondrie. Au contraire des souris, l'homme est significativement moins pourvu en tissu adipeux brun. TGR5 et la DIO2 sont par contre bien

présents dans le muscle squelettique humain, et l'incubation de myoblastes humains en culture avec le CA induit l'activité de la DIO2 (Watanabe *et al.*, 2006).

f) Conclusion

Cette dernière décennie a vu s'élever les ABs du simple rôle de molécules détergentes dans l'absorption des lipides par l'intestin à celui de véritables molécules de signalisation. A ce jour, de nombreux récepteurs et voies de signalisation sont activés par les ABs au-delà même de l'axe entéro-hépatique. Que ce soit *via* des récepteurs membranaires (TGR5) ou nucléaires (FXR mais aussi PXR, CAR et VDR), les ABs régulent de nombreux aspects de la physiologie. Mais à de fortes concentrations dans la cellule, les AB deviennent toxiques. Le rôle premier de FXR est d'agir comme un senseur intracellulaire aux ABs et de réguler l'homéostasie des ABs au niveau du foie et de l'intestin. Aucune mutation de FXR n'a pu être associée à une pathologie quelconque chez l'homme. Seuls des polymorphismes de FXR induisent une susceptibilité aux troubles du fonctionnement de la vésicule biliaire et à la lithogénèse (pour revue : (Zollner *et al.*, 2006). Ceci confirme l'intérêt thérapeutique de FXR dans les pathologies de la vésicule biliaire tels que les cholestases ou les lithiases biliaires (Moschetta *et al.*, 2004).

A travers les différents modèles animaux qui ont été utilisés, il apparaît clairement une action bénéfique de la stimulation de FXR sur les différents aspects du syndrome métabolique et de ses pathologies associées (pour revue : (Cariou and Staels, 2007b). Ainsi FXR régule les métabolismes lipidique et glycémique. Non seulement des troubles métaboliques graves apparaissent chez les animaux déficients pour FXR, mais la stimulation de FXR dans les modèles d'obésité et d'insulinorésistance améliore les profils lipidiques et glycémiques. FXR agit principalement au niveau du foie, et sa particularité à diminuer les TG plasmatiques mais aussi intra-hépatiques permet de prévenir la stéatose hépatique. Ajouté à cela, nombres de données suggèrent un effet anti-inflammatoire de FXR, empêchant ainsi l'évolution de la maladie vers la stéatohépatite. L'expression de FXR est détectée dans le tissu adipeux et la paroi vasculaire. FXR contrôle la différenciation adipocytaire et sa stimulation diminue les taux circulants d'AGL qui sont un lien moléculaire entre l'obésité et l'insulinorésistance. Les effets adipocytaires de FXR pourraient ainsi contribuer à son action insulinosensibilisatrice.

Dans la paroi vasculaire, FXR est exprimé dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. En inhibant la prolifération des CML et en potentialisant la fonction endothéliale *via* la production du NO, FXR semble avoir des effets athéroprotecteurs dans la paroi vasculaire. Cependant, les modèles animaux d'athérosclérose ne permettent pas d'établir un consensus net sur le rôle de FXR dans l'athérogenèse.

Le fait que les ABs soient capables de stimuler potentiellement plusieurs voies de signalisation pouvant avoir des effets antagonistes, pourrait expliquer les contradictions observées entre les traitements aux ABs *in vivo* par rapport aux données obtenues *in vitro*. Surtout, l'activation de FXR peut avoir des effets bénéfiques ou délétères dans une même voie métabolique. Ainsi, les agonistes de FXR ont clairement un effet favorable sur l'hypertriglycéridémie, alors que dans le même temps ils diminuent le HDL-C. Le développement de modulateurs sélectifs de FXR (SBARM : Selective Bile Acid-Receptor Modulator) permettrait de contourner ce problème (Dussault *et al.*, 2003). Par exemple, la guggulstérone est une substance naturelle dérivée extraite de la gomme de *Commiphora mukul* utilisée en médecine traditionnelle indienne, qui agit comme un agoniste partiel de FXR (Cui *et al.*, 2003). De manière intéressante, un traitement par la guggulstérone diminue les TG plasmatiques et augmente le HDL-C chez le rat (Cui *et al.*, 2003), validant l'intérêt d'une modulation sélective de FXR pour le traitement de la dyslipidémie mixte. Cependant, cet effet n'a pas été retrouvé dans une étude randomisée chez des patients hypercholestérolémiques (Szapary *et al.*, 2003). Néanmoins, l'identification et le développement pharmacologique de tels modulateurs sélectifs de FXR représentent une voie de recherche innovante pour le traitement des maladies métaboliques. Récemment, le développement de l'agoniste WAY-362450 a donné des résultats intéressants au niveau des profils lipidiques chez divers modèles de rongeurs insulino-résistants (Evans *et al.*, 2009). Cet agoniste de FXR est actuellement utilisé au cours d'une étude clinique en phase I.

II) Proprotéines convertases et PCSK9

1) La famille des proprotéines convertases

a) Structure et classification des proprotéines convertases

Le génome des mammifères code pour environ 30 000 gènes dont 1,7% appartiennent à une des 6 classes de protéases. Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui interviennent dans un grand nombre de processus de maturation ou de dégradation des protéines. Les 6 classes de protéases sont les suivantes :

- Les métallo-protéases
- Les sérine protéases
- Les thréonine protéases
- Les cystéine protéases
- Les aspartyl protéases
- Les glutamyl protéases

Ici, nous ne nous intéresserons qu'à une sous-famille des sérine protéases impliquée dans la maturation de protéines sécrétées. Ces protéines sont d'abord synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et nécessitent un clivage protéolytique afin d'être biologiquement actives. C'est le cas d'un grand nombre de facteurs de croissance, hormones, enzymes et récepteurs membranaires.

Les proprotéines convertases (PC) d'origine mammalienne concernées appartiennent à la famille des subtilases et sont au nombre de 9 : les gènes sont nommés *PCSK1* à *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin kexin*) (**tableau V**). Les 7 premiers membres clivent leurs précurseurs spécifiquement au niveau d'acides aminés basiques. Ces PC sont connues sous le nom de PC1/3, PC2, furine, PC4, PC5/6 qui existe sous 2 isoformes A et B issus d'un épissage alternatif, PACE4 et PC7. Leur motif consensus de clivage est le suivant : (K/R)-(X)_n-(K/R)↓ où n = 0, 2, 4 ou 6 et où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la cystéine. Ces 7 premières PC sont phylogénétiquement plus proches de la kexine de la levure que les 2 dernières PC. En effet, celles-ci clivent leur précurseur au niveau d'acides aminés

non basiques. Il s'agit de S1P (site-1 protease), encore appelée SKI-1 (subtilisin kexin isozyme-1), plus proche des pyrolysines, et de PCSK9, apparentée aux protéinases K. S1P reconnaît spécifiquement le motif consensus (R/K)-X-(L,I,V)-Z↓, où Z peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline, la cytéine, la glutamine et la valine (Seidah *et al.*, 2008). Du fait de la particularité de PCSK9, un chapitre entier lui sera consacré.

Gènes	Protéines	Site de clivage	Substrats	Fonctions
<i>pcsk1</i>	PC1 PC3	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	proGnRH, proinsuline, POMC	Métabolisme / Endocrinologie
<i>pcsk2</i>	PC2	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	proinsuline, proglucagon, POMC, prosomatostatine, proCCK	Métabolisme / Endocrinologie
<i>pcsk3</i>	Furine	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	Famille des TGFβ Famille des intégrines la PTH, les lipases	Développement embryonnaire cardio-vasculaire
<i>pcsk4</i>	PC4	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	proPACAP, proIGF	Fertilité
<i>pcsk5</i>	PC5 PC6	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	Famille des PDGFs, des VEGFs, des MMPs, des intégrines la rénine, les lipases	Développement embryonnaire
<i>pcsk6</i>	PACE4	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	Famille des TGFβ les lipases	Développement embryonnaire système nerveux
<i>pcsk7</i>	PC7 PC8	(K/R)-(X)n-(K/R)↓ n=0, 2, 4 ou 6	Famille des PDGFs Famille des VEGFs	Pas de phénotype apparent
<i>pcsk8</i>	S1P SKI-1	(R/K)-X-(L,I,V)-Z↓	Famille des SREBPs, des CREBPs BDNF, ATF-6	Homéostasie lipidique
<i>pcsk9</i>	PCSK9 NARC-1	VFAQ↓ SIP	Substrat inconnu	Homéostasie lipidique

Tableau V : Classification et rôle des sérines protéases, d'après (Scamuffa *et al.*, 2006)

Toutes ces PC sont initialement synthétisées sous une forme zymogène inactive qui requiert un clivage autocatalytique dans le RE, générant la forme mature de la protéine et un segment peptidique correspondant au prodomaine. Le prodomaine reste alors associé à la forme mature par des liaisons non covalentes et agit tel un inhibiteur de l'activité enzymatique de la protéine. Le complexe prodomaine-PC sort alors du RE vers les compartiments

cellulaires où l'activité catalytique est acquise suite à un deuxième autoclivage libérant la forme mature du prodomaine inhibiteur. Cette régulation bien orchestrée de la maturation des PC leur assure d'être spécifiquement actives dans les compartiments intracellulaires où les conditions sont optimales (pH, calcium) pour cliver leur substrat.

L'ensemble des PC est organisé de la même manière (**figure 24**). L'extrémité N-terminale présente un peptide signal, très conservé entre les PC (préproPC), un prodomaine (proPC) et un domaine catalytique composé des 3 acides aminés conservés : acide aspartique, histidine et sérine, formant ce que l'on nomme la triade catalytique. Suivant le domaine catalytique, les PC *PCSK1* à *PCSK7* possèdent un domaine P qui sert à stabiliser la poche catalytique. Chaque PC contient en sa partie C-terminale une séquence unique servant à leur localisation cellulaire (Seidah *et al.*, 2008).

Certaines de ces PC sont exprimées de façon ubiquitaire. C'est le cas de la furine, de PACE4, PC5/6, PC7, S1P et PCSK9. PC1/3 et PC2 sont exprimées au niveau des tissus neuroendocriniens comme les îlots du pancréas, l'hypophyse et différentes régions du cerveau. Enfin, PC4 n'est exprimée qu'au niveau des testicules.

Quatre PC sont liées aux membranes cellulaires (l'isoforme B de PC5/6, la furine, PC7 et S1P) alors que les autres membres sont empaquetés dans les granules sécrétoires (l'isoforme A de PC5/6, PC1/3, PC2) ou constitutivement sécrétés dans le milieu extracellulaire (PC5/6A, PC4, PACE4, PCSK9). Nous allons maintenant voir quelles sont les fonctions physiologiques remplies par ces PC et leur implication dans divers aspect du métabolisme (Seidah *et al.*, 2008).

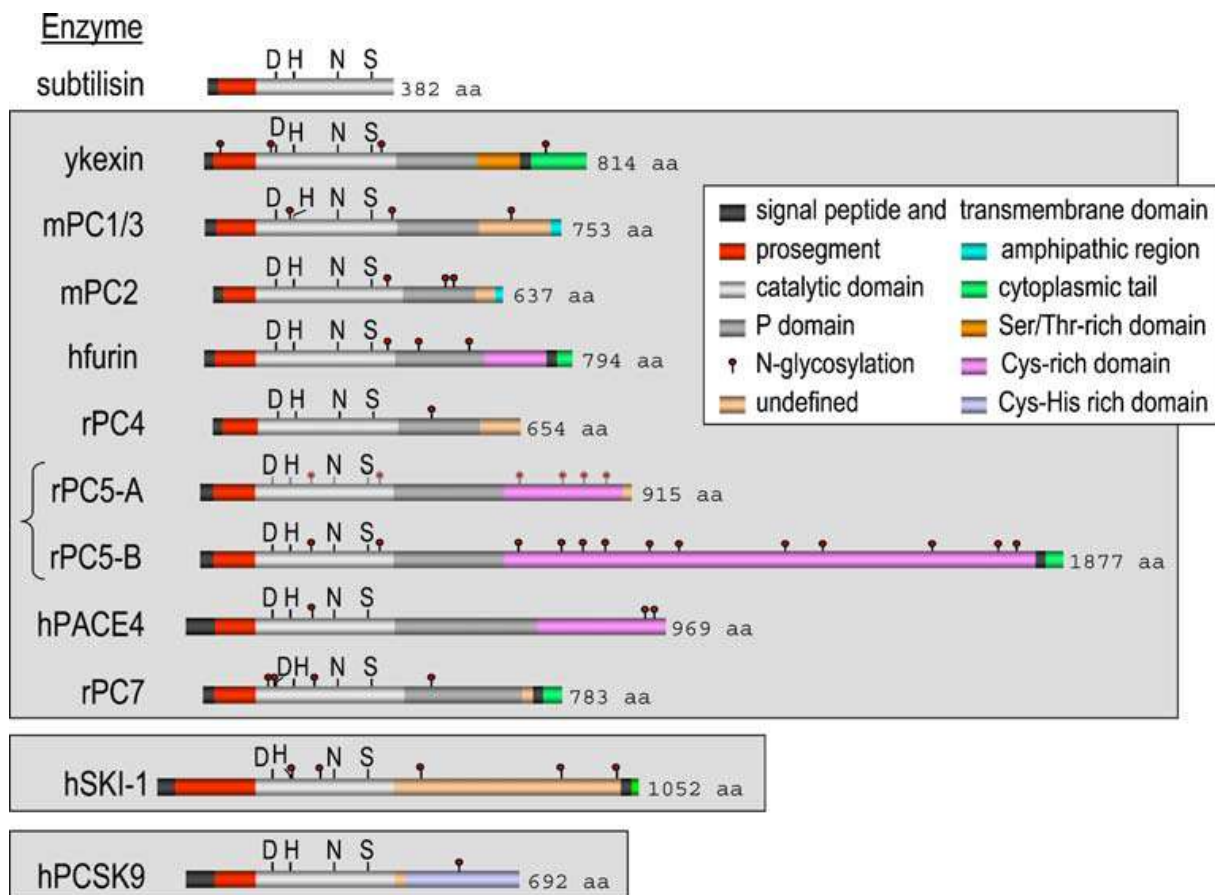


Figure 24 : Structure des proprotéines convertases, d'après (Seidah and Prat, 2007)

b) Rôles fonctionnels des PC

- Modèles animaux transgéniques

A l'étude des modèles animaux invalidés pour les différentes PC, il apparaît clairement que ces protéines jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire. Ainsi l'invalidation de plusieurs de ces PC est létale dès le stade embryonnaire. C'est le cas des animaux invalidés pour la furine qui meurent d'insuffisance hémodynamique et de défaut de fermeture de la cloison ventrale cardiaque (Roebroek *et al.*, 1998). Les invalidations pour PC5/6 (Essalmani *et al.*, 2006) et S1P (Mitchell *et al.*, 2001) sont également létales aux stades embryonnaires précoces. En l'absence de PACE4, 75% des embryons sont viables, mais développent des malformations craniofaciales (Constam and Robertson, 2000). Les souris

invalidées pour PC1/3 et PC2 sont viables mais présentent des troubles hormonaux et des déficits neuroendocriniens. Pour PC1/3, les souris présentent une hyperproinsulinémie par défaut de clivage de la proinsuline et de sévères retards de croissance (Zhu *et al.*, 2002). Dans le cas de PC2, les souris ont une déficience en glucagon circulant et également des retards de croissance (Furuta *et al.*, 1997). Les souris invalidées pour PC4 se développent normalement mais sont stériles (Mbikay *et al.*, 1997). Enfin, il n'y a pas de phénotype apparent suite à la délétion de PC7 chez la souris (Constam *et al.*, 1996).

- PC et métabolisme lipidique

Des travaux récents ont suggéré un rôle potentiel de certaines PC dans le métabolisme des lipoprotéines. La lipase endothéliale est un modulateur négatif des HDL. Cette lipase hydrolyse les PL des HDL, ce qui induit une diminution de ces particules dans la circulation sanguine. Il a été rapporté que la lipase endothéliale est clivée par la furine, PC5/6A et PACE4, conduisant à son inactivation *in vitro* (Jin *et al.*, 2005). Par la suite, les auteurs ont montré que ces PC pouvaient indirectement influencer l'activité de la lipase endothéliale en clivant et en activant l'ANGPTL3 qui inhibe cette lipase (Jin *et al.*, 2007). *In vivo*, l'inhibition de ces PC dans le foie diminue le HDL-C et altère le retour inverse du cholestérol (Jin *et al.*, 2007).

Le gène *PCSK8* codant pour la PC S1P est important dans la régulation du métabolisme des acides gras et du cholestérol. Les substrats les plus connus de S1P sont les facteurs de transcription de la famille des SREBPs. En l'absence de stérol dans la cellule, S1P peut cliver et activer les SREBPs. Ces facteurs de transcription migrent alors dans le noyau pour réguler leurs gènes respectifs. SREBP2 est impliqué dans le métabolisme du cholestérol et stimule l'expression de la HMGCoA reductase et du LDLR ; SREBP1c est plus impliqué dans la synthèse des acides gras et régule positivement les gènes de la lipogenèse. Les souris déficientes pour S1P de façon systémique meurent au stade blastocyste (Mitchell *et al.*, 2001). La génération de souris invalidées pour S1P de façon conditionnelle dans le foie induit chez ces animaux une diminution des taux de synthèse du cholestérol et des acides gras, une diminution des niveaux des SREBPs dans le noyau ainsi qu'une réduction de l'ARNm de leur gènes cibles. Par rapport aux souris sauvages, ces souris invalidées pour S1P dans le foie ont une diminution de 36% du cholestérol plasmatique et de 50% des triglycérides circulants (Yang *et al.*, 2001).

- Rôle des PC dans le pancréas

Nous nous intéresserons ici essentiellement à PC1/3 et PC2, codées respectivement par les gènes *PCSK1* et *PCSK2*. Ces deux PC sont impliquées dans la maturation de nombre d'hormones comme la GnRH (Gonadotrophin releasing hormone) dans l'hypothalamus, la proopiomelanocortine (POMC) dans l'hypophyse et les hormones du pancréas endocrine (insuline, glucagon). L'analyse immunohistochimique de l'expression de ces PC dans le pancréas humain montre leur détection spécifiquement dans les îlots de Langerhans. L'analyse comparative de leur niveau d'expression montre une forte expression de PC1/3 dans les cellules β avec une expression plus faible de PC2. PC2 est bien exprimée dans les cellules α , et également dans une moindre mesure dans les cellules δ . La furine est détectée à des niveaux d'expression plus faibles dans les îlots mais aussi dans le pancréas exocrine (Portela-Gomes *et al.*, 2008). La maturation de la proinsuline dans la cellule β a lieu dans les granules de sécrétion d'insuline de manière séquentielle. Un premier clivage est effectué par PC1/3 ou PC2 suivi d'un second clivage par une exoprotéase : la CPH (carboxypeptidase H) (pour revue : (Goodge and Hutton, 2000)). Il existe donc deux voies de maturation de la proinsuline. La voie conduite par PC1/3, qui clive entre les résidus arginine 31 et arginine 32 et qui représente 90% de la maturation totale, et la voie dépendante de PC2 qui clive la proinsuline entre la lysine 64 et l'arginine 65 (**figure 25**). Il s'ensuit un clivage par la CPH conduisant à la sécrétion de l'insuline et du peptide C (pour revue : (Goodge *et al.*, 2000)). PC1/3 et PC2 sont aussi responsables de la maturation de la proamyline dans la cellule β (Hull *et al.*, 2004), dont les défauts de maturation et de repliement au cours du stress du RE conduisent à la sécrétion d'une forme pro amyloïdogénique toxique pour la cellule et conduisant à la formation de corps amyloïdes. Dans la cellule α , PC2 est responsable de la maturation du proglucagon en glucagon. Il est à noter que les cellules L intestinales produisent le GLP1 (glucagon like-peptide 1) à partir de la maturation du proglucagon sous l'action protéolytique de PC1/3 (Rouille *et al.*, 1995). Il existe peu de données concernant la maturation de la prosomatostatine dans la cellule δ . Les travaux réalisés *in vitro* suggèrent l'implication de PC1/3 et de PC2 dans ces processus de maturation (Brakch *et al.*, 1995).

Les souris invalidées pour PC2 sont normales à la naissance mais ont des retards de croissance (Furuta *et al.*, 1997). Elles présentent aussi des hypoglycémies à jeun et une diminution du glucagon plasmatique. Le processing de la somatostatine est également altéré. Les îlots du pancréas ont une hyperplasie marquée des cellules α et δ et une relative

diminution des cellules β . Les souris invalidées pour PC1/3 présentent de sévères retards de croissance. Elles développent des hyperproinsulinémies sans pour autant avoir des troubles de l'homéostasie glucidique (Zhu *et al.*, 2002). Récemment, des travaux ont permis d'associer des mutations du gène *PCSK1* à l'obésité. Réalisées sur 13000 européens, ces données montrent l'association de variations génétiques pour PC1/3 avec le surpoids dans ces populations alors que 3 patients obèses sont mutés pour ce gène. PC1/3 régule différentes hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (insuline, GLP1, POMC). Ces travaux ont permis de découvrir un nouveau gène associé aux obésités monogéniques (Benzinou *et al.*, 2008).

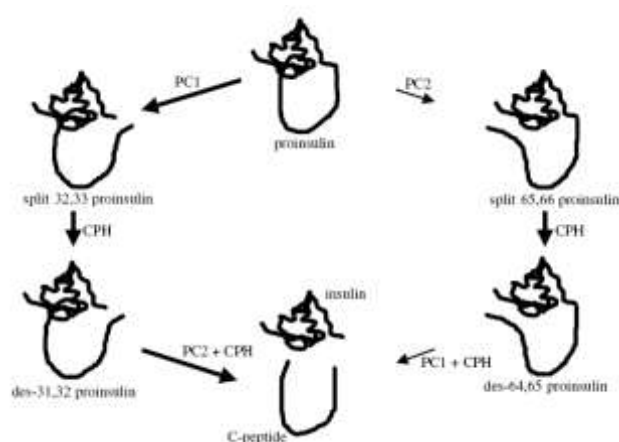


Figure 25 : Clivage de la proinsuline par PC1, PC2 et la CPH, d'après (Goodge *et al.*, 2000)

2) PCSK9 : de sa découverte à sa structure cristallographique

a) Découverte de PCSK9

C'est au tout début des années 2000 que 2 équipes, l'une française et l'autre américaine, ont identifié un nouveau locus impliqué dans une forme d'hypercholestérolémie familiale dominante indépendante des gènes codant pour le LDLR ou l'apo-B. L'analyse du génome de ces familles françaises (Varret *et al.*, 1999) ou originaire de l'Utah (Hunt *et al.*, 2000) a permis de localiser le locus situé en 1p34.1-p32 comme responsable de cette 3^{ème} forme d'hypercholestérolémie familiale dominante (FH3). En 2003, les travaux de l'équipe française dirigée par Catherine Boileau identifiaient par clonage positionnel le gène responsable muté situé sur le locus 1p32 comme étant *Narc-1* et rebaptisé PCSK9 (Abifadel *et*

al., 2003). Tout d'abord nommé NARC-1 (neuronal-apoptosis-regulated convertase 1) au cours de sa caractérisation en 2003 par l'équipe de Nabil Seidah à Montréal, PCSK9 fut identifié par le clonage d'ADNc surexprimés dans des cultures primaires de neurones du cervelet en réponse à l'apoptose induite par privation de sérum (Seidah *et al.*, 2003). Ces travaux montraient un rôle de PCSK9 dans la neurogenèse puisque sa surexpression stimule la différenciation de neurones corticaux embryonnaires chez la souris *in vitro*. Il est également rapporté une augmentation de l'expression de PCSK9 dans le foie au cours de la régénération hépatique suite à une hépatectomie partielle chez le rat (Seidah *et al.*, 2003).

Par la suite, un certain nombre de mutations et de polymorphismes de PCSK9 furent identifiés chez l'homme (pour revue : (Abifadel *et al.*, 2009). Certaines de ces mutations conduisent à des hypercholestérolémies, tandis que d'autres sont associées à des hypocholestérolémies. Les études réalisées chez la souris permirent d'élucider le lien entre PCSK9 et cholestérolémie en établissant le rôle de PCSK9 comme inhibiteur de la voie du LDLR. Les souris invalidées pour PCSK9 sont hypocholestérolémiques, ce qui est associé à une augmentation de l'expression hépatique du LDLR (Rashid *et al.*, 2005), alors qu'à l'inverse la surexpression adénovirale de PCSK9 *in vivo* induit une hypercholestérolémie et une diminution de l'expression hépatique du LDLR (Park *et al.*, 2004; Benjannet *et al.*, 2004; Maxwell and Breslow, 2004). Ainsi, les mutations de PCSK9 conduisant à une hypercholestérolémie sont appelées « gain de fonction » ; celles entraînant une hypocholestérolémie « perte de fonction ». Il est établi que les formes d'hypercholestérolémies familiales causées par les mutations gain de fonction de PCSK9 représentent 2 à 3% de l'ensemble des hypercholestérolémies familiales, contre 67% pour le LDLR et 14% pour l'Apo-B (**figure 26**) (pour revue : (Seidah *et al.*, 2007; Varret *et al.*, 2008).

Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Familial Hypercholesterolemia

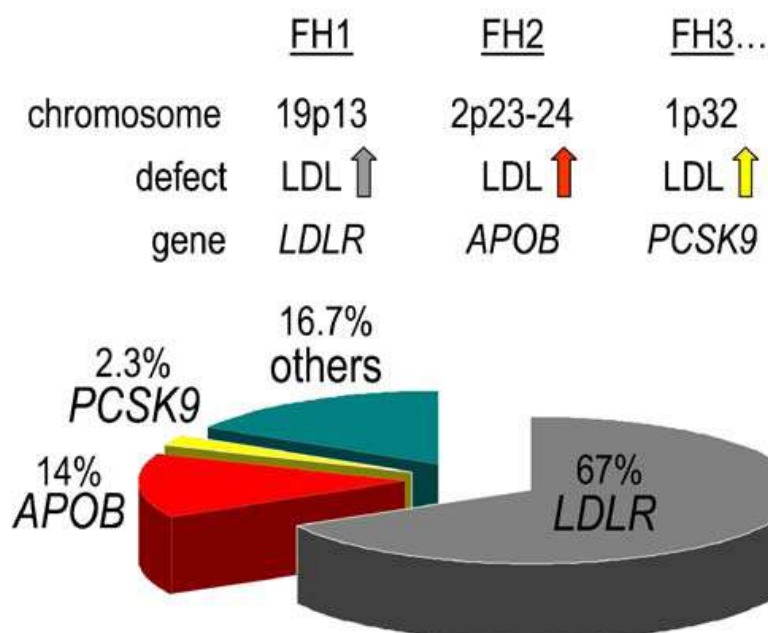


Figure 26 : Part des mutations de PCSK9 dans l'hypercholestérolémie familiale (FH), d'après (Seidah *et al.*, 2007)

b) Expression et niveaux circulants de PCSK9

L'analyse de l'expression ARNm de PCSK9 dans divers organes chez le rat montre un niveau d'expression plus élevé dans le foie, l'intestin (jéjunum et iléon) et dans une moindre mesure les reins, les surrénales et le système nerveux (Seidah *et al.*, 2003). PCSK9 semble apparaître très tôt au cours de l'embryogenèse dès le stade E9 dans le foie des embryons de souris. Enfin, PCSK9 est une protéine sécrétée (Seidah *et al.*, 2003).

PCSK9 est donc une protéine circulante. Chez l'homme, de nombreux tests ELISA ont été mis au point pour mesurer sa concentration plasmatique. Les mesures effectuées avec des anticorps monoclonaux, dans une première étude sur 72 volontaires (Lagace *et al.*, 2006) et dans une autre étude sur 55 donneurs sains (Alborn *et al.*, 2007) donnent des valeurs de concentration de l'ordre de 50 à 500 ng/ml et de 11 à 1 150 ng/ml, respectivement. L'utilisation d'anticorps polyclonaux réalisée sur une population de 115 diabétiques de l'étude FIELD retrouve des valeurs de 100 à 9300 ng/ml (Lambert *et al.*, 2008). Les données résultant d'une procédure d'immunoprécipitation suivi d'un western blot donnent des concentrations allant de 420 à 13390 ng/ml chez 182 individus normolipidémiques (Mayne *et*

al., 2007). Récemment, les dernières études de mesure de concentration de PCSK9 réalisées sur de larges populations multiethniques (3138 individus) rapportent des valeurs de 33 à 2988 ng/ml, avec des niveaux moyens significativement plus élevés chez la femme (517 ng/ml) que chez l'homme (450 ng/ml) (Lakoski *et al.*, 2009).

c) Structure de PCSK9

- PCSK9 : du gène à la protéine

Le gène de PCSK9 est un gène de 22 kb situé en 1p32, comprenant 12 exons et codant pour une protéine de 692 acides aminés (Abifadel *et al.*, 2003). Comme les autres membres de la famille des sérines protéases, PCSK9 est composée d'un peptide signal (acide aminé 1 à 30), suivi d'un prodomaine (31 à 152) et du domaine catalytique (152-451). Contrairement aux autres PC, PCSK9 ne possède pas de domaine P requis pour la régulation de l'activité protéasique. Sa partie C-terminale consiste en une région atypique enrichie en cystéine et en histidine (domaine CHRD) (**figure 27**). Beaucoup de vertébrés expriment dans leur génome un gène homologue au gène *pcsk9* humain. On trouve ainsi des équivalents de ce gène chez de nombreux mammifères (primates, souris, rats, chiens), le poulet, le lézard, la grenouille et les poissons mais également chez les chordées et les mollusques (Cameron *et al.*, 2008a). De façon surprenante, les bovins ne semblent exprimer qu'un pseudogène correspondant aux exons 8 à 12 de *pcsk9* avec en plus un codon stop dans l'exon 10 (Cameron *et al.*, 2008a). Chez l'homme, un variant ARNm de PCSK9 a été identifié, issu de l'épissage de l'exon 8 dans divers organes tels que le foie, l'intestin, les reins, le cerveau ou la prostate. La protéine obtenue est déletée de 58 acides aminés dans le domaine catalytique. Ce variant ne subit pas de clivage autocatalytique dans le RE et n'est pas sécrété (Schmidt *et al.*, 2008b).

ProPCSK9 (d'un poids moléculaire de 74 kDa) a une d'activité autocatalytique dans le RE, libérant le prodomaine (14 kDa) de la forme mature (60 kDa). Cet autoclivage a lieu au niveau du motif VFAQ₁₅₂↓SIP et est nécessaire à la sécrétion de PCSK9 (Seidah *et al.*, 2003; Naureckiene *et al.*, 2003; Benjannet *et al.*, 2004) PCSK9 possède en son domaine catalytique la triade catalytique canonique caractéristique des sérines protéases composée de l'aspartate 186, de l'histidine 226 et de la sérine 386. Le prodomaine s'associe à PCSK9 mature par des liaisons non covalentes au niveau du domaine catalytique. Ce complexe

hétérodimérique reste lié même lors de sa sécrétion. Ainsi, il apparaît que PCSK9 ne subit pas de 2^{ème} clivage libérant le prodomaine (Seidah *et al.*, 2003; Naureckiene *et al.*, 2003; Benjannet *et al.*, 2004).

Lors de son trafficking vers la membrane cellulaire, PCSK9 est soumise à des modifications post-traductionnelles. Celles-ci comprennent une glycosylation en N533 (Seidah *et al.*, 2003; Benjannet *et al.*, 2004), une tyrosine sulfatation sur le résidu Y38 (Seidah *et al.*, 2003; Benjannet *et al.*, 2004) et 2 phosphorylations des sérines S47 et S688 (Dewpura *et al.*, 2008). Si ces modifications ne semblent pas affecter la sécrétion de PCSK9, leurs conséquences fonctionnelles restent mal connues.

In vitro, dans certaines conditions de concentration, de pH et de température, PCSK9 peut former des dimères et des trimères *via* son domaine catalytique. Quand PCSK9 est incubée avec du sérum de souris, il s'associe aux LDL et aux HDL, mais pas aux VLDL. La présence de HDL diminue la formation de multimères de PCSK9 (Fan *et al.*, 2008). Là encore, la régulation et les conséquences fonctionnelles de la formation de ces multimères de PCSK9 restent inconnues.

Enfin, PCSK9 est elle-même soumise à clivage par d'autres PC comme la furine et PC5/6A. Ces 2 PC clivent PCSK9 en son domaine catalytique au niveau de la séquence RFHR₂₁₈↓, générant une protéine de 53 kDa. Cette régulation est physiologique puisqu'on retrouve cette forme de 53 kDa de PCSK9 dans le plasma chez l'homme (Seidah *et al.*, 2003; Benjannet *et al.*, 2004).

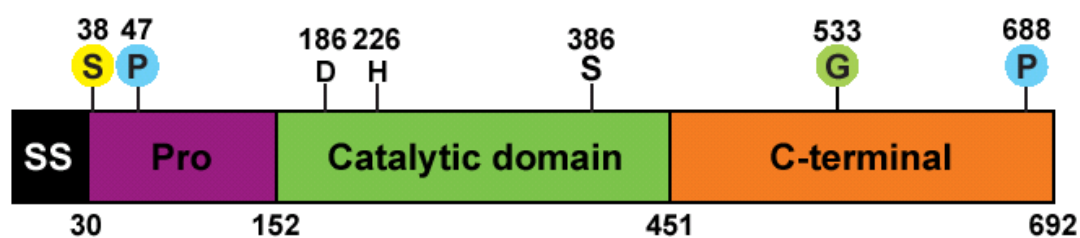


Figure 27 : Structure primaire de PCSK9 et ses modifications post-traductionnelles, d'après (Horton *et al.*, 2009)

- Structure cristallographique de PCSK9

Trois groupes indépendants ont établi la structure 3D de PCSK9 et ont permis de mettre en avant les particularités de cette PC (Hampton *et al.*, 2007;Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007). La structure cristallographique du domaine catalytique de PCSK9 est identique à celle des autres PC. Elle est composée de 7 feuillets β parallèles entourés de 2 hélices α (**figure 28A**). Contrairement aux autres PC qui clivent après des acides aminés basiques, la poche catalytique de PCSK9 est neutre et non négativement chargée (Hampton *et al.*, 2007;Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007). Comme attendu, l'extension N-terminale du prodomaine se lie de manière non covalente à la poche catalytique, empêchant l'accès à d'éventuels substrats de PCSK9 (**figure 28B**) (Hampton *et al.*, 2007;Piper *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007). Le domaine CHRD en C-terminal est composé de 3 modules empaquetés contenant 6 feuillets β et dont le repliement forme une structure hétéropseudotrimérique qui ressemble fortement aux trimères de la résistine (Hampton *et al.*, 2007), une adipokine sécrétée par les adipocytes et les macrophages (Steppan and Lazar, 2004) (**figure 28C**).

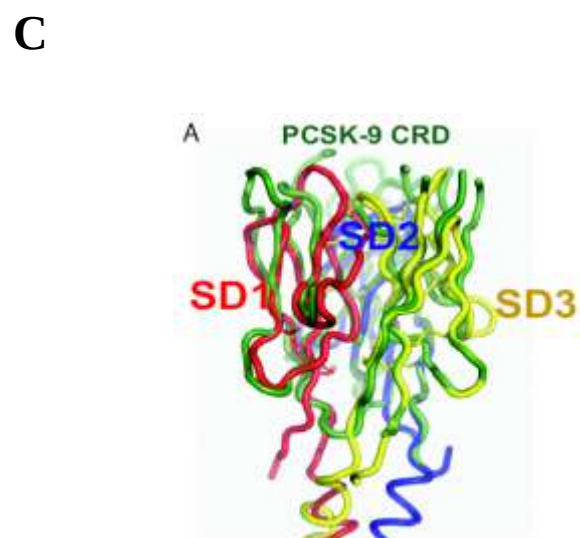
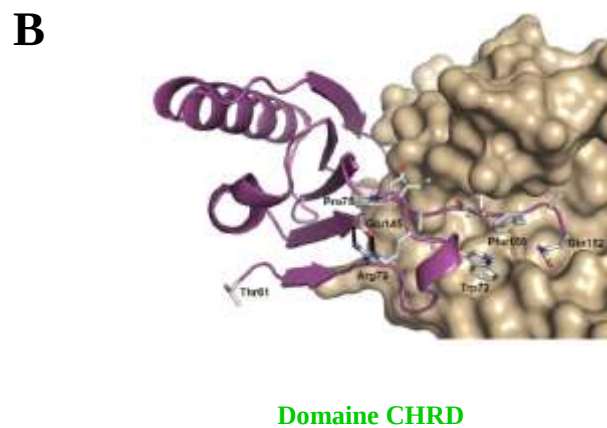
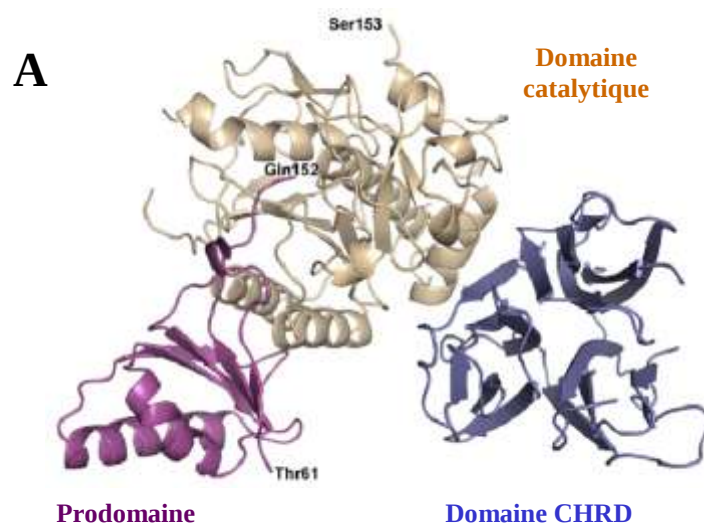


Figure 28 : Structure cristallographique de PCSK9 (A), imbrication du prodomaine dans la poche catalytique (B), superposition du domaine CRHD de PCSK9 avec un homotrimère de résistine (SD : sous domaine) (C)

- PCSK9 et activité catalytique

La question de savoir si PCSK9 peut exercer une activité catalytique autre que son propre autoclivage a été longtemps controversée. En théorie, le prodomaine reste lié au domaine catalytique de la protéine, agissant comme un peptide inhibiteur de son activité (Hampton *et al.*, 2007; Piper *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2007). On ne connaît toujours pas les conditions physiologiques en mesure de lever cette inhibition. L'activité de PCSK9 a déjà été mesurée *in vitro* par l'intermédiaire d'un test fluorométrique se servant de la séquence consensus de PCSK9 comme substrat pour la protéine purifiée (Naureckiene *et al.*, 2003). Le principe de ce test est d'ajouter un quencher et un fluorophore à cette petite séquence consensus d'acides aminés, qui lorsqu'elle est clivée va émettre une fluorescence détectée par un spectromètre. Au laboratoire, un test d'activité a été développé à partir de cette méthode (Kourimate *et al.*, 2009). La spécificité de ce test, qui utilise la protéine PCSK9 non purifiée à partir du lysat cellulaire ou du milieu de culture, a été validée par l'utilisation d'hépatocytes de souris déficientes pour PCSK9 ou d'hépatocytes humains immortalisés sous-exprimant PCSK9 (*via* l'utilisation de siRNA spécifiques). De façon intéressante, la modulation pharmacologique de l'expression de PCSK9 ou sa surexpression dans les hépatocytes en culture sont étroitement corrélées avec l'activité enzymatique de PCSK9 ainsi mesurée (Kourimate *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, on ne connaît aucun substrat identifié de PCSK9 si ce n'est PCSK9 elle-même.

3) PCSK9 et risque cardiovasculaire

a) Les mutations gain de fonction de PCSK9

C'est donc en 2003 qu'ont été identifiées les 2 premières mutations de PCSK9 associées à l'HF3 dans des familles françaises. La première de ces mutations gain de fonction, la mutation S127R, a lieu dans l'exon 2 correspondant au prodomaine de la protéine. Cette mutation est conservée dans 2 familles géographiquement éloignées mais ayant un ancêtre commun (Abifadel *et al.*, 2003). La 2^{ème} mutation découverte est la F216L, qui a lieu dans l'exon 4 et dont le patient muté est décédé à l'âge de 49 ans d'un infarctus de myocarde (Abifadel *et al.*, 2003). Par la suite, 2 autres mutations furent identifiées dans des familles françaises, toujours en association avec des hypercholestérolémies : la mutation R218S et la

mutation R357H (Allard 2005). Originellement rapportée chez des patients habitants l'Utah (Timms *et al.*, 2004), la mutation D374Y a ensuite été trouvée chez des familles norvégiennes (Leren, 2004) et anglaise (Sun *et al.*, 2005). Cette mutation est rapportée comme inductrice d'hypercholestérolémies particulièrement sévères associées à un risque cardiovasculaire élevé. D'autres mutations gain de fonction de PCSK9 ont été découvertes, comme la D129G dans des familles néo-zélandaises (Homer *et al.*, 2008), la mutation R215H dans des familles norvégiennes (Cameron *et al.*, 2008b) ou la mutation D374H dans des familles portugaises (Bourbon and Rato, 2006). Certaines mutations gain de fonction ont même été identifiées chez des patients porteurs de mutations du LDLR. Dans ce cas, l'hypercholestérolémie observée est sévère et proche de celles occasionnées par les mutations homozygotes du LDLR. C'est le cas pour les mutants N425S (Pisciotta *et al.*, 2006) et R496W (Allard *et al.*, 2005) (**figure 29**).

Le point commun des mutations gain de fonction est que ce sont des mutations faux-sens qui concernent essentiellement des résidus très conservés entre les espèces. Ainsi les effets de ces mutations sur la fonction de PCSK9 sont difficiles à déterminer contrairement aux mutations non-sens qui induisent des pertes de fonction. Un chapitre sera consacré aux effets des mutations de PCSK9 sur sa fonction dans le métabolisme du cholestérol.

Tout comme le gène de l'apo-B, les mutations de PCSK9 peuvent induire soit une hyper soit une hypocholestérolémie. Pourtant, si les mutations de PCSK9 sont bien plus rares que celles concernant le LDLR ou l'apo-B (plus de 1000 mutations identifiées pour le LDLR et 9 pour l'apo-B) (Varret *et al.*, 2008), le nombre important de polymorphismes répartis tout le long de la séquence ADN de PCSK9, la fréquence de ces SNP (single nucleotide polymorphisms) et leur impact sur le cholestérol sont plus élevés que pour le LDLR et l'apo-B. On distingue ainsi 53 mutations faux sens identifiées modifiant la séquence protéique de PCSK9 pour 17 mutations silencieuses (pour revue : (Abifadel *et al.*, 2009)

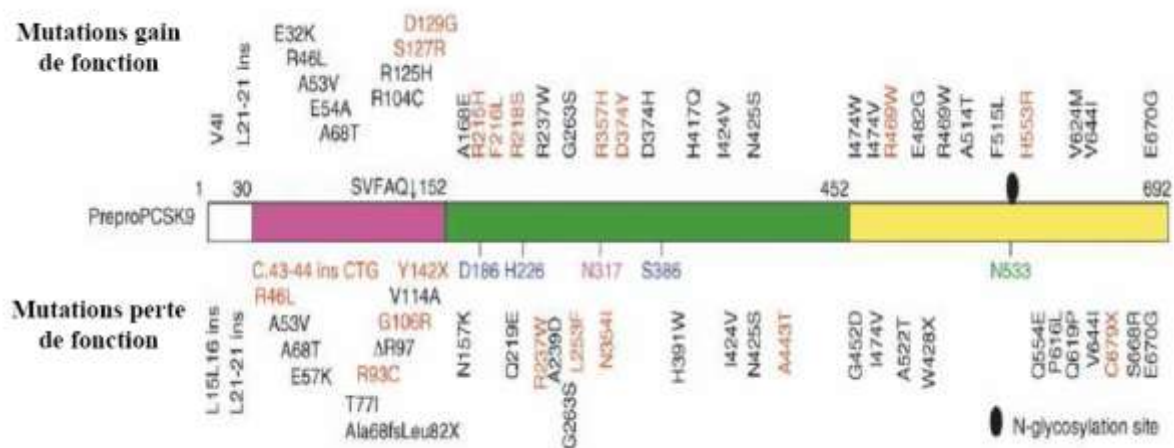


Figure 29 : PCSK9 et ses différentes mutations, d'après (Costet *et al.*, 2008)

b) Les mutations perte de fonction de PCSK9

Deux ans après la découverte des premières mutations gain de fonction de PCSK9, Cohen et collaborateurs découvraient des mutations perte de fonction de PCSK9 associées à des taux de LDL-C bas à partir de la cohorte multiethnique de la Dallas Heart Study (Cohen *et al.*, 2005). Ces mutations de PCSK9, la C679X dans l'exon 12 et la Y142X dans l'exon 3 qui génèrent respectivement une protéine tronquée et une absence de protéine sont fréquentes chez les Afro-américains (fréquence combinée de 2%) et rares chez les Américains européens (moins de 0,1%). La mutation C679X est également répandue au Zimbabwe et concerne 3,7% des femmes dans ce pays (Hooper *et al.*, 2007). La Dallas Heart Study a permis d'identifier 3 polymorphismes associés à des taux de LDL-C diminués de 3,5 à 30% : les variants L253F et A443T chez les individus noirs et R46L chez les blancs (Kotowski *et al.*, 2006).

Une autre mutation perte de fonction qui ségrège avec des concentrations de LCL-C faible a été identifiée dans des familles norvégiennes : le mutant G106R (Berge 2006). Enfin, d'autres SNP ont été découverts comme les variants T77I, V114A ou 522T en Sicile (Fasano *et al.*, 2007) et Q219E, A239D, G452D et S668R au Japon (Miyake *et al.*, 2008) et récemment la mutation R434W (Dubuc *et al.*, 2009).

De façon beaucoup plus rare, 2 personnes dans le monde ont des mutations perte de fonction de PCSK9 sur les 2 allèles. Une femme originaire du Zimbabwe est homozygote pour la mutation C769X et possède des taux de LDL-C de 15 mg/dl (Hooper *et al.*, 2007).

L'autre femme est une Afro-américaine de 32 ans, hétérozygote composite pour la mutation Y142X sur un allèle et l'autre allèle est délété. Apparemment en bonne santé, fertile, et normotensive, elle a un taux de LDL-C de 14 mg/dl (Zhao *et al.*, 2006). Des travaux récents du laboratoire sur l'identification et la caractérisation d'une mutation perte de fonction de PCSK9 à caractère dominant négatif sur la forme sauvage de PCSK9, la mutation R104C/V114A, seront détaillés dans la partie annexe. Le porteur de cette mutation sur un allèle, le second allèle étant non muté, possède des taux de LDL-C à 16 mg/dl alors que PCSK9 se trouve à des niveaux indétectables dans le plasma.

c) PCSK9 corrèle avec le LDL-C et le risque cardiovasculaire

Les études cliniques des divers mutants gain de fonction de PCSK9 montraient déjà une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose chez certains patients porteurs de ces mutations. L'étude du polymorphisme hypercholestérolémique E670G qui compte pour 3,5% de la variabilité du LDL-C retrouve une augmentation du risque cardiovasculaire avec un risque de lésions coronaires plus grand (Chen *et al.*, 2005; Evans and Beil, 2006), ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne (Norata *et al.*, 2009). Mais surtout, la preuve ultime du rôle prédictif de PCSK9 dans l'incidence des maladies cardiovasculaires provient de l'étude des patients ayant des mutations perte de fonction de PCSK9. A partir de l'étude ARIC (atherosclerosis risk in communities) menée sur 15 ans, il est observé que la mutation perte de fonction R46L présente chez 3% des caucasiens induit une baisse du LDL-C de 15% et du risque de maladies coronariennes à 15 ans de 46%. Les mutations Y142X et C679X, présentes chez 2% des Afro-américains diminuent le LDL-C de 28% et le risque de maladie coronarienne de 88% (Cohen *et al.*, 2006), démontrant ainsi l'intérêt de développer des inhibiteurs de PCSK9 en thérapeutique.

Renforçant le lien chez l'homme entre PCSK9 et le métabolisme du LDL-C, il a été mis en évidence dans certaines études chez des individus sains une corrélation positive entre les concentrations plasmatiques de PCSK9 et celles du LDL-C. (Alborn *et al.*, 2007; Dubuc *et al.*, 2009; Lakoski *et al.*, 2009). Cette corrélation n'est retrouvée que chez l'homme dans une autre étude (Mayne *et al.*, 2007). Il a été récemment publié que les taux circulants de PCSK9 sont également positivement corrélés avec d'autres facteurs de risque cardiovasculaires comme la triglycéridémie, l'obésité, la glycémie, l'insulinorésistance aussi bien chez l'adulte

(Dubuc *et al.*, 2009;Lakoski *et al.*, 2009) que chez l'adolescent et l'enfant (Baass *et al.*, 2009). Les concentrations plasmatiques de PCSK9 sont plus élevées chez la femme que chez l'homme et augmentent avec l'âge (Dubuc *et al.*, 2009;Lakoski *et al.*, 2009).

4) Rôle de PCSK9 dans le métabolisme lipidique

a) PCSK9 : un inhibiteur post-traductionnel du LDLR

- PCSK9 régule l'expression hépatique du LDLR

Ce sont les études de surexpression adénovirale de PCSK9 dans le foie de souris qui ont initialement permis de préciser le rôle de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol. Ainsi, la surexpression hépatique de PCSK9 chez la souris induit une hypercholestérolémie associée à une diminution drastique de l'expression protéique du LDLR dans le foie, que se soit pour la forme sauvage de PCSK9 (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2004;Lalanne *et al.*, 2005) ou ses mutants gain de fonction (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2004). *In vitro*, la surexpression de PCSK9 altère également l'expression et l'activité du LDLR (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2004). Cette régulation de PCSK9 sur l'expression du LDLR est post-transcriptionnelle, aucun changement dans l'expression ARNm du LDLR n'étant observé (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2004).

Confirmant le rôle de PCSK9 sur l'expression du LDLR, la génération de souris invalidées pour PCSK9 montre une augmentation de l'expression hépatique du LDLR de 2,8 fois par rapport aux souris sauvages et une baisse de 48% du cholestérol total (Rashid *et al.*, 2005).

Tous les phénotypes observés (hypo ou hypercholestérolémie) suite aux variations de l'expression de PCSK9 sont clairement dépendants de la présence ou non de sa cible : le LDLR. La surexpression adénovirale de PCSK9 chez les souris invalidées pour le LDLR ne modifie absolument pas les taux de cholestérol plasmatique par rapport au souris LDLR^{-/-} seules (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2004).

De même, les souris doublement invalidées PCSK9^{-/-} LDLR^{-/-} possèdent le même profil hypercholestérolémique que les souris LDLR^{-/-}, prouvant que les effets de PCSK9 sur la

cholestérolémie passent uniquement par la modulation de l'expression du LDLR (Zaid *et al.*, 2008).

- Action intracellulaire et extracellulaire de PCSK9

La surexpression de PCSK9 dans des hépatomes humains a montré que PCSK9 stimule la dégradation du LDLR dans des compartiments post-RE (Maxwell *et al.*, 2005). Dans cette étude, la surexpression de PCSK9 diminue aussi bien l'expression de la forme immature du LDLR intracellulaire que sa forme mature membranaire, suggérant une action intracellulaire de PCSK9 (Park *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2005). Egalement en faveur d'une dégradation intracellulaire du LDLR par PCSK9, la surexpression adénovirale de PCSK9 chez des souris invalidées pour le gène de l'ARH, qui code cette protéine adaptatrice nécessaire à l'internalisation du LDLR, induit toujours une dégradation du LDLR dans ces conditions, suggérant que PCSK9 agisse sur le LDLR avant que celui-ci n'atteigne la membrane cellulaire (Park *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2005).

En plus de cette action intracellulaire, il existe des données qui attestent d'un rôle de PCSK9 sur le LDLR à la surface des cellules. L'ajout de la protéine purifiée (Lagace *et al.*, 2006) ou d'un milieu de culture contenant PCSK9 (Cameron *et al.*, 2006) suffit à dégrader l'expression membranaire du LDLR sur des hépatocytes *in vitro*. Des études de colocalisation de PCSK9 et du LDLR montrent que PCSK9 induit l'acheminement du LDLR vers des compartiments du type endosomes tardifs (Lagace *et al.*, 2006). Contrairement à ce qui est observé avec les modèles de surexpression de PCSK9, l'effet du PCSK9 extracellulaire est dépendant de la présence de la protéine ARH puisque aucune internalisation du LDLR n'est observée sur des hépatocytes de souris ARH^{-/-} (Lagace *et al.*, 2006) ou lorsque que ce gène est éteint par l'utilisation de RNAi spécifique (Qian *et al.*, 2007).

La réalisation de manipulation de parabiose entre des souris transgéniques surexprimant le gène humain de PCSK9 et des souris sauvages montre que la protéine PCSK9 qui circule dans le plasma est capable de complètement abolir l'expression hépatique du LDLR chez les souris sauvages receveuses (Lagace *et al.*, 2006). D'autres travaux réalisés *in vivo* ont montré que l'administration de PCSK9 dans la circulation sanguine suffit à dégrader l'expression du LDLR dans le foie de souris (Grefhorst *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2008a). Ces travaux ont d'ailleurs permis de déterminer la durée de la demi-vie de PCSK9 dans le

plasma à 5 (Grefhorst *et al.*, 2008;Schmidt *et al.*, 2008a) et 15 minutes (Schmidt *et al.*, 2008a). Enfin, les études s'intéressant aux moyens d'inhiber l'interaction entre PCSK9 extracellulaire et le LDLR membranaire (détaillées plus loin dans le chapitre conclusion) confirment l'importance de ce mécanisme dans la régulation du LDLR par PCSK9.

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que PCSK9 agit aussi bien de façon intracellulaire que de façon extracellulaire suivant les conditions expérimentales : accumulation de PCSK9 dans la cellule suite à sa surexpression ou dans le milieu extracellulaire suite à son ajout. Néanmoins la contribution relative de ces 2 voies dans la régulation de l'activité du LDLR reste controversée. L'existence de certaines mutations atypiques de PCSK9 alimente encore ce débat. Contrairement à la mutation gain de fonction D374Y qui est clivée normalement, le mutant S127R a un défaut de clivage et de maturation qui l'empêche d'être sécrété, mais pas de diminuer l'expression du LDLR (Park *et al.*, 2004;Benjannet *et al.*, 2004). Ceci suggère une action intracellulaire de ce mutant. Ainsi, la génération de mutants de PCSK9 portant les 2 mutations S127R et D374Y montre un effet additif sur la dégradation du LDLR par rapport à chacune des mutations seules et donc l'implication de mécanismes distincts mais complémentaires (Pandit *et al.*, 2008).

Finalement, des travaux publiés récemment montrent clairement l'existence de ces 2 voies de régulation du LDLR par PCSK9 dans des hépatocytes en culture. Les chaines légères de clathrine sont indispensables aux vésicules de transport entre le réseau trans-golgien et les compartiments lysosomaux. L'invalidation des chaines légères de clathrine par siRNA perturbe ce système de transport intracellulaire et conduit à une augmentation de l'expression du LDLR dans les hépatocytes en culture, mais pas dans les cellules HEK293 qui n'expriment pas PCSK9 de façon endogène (Poirier *et al.*, 2009). De plus, l'ajout de PCSK9 dans le milieu de culture de ces hépatocytes sous-exprimant les chaines légères de la clathrine induit toujours la diminution de l'expression du LDLR, démontrant bien l'existence de 2 voies intra et extracellulaire distinctes (Poirier *et al.*, 2009).

- L'activité de PCSK9 n'est pas nécessaire à son action sur le LDLR

L'activité autocatalytique de PCSK9 est nécessaire à sa maturation et à sa sortie du RE. Ainsi, la surexpression de formes catalytiquement inactives n'induit pas la dégradation du LDLR *in vitro* (Park *et al.*, 2004;Maxwell *et al.*, 2005) ou *in vivo* chez la souris (Park *et al.*,

2004;Maxwell *et al.*, 2005). Cependant, en faisant exprimer la forme mature d'un mutant perte de fonction artificiel S386A de PCSK9 *en trans* avec le prodomaine, 2 équipes réussissent alors à obtenir la sécrétion *in vitro* de cette forme catalytiquement inactive de PCSK9 (McNutt *et al.*, 2007;Li *et al.*, 2007a). Les résultats obtenus montrent que ce PCSK9 inactif inhibe l'expression du LDLR avec la même efficacité que la forme sauvage de PCSK9. De même, l'injection de cette forme mutée S386A de PCSK9 *in vivo* chez la souris réduit également l'expression hépatique du LDLR (Lagace *et al.*, 2006;Schmidt *et al.*, 2008a).

- Mécanismes d'action de PCSK9 sur le LDLR

PCSK9 : une simple molécule chaperonne ?

Au vu des résultats obtenus avec les mutants catalytiquement inactifs, il apparaît que PCSK9 agisse essentiellement comme une simple molécule chaperonne pour guider la dégradation du LDLR. Il reste donc à déterminer quels sont les mécanismes de cette dégradation et dans quels compartiments de la cellule elle s'effectue. Maxwell et collaborateurs identifiaient les mécanismes de dégradation du LDLR par PCSK9 dans des compartiments post-RE (Maxwell *et al.*, 2005). Dans cette étude, la surexpression de PCSK9 n'affecte ni la synthèse ni le trafficking du LDLR, et l'inhibition de la voie du protéasome n'interfère pas sur la dégradation du LDLR par PCSK9 (Maxwell *et al.*, 2005). Par la suite, la localisation intracellulaire de l'interaction entre PCSK9 et le LDLR s'est précisée grâce à plusieurs travaux. Ainsi PCSK9 et le LDLR sont colocalisés à la surface des hépatocytes (Lagace *et al.*, 2006). Les résultats de co-immunoprécipitation prouvent que PCSK9 se lie au domaine extracellulaire du LDLR (Lagace *et al.*, 2006). Le co-marquage immunofluorescent de ces protéines montre que PCSK9 et le LDLR sont colocalisés dans les endosomes précoces et tardifs et dans les lysosomes (Lagace *et al.*, 2006;Nassoury *et al.*, 2007). L'internalisation de PCSK9 dans la cellule est clairement dépendante de la présence du LDLR à la surface membranaire (Lagace *et al.*, 2006) et également de l'internalisation du LDLR. Si on bloque ces mécanismes d'internalisation par l'utilisation d'hépatocytes primaires de souris déficientes en ARH (Lagace *et al.*, 2006) ou en inhibant l'expression de la chaîne lourde de la clathrine avec des siRNA (Nassoury *et al.*, 2007), on empêche la dégradation du LDLR. Prouvant que l'internalisation du LDLR est nécessaire, l'incubation de fractions membranaires comprenant le LDLR avec PCSK9 n'induit pas la dégradation du LDLR (Holla

et al., 2007). De même, on prévient de la dégradation du LDLR par PCSK9 en traitant les cellules au nocodazole, un inhibiteur du transport intracellulaire le long des microtubules (Holla *et al.*, 2007).

Enfin, l'inhibition des hydrolases des lysosomes par la chloriquine (Lagace *et al.*, 2006) ou la chlorure d'ammonium (Nassoury *et al.*, 2007;Holla *et al.*, 2007) inhibe la dégradation du LDLR par PCSK9, apportant la preuve que ces vésicules sont bien le lieu de dégradation du LDLR. Appuyant ces résultats, les études de liaison de PCSK9 au LDLR par résonance plasmonique (Biacore) suggèrent que ces 2 protéines forment un complexe hautement stable dans les lysosomes. L'affinité de PCSK9 pour le LDLR est augmentée de 150 fois à pH endosomal acide par rapport à un pH neutre (plasma) (Fisher *et al.*, 2007;Cunningham *et al.*, 2007).

Rappel sur le fonctionnement du LDLR

Le gène du LDLR (situé au locus 19p13.2) code pour une protéine de 839 acides aminés d'un poids moléculaire de 120 kDa. Au cours de sa maturation vers la membrane plasmique, le LDLR subit une glycosylation aboutissant à la forme mature de la protéine d'un poids moléculaire de 160 kDa. A la membrane plasmique, le LDLR est localisé au niveau de zones enrichies en clathrine (pour revue : (Jeon and Blacklow, 2005).

La partie extracellulaire du LDLR se divise en 3 modules (**figure 30A**) :

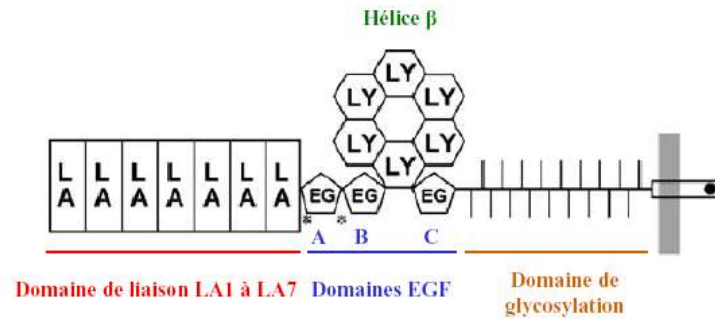
- L'extrémité N-terminale débute par 7 répétitions contiguës riches en cystéine d'environ 40 résidus chacune. Ces répétitions sont nommées LA1 à LA7 (LDLR type A repeats) et constituent le domaine de liaison aux lipoprotéines *via* leur apo-B/E.
- S'ensuit une région de 400 résidus possédant 35% d'homologie avec l'EGFP (epidermal growth factor precursor) qui consiste en 2 sous-domaines EGF-like A et B séparé d'un 3^{ème} EGF-C par une série de 6 répétitions de motifs contenant les acides aminés YWTD se combinant pour former une hélice β (β -propeller).
- Immédiatement après la région EGFP se trouve une séquence de 58 acides aminés riche en sérine et thréonine, lieu de la O-glycosylation.

La partie C-terminale du LDLR continue avec le segment transmembranaire et une queue cytoplasmique de 50 acides aminés contenant le motif NPxY nécessaire pour diriger le LDLR vers les vésicules recouvertes de clathrine (pour revue : (Jeon *et al.*, 2005).

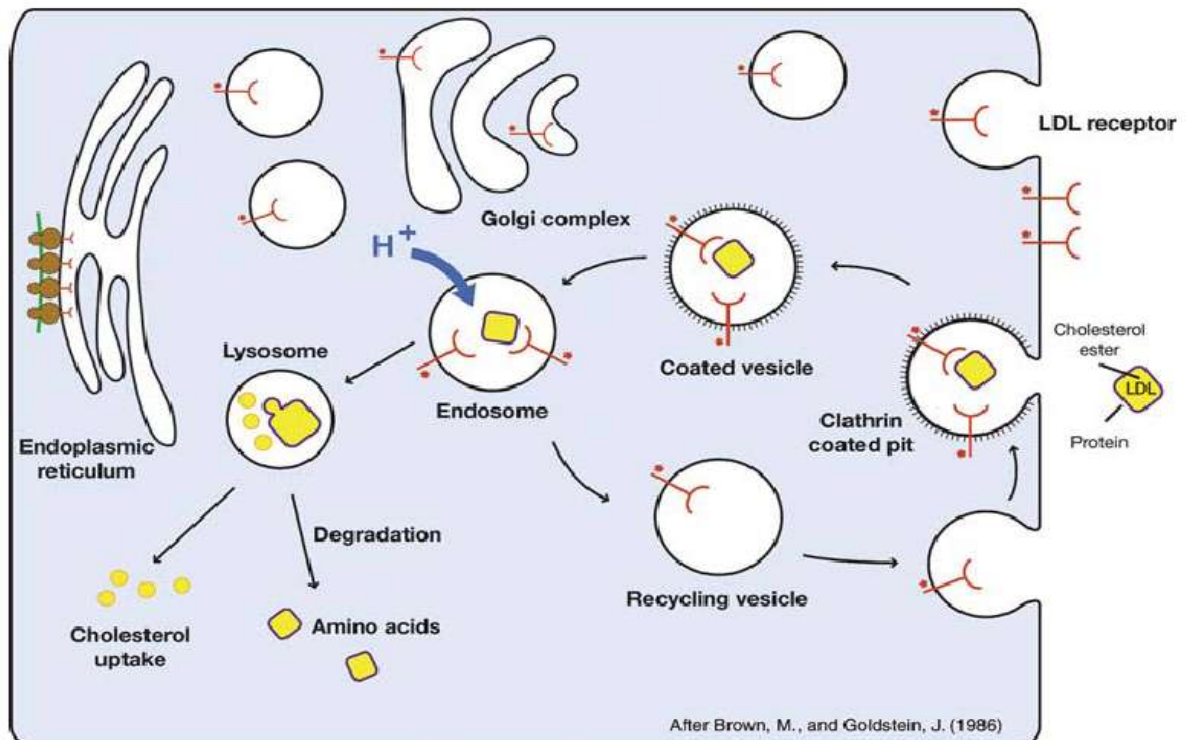
Suite à la liaison avec son ligand, le LDLR est endocyté avec la lipoprotéine. Au cours de l'acidification de l'endosome, le complexe LDLR et lipoprotéine se dissocie. Le LDLR est alors redirigé vers la membrane où il est recyclé, la lipoprotéine sera quant à elle dégradée dans les lysosomes (**figure 30B**).

Permettant la dissociation du LDLR et de la particule lipoprotéique, l'acidification du pH induit un changement conformationnel du LDLR. A pH neutre au niveau de la membrane, le LDLR adopte une conformation ouverte linéaire (**figure 30C**). Suite à la diminution du pH dans les endosomes, le LDLR libère la lipoprotéine et se met en conformation fermée. Ce processus est contrôlé par la région EGFP et plus particulièrement le domaine à hélice β . On constate ainsi un repliement du LDLR, les répétitions LA4 et LA5 rentrant en contact direct avec la partie supérieure de l'hélice β . A pH acide, l'hélice β se comporte tel un ligand intramoléculaire du domaine de liaison du LDLR (pour revue : (Jeon *et al.*, 2005).

A



B



C

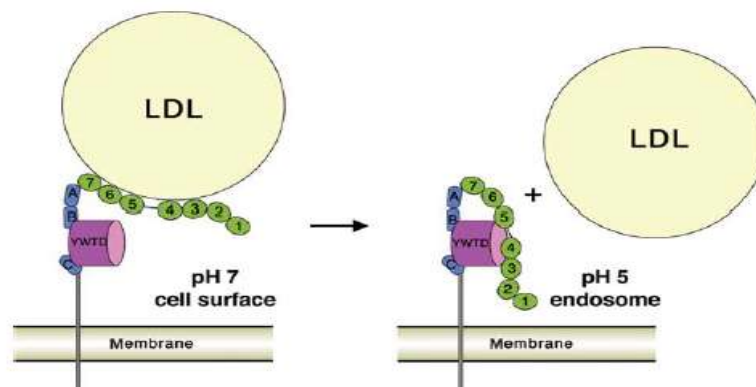


Figure 30 : Structure du LDLR (A), internalisation et recyclage du LDLR à la membrane (B) et changement de conformation du LDLR avec le pH (C), d'après (Jeon *et al.*, 2005)

PCSK9 se lie au domaine EGF-A du LDLR et empêche son recyclage à la membrane

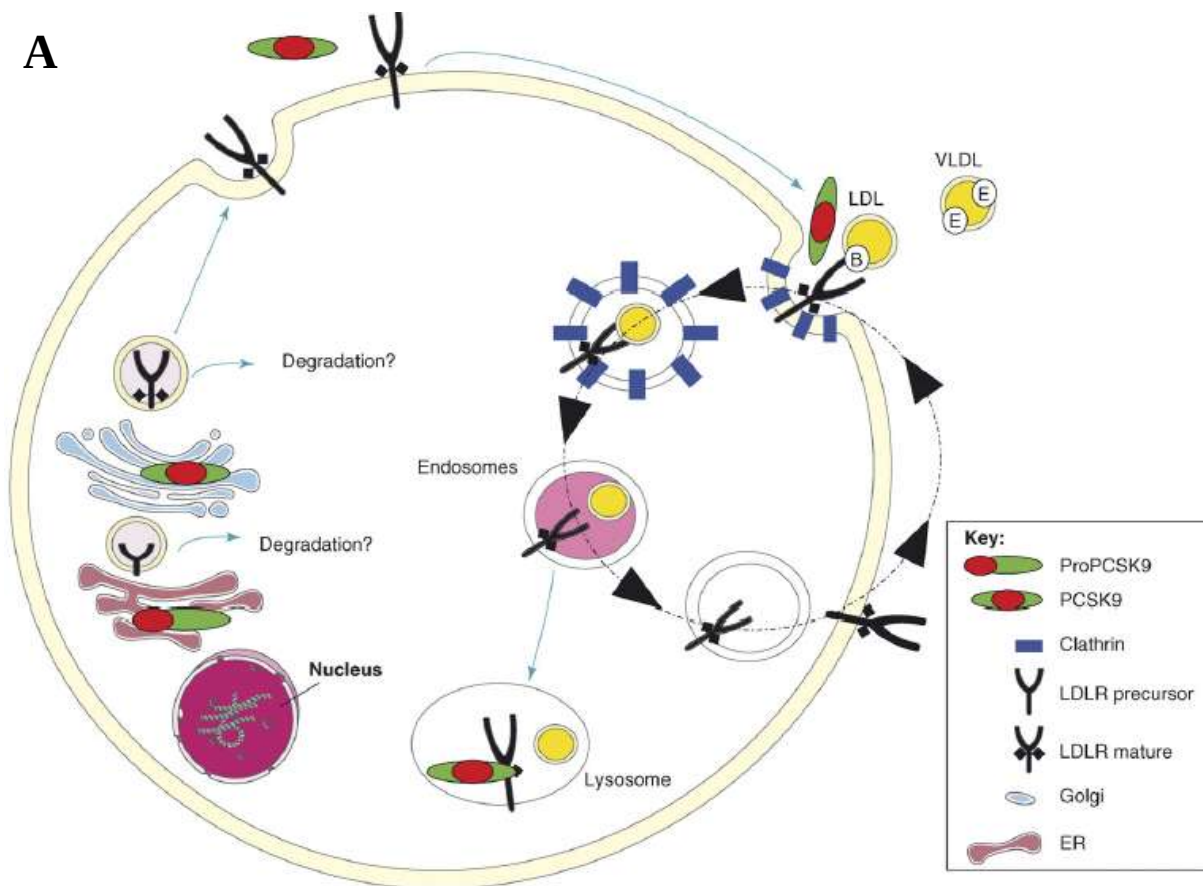
En suivant la localisation intracellulaire du LDLR par une technique d'immunomarquage suite à l'ajout de PCSK9 purifiée en milieu de culture, Zhang et collaborateurs ont démontré que PCSK9 induit la quasi disparition du LDLR de la surface membranaire en 1 heure. Le LDLR est cependant détecté dans les endosomes précoces puis tardifs. Deux heures après l'ajout de PCSK9, la totalité du LDLR se trouve dans les lysosomes (Zhang *et al.*, 2007). Il apparaît donc que PCSK9 déroute le LDLR vers les compartiments lysosomaux où il sera dégradé. Pour cela, la fixation de PCSK9 au LDLR empêche son changement conformationnel induit par l'acidification du pH et donc son retour vers la membrane (Zhang *et al.*, 2008a) (**figure 31A**).

Pour déterminer quelle partie exacte du LDLR se lie à PCSK9, différentes mutations du LDLR ont été exprimées dans des cellules COS-M, elles-mêmes incubées en présence de PCSK9 (Zhang *et al.*, 2007). PCSK9 se lie toujours au LDLR quand celui-ci est délété des domaines LA1 à LA7. Par contre, PCSK9 ne lie plus le LDLR délété de la région EGF. Seule la délétion du domaine EGF-A empêche la fixation de PCSK9 au LDLR. On constate toujours une interaction de PCSK9 avec le LDLR malgré la perte du domaine EGF-B, de l'hélice β ou du domaine de glycosylation. L'ablation du domaine EGF-C empêche l'adressage du LDLR à la membrane. La liaison entre PCSK9 et le domaine EGF-A du LDLR est calcium-dépendant. La mutation du résidu D310 du domaine EGF-A qui coordonne la fixation du calcium contrôle la liaison de PCSK9 et l'internalisation du LDLR. De la même manière, la chélation des ions calcium par l'EDTA bloque la liaison de PCSK9 au LDLR (Zhang *et al.*, 2007).

La fixation de PCSK9 au domaine EGF-A a été confirmée dans d'autres études et l'analyse cristallographique de la liaison PCSK9-LDLR a été établie (**figure 31B**) (Kwon *et al.*, 2008;Bottomley *et al.*, 2009). PCSK9 se lie au domaine EGF-A au niveau de son domaine catalytique, mais le site de liaison reste éloigné de la poche catalytique. La dissociation du prodomaine de la forme mature PCSK9 n'est pas indispensable à la liaison. Le prodomaine et le domaine CHRD de PCSK9 ne se fixent pas au LDLR. De plus, ces études montrent l'importance des interactions entre le résidu D374 de PCSK9 et H306 du LDLR dans l'établissement de liaisons hydrogènes (Kwon *et al.*, 2008;Bottomley *et al.*, 2009).

Des études de mutations dans les parties de PCSK9 et du LDLR qui n'interagissent pas ensemble soulignent leur importance dans le processus de dégradation lysosomal (Zhang *et al.*, 2008a). Ainsi les délétions successives d'une ou plusieurs répétitions LA de la partie N-

terminale du LDLR montre qu'aucune d'entre elles n'est spécifiquement requise pour la dégradation lysosomale, mais qu'au moins 3 répétitions doivent toujours être présentes. Dans le cas contraire, le LDLR est internalisé dans les endosomes mais ne sera pas dégradé dans les lysosomes. Le constat est le même concernant la délétion de l'hélice β . Ceci montre que la simple fixation de PCSK9 au LDLR ne suffit pas à initier sa dégradation dans les lysosomes. De même, la partie N-terminale de PCSK9 se fixe au LDLR et provoque son internalisation mais pas sa dégradation. Ces résultats suggèrent l'intervention d'un 3^{ème} partenaire, non encore identifié, qui serait recruté par le complexe PCSK9-LDLR et qui entraînerait son déroutage vers les lysosomes (Zhang *et al.*, 2008a).



B

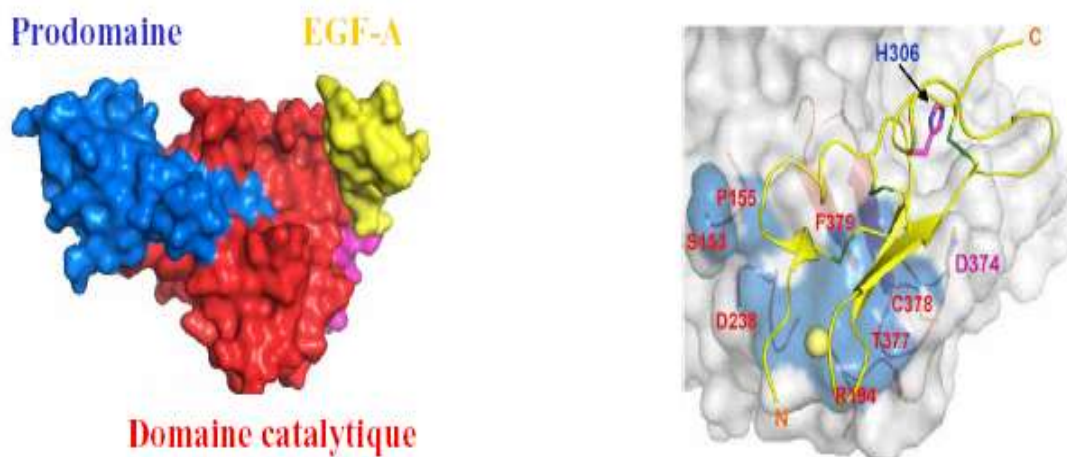


Figure 31 : PCSK9 interfère avec le recyclage du LDLR (A), d'après (Costet *et al.*, 2008) et liaison du domaine EGF-A du LDLR au domaine catalytique de PCSK9 (B), d'après (Kwon *et al.*, 2008; Bottomley *et al.*, 2009)

- Régulation de la liaison PCSK9-LDLR

Certaines conditions physiologiques, ainsi que certaines protéines ont été identifiées comme pouvant influencer la liaison de PCSK9 au LDLR.

Dans leur étude sur la formation de multimères de PCSK9, Fan et collaborateurs ont montré que les dimères et les trimères de PCSK9 sont plus efficaces que la forme monomérique pour stimuler la dégradation du LDLR (Fan *et al.*, 2008). La présence de HDL réduit l'association de PCSK9 avec elle-même. Il est intéressant de constater que les lipoprotéines influencent d'une autre manière la dégradation du LDLR par PCSK9. *In vitro*, les LDL inhibent la fixation de PCSK9 au LDLR, ce qui est corrélé avec le fait que l'ajout de ces particules diminue la dégradation du LDLR par PCSK9, sans qu'elles soient seules capables d'influencer l'expression du LDLR (Fisher *et al.*, 2007).

Nous avons vu que PCSK9 est soumise à un clivage dans son domaine catalytique par la furine et PC5/6A, générant une forme de 53 kDa (Benjannet *et al.*, 2006). La surexpression de cette forme de 53 kDa n'influence absolument pas l'expression du LDLR sur des hépatocytes en culture. De plus, l'ajout d'inhibiteur de la furine et de PC5/6A dans le milieu de culture à des doses croissantes augmente proportionnellement la dégradation du LDLR (Benjannet *et al.*, 2006). Ceci montre l'importance de l'inactivation de PCSK9 par les autres PC dans la régulation de l'expression du LDLR.

Enfin, les travaux de Mayer et collaborateurs ont montré pour la première fois l'existence d'un inhibiteur endogène de PCSK9. L'Annexine A2 est exprimée à la face extracellulaire des membranes plasmiques et joue un rôle crucial dans l'activation de l'activateur tissulaire du plasminogène. L'Annexine A2 est capable de lier PCSK9. Les analyses immunohistochimiques montrent que ces 2 molécules colocalisent à la surface des membranes cellulaires (Mayer *et al.*, 2008). Les études de mutagenèse indiquent que le domaine CHRD de PCSK9 interagit avec l'Annexine A2. La surexpression conjointe de PCSK9 et de l'Annexine A2 empêche la dégradation du LDLR, alors que la surexpression seule de l'Annexine A2 suffit à augmenter l'expression du LDLR dans les hépatocytes. De même, l'ajout de l'Annexine A2 exogène augmente le LDLR et bloque les effets de PCSK9 purifiée. La sous-expression de l'Annexine A2 *via* l'utilisation de siRNA provoque une diminution de l'expression endogène du LDLR (Mayer *et al.*, 2008). Les auteurs ont identifié la séquence de l'Annexine A2 qui se fixe à PCSK9 et suggèrent le développement d'inhibiteurs de PCSK9 à partir de cette séquence.

- PCSK9 et les autres membres de la famille du LDLR

La liaison de PCSK9 aux autres membres de la famille du LDLR est débattue. D'après Zhang et collaborateur, PCSK9 se fixe exclusivement au LDLR. Le VLDLR à une très forte homologie de séquence avec le LDLR, notamment au niveau de leur domaine EGF-A. Dans des cellules COS-M, PCSK9 ne se fixe pas au VLDLR. Remplacer le domaine EGF-A du LDLR par celui du VLDLR empêche la fixation de PCSK9 au LDLR *in vitro*. Inversement, si on remplace le domaine EGF-A du VDLR par celui du LDLR, PCSK9 peut alors lier le VLDLR. Ceci a permis d'identifier le résidu leucine en position 318 dans le domaine EGF-A du LDLR et correspondant à l'acide aspartique pour le VLDLR comme étant critique pour la liaison entre PCSK9 et le LDLR (Zhang *et al.*, 2007;Lakoski *et al.*, 2009).

Néanmoins, Poirier et collaborateurs rapportent que PCSK9 peut induire l'internalisation et la dégradation du VLDLR et de l'ApoER (Poirier *et al.*, 2008;Lakoski *et al.*, 2009). *In vitro*, la surexpression ou un traitement des cellules avec de la protéine PCSK9 recombinante est capable d'entraîner la dégradation de ces 2 récepteurs. Comme pour le LDLR, l'activité catalytique de PCSK9 n'est pas requise. Cette régulation du VLDLR et de l'ApoER par PCSK9 est indépendante de la présence ou non du LDLR. D'autres travaux affirment de manière similaire que PCSK9 induit la dégradation du VLDLR et de l'ApoER *via* leur domaine EGF-A (Shan *et al.*, 2008).

- Effets des mutations de PCSK9 sur sa fonction

L'analyse de la structure 3D de PCSK9 et la récente compréhension de son mode de fixation au LDLR ont permis d'améliorer notre connaissance sur les effets fonctionnels des mutations de PCSK9. Ainsi, Horton a établi une classification en 5 catégories des diverses mutations de PCSK9 (pour revue : (Horton *et al.*, 2009). On compte les mutations de classe 1 qui affectent la synthèse même de la protéine, de classe 2 qui altèrent le clivage de proPCSK9, de classe 3 pour les mutations qui interfèrent avec le transport de PCSK9 dans le RE, de classe 4 pour celles qui modifient la stabilité de la protéine et enfin les mutations de classe 5 qui influencent l'affinité de PCSK9 pour le LDLR.

- Mutations de classe 1 : seule la mutation non sens Y142X conduit à un ARNm instable qui ne produit pas de protéine (Zhao *et al.*, 2006).
- Mutations de classe 2 : trois mutations ont lieu dans le prodomaine (délétion 97, G106R et S127R) et une dans le domaine catalytique (L253F). Ces mutations empêchent le clivage et donc la sécrétion de PCSK9. Pourtant, si la majorité sont des mutations perte de fonction, la S127R est une mutation gain de fonction. Cette mutation particulière possède également une affinité pour le LDLR augmentée par 5 (Cunningham *et al.*, 2007) et fait donc partie des mutations de classe 5.
- Mutations de classe 3 : concerne la mutation perte de fonction C679X, qui est amputée de 14 acides aminées. Le mutant est bien clivé mais reste bloqué dans le RE (Zhao *et al.*, 2006).
- Mutations de classe 4 : Benjannet et collaborateurs ont rapporté que la furine et PC5/6 clivent et inactivent PCSK9. Certains mutants gain de fonction comme la F216L et R218S sont moins affectés par ce clivage et donc aurait probablement une demi-vie prolongée. A l'inverse, la mutation perte de fonction A443T a une susceptibilité augmentée pour ce clivage par la furine et PC5/6 (Benjannet *et al.*, 2006). D'autres mutations interviennent sur des modifications post-traductionnelles de PCSK9. Par exemple, la mutation perte de fonction R46L bloque la phosphorylation de la sérine en position 47 (Dewpura *et al.*, 2008). On trouve également la mutation gain de fonction D374Y qui forme plus facilement des multimères que la forme sauvage de PCSK9 (Fan *et al.*, 2008).
- Mutations de classe 5 : La mutation D374Y, qui conduit à une hypercholestérolémie sévère, augmente l'affinité de PCSK9 pour le LDLR par 28 fois (Cunningham *et al.*, 2007). Au niveau de l'interface structurel entre PCSK9 et le domaine EGF-A du LDLR, le résidu D374 joue un rôle clé pour la reconnaissance du résidu H306 du domaine EGF-A. Le remplacement de l'aspartate par une tyrosine ajoute un pont hydrogène *via* le groupement hydroxyle au niveau du résidu C319 du domaine EGF-A qui stabilise encore plus la liaison de PCSK9 au LDLR (Bottomley *et al.*, 2009). A la même position, la mutation D374H est aussi associée à l'hypercholestérolémie.

b) PCSK9 et sécrétion des VLDL

Très tôt après l'identification de la mutation gain de fonction S127R (Abifadel *et al.*, 2003), une étude cinétique du métabolisme des lipoprotéines réalisée au laboratoire a été menée chez 2 individus porteurs de cette mutation. Bien qu'un défaut du catabolisme des LDL fût constaté chez ces patients, il était également observé une augmentation de la production des VLDL-apoB d'un facteur 3 par rapport à des individus normaux ou porteurs de mutation du LDLR (Ouguerram *et al.*, 2004). *In vitro*, la surexpression des formes mutées S127R et D374Y dans des hépatomes de rat augmente la sécrétion d'apo-B, alors qu'aucun changement n'a lieu suite à la surexpression de la forme sauvage de PCSK9 ou de la mutation F216L (Sun *et al.*, 2005). Lors de la caractérisation phénotypique des souris invalidées pour PCSK9, Rashid et collaborateur rapportent que les hépatocytes primaires de ces souris sécrètent moins d'apo-B48 que les hépatocytes de souris sauvages, et ont une tendance non significative à la baisse de la sécrétion d'apo-B100 *in vitro* (Rashid *et al.*, 2005). Alimentant toujours le débat, les résultats sur la surexpression adénovirale de PCSK9 sont contradictoires *in vivo* puisqu'aucun changement sur la synthèse des VLDL n'est observé (Lalanne *et al.*, 2005), sauf lorsqu'on se place dans des conditions particulières. En effet, c'est suite à un jeûne prolongé de 24h chez la souris que l'on constate que la surexpression de PCSK9 induit une hypertriglycémie massive associée à une augmentation de la synthèse des VLDL-apoB *in vivo* chez la souris (Lambert *et al.*, 2006). Nous verrons dans le chapitre consacré à la régulation de l'expression de PCSK9 que cette protéine est réprimée pendant le jeûne. Ainsi la surexpression de PCSK9 dans cet état physiologique induit des effets marqués sur la triglycémie. Le fait que la surexpression de PCSK9 dans ces conditions chez les souris invalidées pour le LDLR n'induit pas de changement de sécrétion des VLDL par rapport aux souris LDLR^{-/-} atteste que cette hypertriglycémie est dépendante de la voie du LDLR dans ce phénomène. Ceci corrèle avec l'hypothèse émise par Twisk et collaborateurs selon laquelle le LDLR joue sur la sécrétion des VLDL en intervenant dans leur recapture précoce (Twisk *et al.*, 2000). Enfin, des travaux menés au laboratoire sur le rôle de PCSK9 dans l'intestin montrent que les souris invalidées pour PCSK9 ont une lipémie postprandiale réduite de façon drastique par rapport aux souris sauvages suite à un gavage à l'huile d'olive (Le May C. *et al.*, 2009). Ces données seront détaillées plus loin.

Jusqu'à présent, aucune étude clinique ne faisait état de corrélation entre les taux circulants de PCSK9 et la triglycémie. De même, les TG plasmatiques ne sont pas

modifiés chez les souris invalidées pour PCSK9. Dernièrement, les études cliniques menées par les laboratoires d'Hélène Hobbs (Lakoski *et al.*, 2009) et de Nabil Seidah (Dubuc *et al.*, 2009) attestent d'une corrélation positive entre les TG plasmatiques et les niveaux circulants de PCSK9.

c) Rôle hépatique et extrahépatique de PCSK9

- Rôle du PCSK9 hépatique

Le foie et l'intestin sont les organes majeurs exprimant PCSK9. Afin de déterminer le rôle relatif du foie dans sa contribution à la sécrétion de PCSK9 circulant, Zaid et collaborateur ont généré des souris invalidées pour PCSK9 spécifiquement dans le foie (Zaid *et al.*, 2008). Alors que PCSK9 est détectée dans le plasma des souris sauvages par immunoprécipitation, aucun signal n'est obtenu chez les souris invalidées pour PCSK9 dans le foie. Ceci suggère que le foie est l'organe principal de sécrétion de PCSK9 chez la souris. Les souris invalidées pour PCSK9 de façon globale ou spécifiquement dans le foie montrent une diminution de la cholestérolémie de 42% et de 27%, respectivement. Ainsi le foie intervient pour 2/3 dans le phénotype hypocholestérolémiant des souris déficientes pour PCSK9, laissant entendre un rôle possible des tissus extra-hépatiques dans la régulation de la cholestérolémie par PCSK9.

Une équipe a créé un modèle de souris surexprimant la forme humaine de PCSK9 uniquement dans les reins. Une forte augmentation de PCSK9 dans le plasma est détectée, associée à une hypercholestérolémie chez les souris et une quasi-disparition du LDLR au niveau de foie (Luo *et al.*, 2008). Ces travaux apportent la preuve que le transgène de PCSK9 peut être sécrété par d'autres organes que le foie. En revanche, il n'existe pas de preuve que cette sécrétion puisse être relevante dans les conditions physiologiques.

- Effet de PCSK9 circulant sur les organes extrahépatiques

Chez la souris, l'injection intraveineuse d'une dose de PCSK9 de 100 µg réduit au bout de 2h l'expression du LDLR de 91% dans le foie, mais également dans les poumons (-64%), le tissu adipeux (-63%) et les reins (-51%). De façon surprenante, aucun changement d'expression du LDLR n'est observé dans le cerveau (Schmidt *et al.*, 2008a). Ces résultats

sont également retrouvés dans des conditions de surexpression adénovirale de PCSK9 chez la souris. Les surrénales sont les organes qui expriment le plus la forme protéique du LDLR par rapport à la quantité de tissu. Dans une étude où la perfusion de PCSK9 à 32 µg/h réduit l'expression hépatique du LDLR de 90% en 2h chez la souris, il est intéressant de ne constater aucun changement d'expression du LDLR dans les surrénales (Luo *et al.*, 2008; Grefhorst *et al.*, 2008). Ces résultats laissent à penser que PCSK9 n'agit pas de la même façon sur tous les organes, et renforcent l'hypothèse d'un 3^{ème} partenaire nécessaire à la dégradation du LDLR par PCSK9.

- Rôle de PCSK9 dans l'intestin et la période post-prandiale

Ces travaux menés au laboratoire par Cédric Le May ont caractérisé pour la première fois la localisation intestinale de l'expression de PCSK9 et son action sur la lipémie post-prandiale.

L'ARNm de PCSK9 est fortement exprimé tout le long du tractus gastro-intestinal, de l'intestin proximal au colon sans changement relatif dans son expression. L'analyse immunohistochimique de coupe d'intestin humain montre l'expression exclusive de PCSK9 au niveau de la barrière intestinale. Dans les cellules coliques CaCo2, PCSK9 est surtout localisée au pôle apical. PCSK9 est fonctionnelle dans l'intestin : l'expression protéique du LDLR est augmentée de 620% dans l'intestin des souris PCSK9^{-/-}. Suite à un gavage à l'huile d'olive, la triglycémie augmente de 200% en 2h chez les souris sauvages. Chez les souris PCSK9^{-/-}, la triglycémie n'augmente que légèrement (Le May C. *et al.*, 2009). Ces effets surprenants sur la lipémie postprandiale ne sont pas la conséquence d'une malabsorption intestinale ou d'un défaut de la motilité intestinale chez les souris PCSK9^{-/-}. Le dosage des TG directement sécrétés par l'intestin dans la lymphe suite à la canulation du canal lymphatique ne montre aucune différence entre souris sauvages et PCSK9^{-/-} après gavage. Par contre, il est découvert une diminution de la quantité d'apo-B dans la lymphe des souris PCSK9^{-/-}. Ceci est également retrouvé *in vitro* où la surexpression adénovirale de PCSK9 dans les CaCo2 augmente la sécrétion d'apo-B, alors qu'à l'inverse son invalidation par des siRNA la diminue. L'analyse de la taille des chylomicrons sécrétés par les souris montre une augmentation de 10% de leur diamètre chez les souris PCSK9^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Le May C. *et al.*, 2009).

Ainsi, les souris PCSK9^{-/-} sécrètent moins de chylomicrons, mais de plus grande taille et plus riches en TG. Le marquage à l'iode 125 de ces particules montre qu'elles sont plus facilement catabolisées quand elles sont ré-injectées *in vivo* chez des souris sauvages. De plus, les souris PCSK9^{-/-} arrivent à éliminer plus rapidement les chylomicrons de souris sauvages, peut-être en rapport avec l'augmentation de l'expression hépatique du LDLR. Ces résultats sont importants car l'hyperlipidémie post-prandiale est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (Taskinen, 2003). Ainsi, la diminution du risque cardiovasculaire de 88% observé chez les individus porteurs de mutation perte de fonction pourrait être consécutive à ce mécanisme en plus de la seule baisse du LDL-C. La caractérisation phénotypique de souris spécifiquement invalidées pour PCSK9 au niveau de l'intestin permettra de mieux préciser son rôle et sa fonction dans cet organe.

d) Régulation de l'expression de PCSK9

Si PCSK9 est bel et bien un modulateur du métabolisme du cholestérol, il fut très rapidement rapporté que son expression est elle-même régulée par le cholestérol (**figure 32**). Cette modulation de PCSK9 est sous le contrôle des facteurs de transcription SREBP1a et SREBP2 qui stimulent l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol, comme le LDLR. Ainsi, l'expression ARNm de PCSK9 est diminuée dans le foie des souris nourries avec un régime riche en cholestérol (Maxwell *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2008). Cette régulation de PCSK9 est clairement sous la dépendance des SREBPs puisque son expression est augmentée chez les souris surexprimant SREBP1a ou SREBP2 (Maxwell *et al.*, 2003; Horton *et al.*, 2003), et diminuée quand ces facteurs de transcription sont inactivés (Horton *et al.*, 2003). Donc, de façon apparemment contradictoire, PCSK9 est régulée de la même manière que le LDLR. Et tout comme le LDLR, l'expression de PCSK9 est augmentée par les statines et la déplétion en cholestérol *in vitro* chez l'homme (Dubuc *et al.*, 2004). Ces résultats sont confirmés chez le rat où l'inhibition de la squalène synthase par l'acide zaragozique, qui est une enzyme intervenant dans la biosynthèse du cholestérol, augmente l'expression hépatique de PCSK9 (Bedi *et al.*, 2008). Chez l'homme, les traitements avec les statines sont associés à une augmentation plasmatique de PCSK9. C'est notamment le cas pour l'atorvastatine (Mayne *et al.*, 2008; Careskey *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 2009; Lakoski *et al.*, 2009).

L'expression de PCSK9 est également influencée par le statut nutritionnel (Costet *et al.*, 2006). Chez la souris, un jeûne de 24h diminue l'expression hépatique de PCSK9 de 70%

alors qu'elle est restaurée suite à une ré-alimentation riche en hydrates de carbone. L'insuline augmente l'expression hépatique de PCSK9 *in vitro* et *in vivo* chez la souris durant un clamp hyperinsulinémique-euglycémique. Cet effet de l'insuline est dépendant de l'activation de SREBP1c, comme cela a été confirmé par l'utilisation de dominants positifs ou négatifs de ce facteur de transcription. SREBP1c conduit également les effets du récepteur nucléaire LXR sur l'induction de PCSK9 quand celui-ci est activé par son agoniste le T0901317. Ainsi PCSK9 est induit par les 3 SREBPs, l'élément de réponse commun SRE à ces facteurs de transcription a été identifié au niveau du promoteur du gène à 336 paires de base à partir du codon initiateur de la transcription (Costet *et al.*, 2006).

Au cours du jeûne, le récepteur nucléaire PPAR α est activé par les acides gras qui sont ses ligands naturels. Sanae Kourimate au laboratoire a d'abord montré qu'un traitement au fénofibrate, un agoniste synthétique de PPAR α , réprime l'expression hépatique de PCSK9 chez la souris. Cette répression par le fénofibrate est dépendante de PPAR α car elle n'est pas retrouvée chez les souris invalidées pour PPAR α (Lambert *et al.*, 2006). Ces travaux ont été approfondis et montrent que divers agonistes de PPAR α comme le fénofibrate, le clofibrate, le gemfibrozil et le Wy14643 répriment l'expression de PCSK9 dans des hépatocytes humains immortalisés. De plus, un traitement au fénofibrate bloque l'induction de PCSK9 par le T091317 et par les statines, potentialisant ainsi l'effet des statines sur l'activité du LDLR *in vitro* (Kourimate *et al.*, 2008). De manière intéressante, ces travaux montrent que PPAR α induit également l'expression de 2 autres PC : le furine et PC5/6, qui ont été préalablement identifiées comme pouvant cliver et inactiver PCSK9 (Kourimate *et al.*, 2008). Cette répression de PCSK9 par les fibrates est retrouvée chez l'homme dans une cohorte de 115 patients diabétiques qui montre une diminution des niveaux circulants de PCSK9 et du LDL-C suite à un traitement au fénofibrate (Mayne *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2008).

D'autres hormones et agents pharmacologiques interviennent dans la régulation de PCSK9. Le glucagon et l'éthinylestradiol, un dérivé de l'oestradiol, répriment tous 2 l'expression hépatique de PCSK9 chez le rat et augmentent l'expression protéique du LDLR (Persson *et al.*, 2009). La berbérine, une plante reconnue pour ses vertus hypocholestérolémiantes, réprime aussi l'expression de PCSK9 dans des hépatomes humains et prévient l'induction de PCSK9 par les statines (Cameron *et al.*, 2008c). Inversement, un traitement à l'hormone de croissance chez le rat induit l'expression ARNm de PCSK9 et du

LDLR dans le foie (Galman *et al.*, 2007). Dans ces dernières études, les mécanismes moléculaires de régulation ne sont pas élucidés.

L'expression de PCSK9 a également été explorée dans divers états pathologiques *in vivo* : chez le rat, l'induction d'un diabète insulino-pénique consécutif à un traitement à la streptozotocine réduit l'ARNm de PCSK9 et du LDLR dans le foie sans modifier l'expression protéique de ce dernier (Niesen *et al.*, 2008). Chez la souris, l'induction d'une inflammation suite à l'injection de LPS (lipopolysaccharide) provoque une augmentation de l'expression hépatique de PCSK9, associée à une diminution de la forme protéique du LDLR sans qu'aucun changement ne soit rapporté sur l'ARNm du LDLR (Feingold *et al.*, 2008).

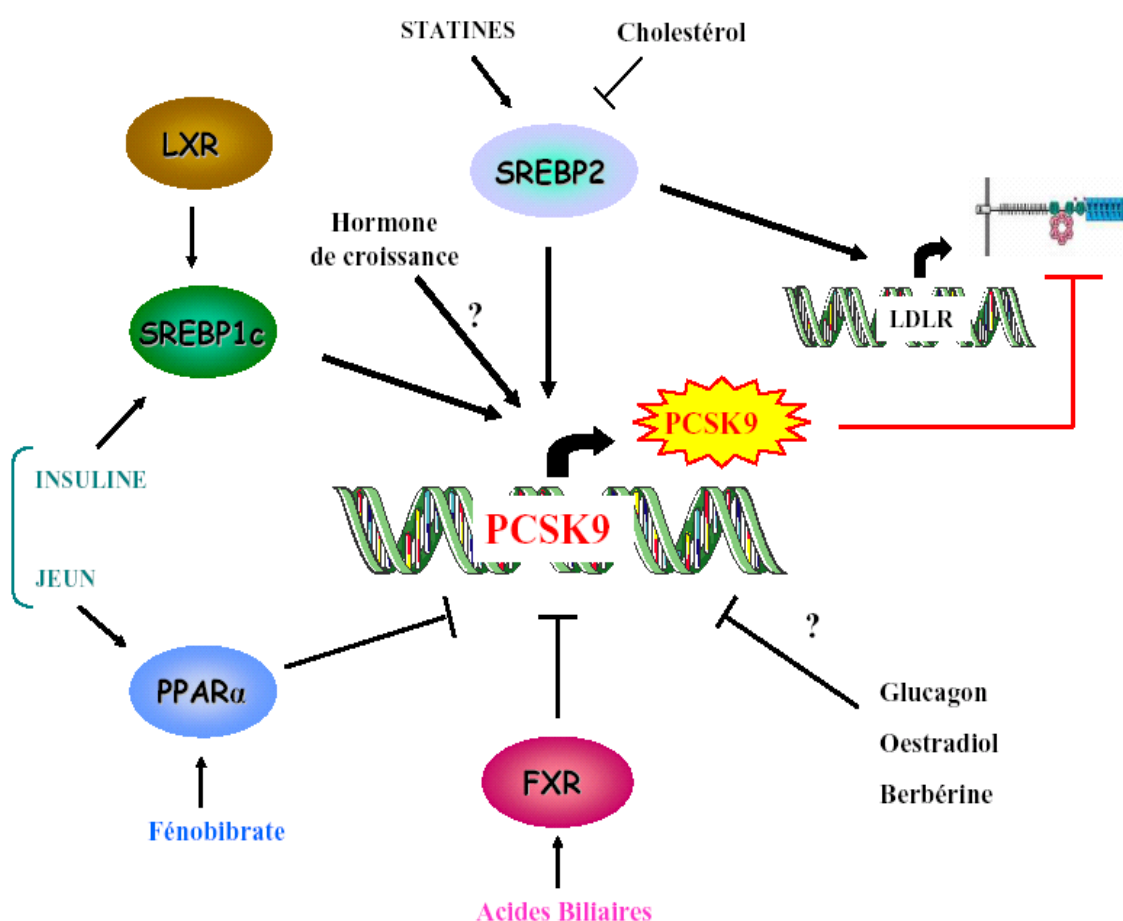


Figure 32 : Régulation transcriptionnelle de PCSK9

5) Autres rôles de PCSK9

a) PCSK9 et régénération hépatique

Les données initiales sur PCSK9 montraient que cette protéine était surexprimée dans les foies de rats partiellement hépatectomisés (Seidah *et al.*, 2003). Ces résultats sont confirmés dans une étude plus récente chez la souris (Zaid *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs apportent la preuve d'un rôle crucial de PCSK9 dans la régénération hépatique. Les souris invalidées pour PCSK9 et ayant subi une hépatectomie partielle survivent moins bien à cette opération que les souris sauvages. Les survivantes sont faibles et leur foie présente des signes de régénération retardée, avec par contre l'apparition de lésions nécrotiques.

b) PCSK9 et infection virale et parasitaire

Il est bien connu que le virus de l'hépatite C utilise des récepteurs membranaires pour s'introduire et proliférer dans le foie. Ces récepteurs comprennent, entre-autres, le LDLR mais aussi CD81. Dans cette étude tout a fait originale, Labonté et collaborateurs décrivent comment PCSK9 protège les hépatocytes de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). De plus, ils identifient un nouveau récepteur membranaire dégradé par PCSK9 après le VLDLR et l'ApoER : CD81 (Labonte *et al.*, 2009). En effet, la surexpression de PCSK9 dans des hépatomes humains réduit l'expression protéique de CD81, alors que son expression à la surface des hépatocytes est augmentée dans le foie de souris PCSK9^{-/-}. Cette régulation de CD81 est complètement indépendante de la présence ou non du LDLR à la membrane cellulaire. Ainsi, la surexpression de PCSK9 dans des hépatomes humains ou le traitement préalable de ces cellules par PCSK9 purifiée protège de l'infection par le VHC (Labonte *et al.*, 2009).

La prévalence des mutations perte de fonction de PCSK9 dans les populations originaires d'Afrique (Cohen *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2007) suggère une sélection positive de l'évolution par rapport à leur environnement. Les mutations conduisant à des hypocholestérolémies ont possiblement donné un avantage aux porteurs de ces mutations vivant dans des régions propices aux infections parasitaires, en particulier le paludisme causé par l'infection du *Plasmodium falciparum*. En effet, ces parasites se nourrissent du cholestérol circulant de l'hôte, nécessaire à leur survie et reproduction. Ainsi, privant les parasites de

cholestérol, les porteurs des mutations pertes de fonctions seraient protégés des infections parasitaires, ce qui expliquerait la grande fréquence et la restriction raciale des mutations hypocholestérolémiantes de PCSK9 chez les populations originaires d'Afrique (Mbikay *et al.*, 2007).

c) PCSK9 et maladie d'Alzheimer

Dans les neurones, BACE1 (β -site amyloid precursor protein APP-cleaving enzyme 1) est la protéase qui initie le clivage de l'APP pour produire l'amyloïde β ($A\beta$). La maladie neurodégénérative d'Alzheimer est fortement associée à l'accumulation de cette forme protéique $A\beta$, particulièrement hydrophobe, qui s'agrège et forme des dépôts amyloïdes neurotoxiques dans le cerveau des patients (Stockley and O'Neill, 2008). Une équipe a démontré que BACE1 est une protéine acétylée au cours de sa maturation post-RE, et que seule cette forme acétylée atteint la membrane cellulaire. La forme non acétylée est dégradée par un mécanisme intracellulaire (Costantini *et al.*, 2007). Ces auteurs ont démontré que PCSK9 pourrait être responsable de la dégradation de cette forme non acétylée de BACE1. Dans un premier temps, la surexpression de PCSK9 dans des neurogliomes H4 induit une diminution de l'expression des formes immatures et matures de BACE1. La dégradation de la forme immature de BACE1 suggère un mécanisme d'action intracellulaire de PCSK9 (Jonas *et al.*, 2008). La sous-expression de PCSK9 dans ce modèle de culture induit d'avantage l'expression de la forme non acétylée de BACE1 que de sa forme acétylée, allant dans le sens d'une prise en charge intracellulaire de BACE1 par PCSK9. De plus, le traitement de ces cellules par la forme sauvage ou catalytiquement inactive de PCSK9 conduit à la dégradation de BACE1. Ainsi, tout comme le LDLR, PCSK9 induit la dégradation de BACE1 de façon intra et extracellulaire, sans avoir recours à son activité catalytique. D'un point de vue physiologique, les souris invalidées pour PCSK9 présentent plus de protéines BACE1 dans le néocortex et une plus grande quantité d' $A\beta$ (Jonas *et al.*, 2008).

Enfin, les auteurs démontrent que le LDLR est une protéine acétylée, émettant l'hypothèse que PCSK9 pourrait prendre en charge la dégradation des protéines non acétylées dans les compartiments post-RE (Jonas *et al.*, 2008).

6) Conclusion : quelles perspectives thérapeutique pour la cible PCSK9

Nous avons vu que PCSK9, un inhibiteur naturel du LDLR, provoque une hypercholestérolémie familiale et une augmentation du risque cardiovasculaire chez l'homme quand il est muté gain de fonction. A l'inverse, les mutations perte de fonction diminuent le LDL-C plasmatique et surtout protègent durablement et profondément des maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'inhibition de PCSK9 apparaît être une cible thérapeutique majeure dans la prise en charge des hypercholestérolémies et de leurs complications cardiovasculaires. Le développement de tels inhibiteurs serait une arme efficace en association avec les statines, car non seulement les statines induisent le LDLR, mais également PCSK9 (Dubuc *et al.*, 2004). Cette augmentation de PCSK9 sous l'effet de statines est retrouvée chez l'homme (Mayne *et al.*, 2008; Careskey *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 2009; Lakoski *et al.*, 2009), et plusieurs données suggèrent que PCSK9 est un frein à l'action des statines. Tout d'abord, certaines mutations gain de fonction de PCSK9 comme le D374Y induisent des hypercholestérolémies qui résistent aux traitements par statines (Naoumova *et al.*, 2005). Ensuite, des patients hypercholestérolémiques mutés sur le LDLR et hyper-répondeurs par statines se sont avérés être porteurs de mutations perte de fonction de PCSK9 (Berge *et al.*, 2006). Ceci est également démontré expérimentalement puisque les souris invalidées pour PCSK9 sont plus sensibles aux traitements par statines que les souris sauvages (Rashid *et al.*, 2005). Cet effet de frein de PCSK9 à l'action des statines pourrait expliquer pourquoi le doublement d'une dose de statine ne réduit plus le LDL-C que de 6% supplémentaire (Jones, 2003). Des données obtenues *in vitro* sur des modèles d'hépatocytes attestent également que l'inhibition pharmacologique de PCSK9 potentialise l'effet des statines sur l'activité du LDLR (Kourimate *et al.*, 2008). Différents moyens peuvent potentiellement mener à l'inhibition de l'action de PCSK9 sur le LDLR. Bien que l'activité de PCSK9 ne soit pas nécessaire à sa fixation et à son inhibition du LDLR, le développement de bloqueurs de l'activité autocatalytique de PCSK9 délivrés à l'intérieur de la cellule empêcherait sa maturation et sa sécrétion. Inhiber l'expression de PCSK9 est une autre piste. L'administration d'oligonucléotides antisens chez la souris nourrie par un régime riche en graisses a donné des résultats prometteurs, avec une baisse du cholestérol total et du LDL-C de 53% et 38% au bout de 6 semaines (Graham *et al.*, 2007). Ces résultats furent confirmés chez le singe suite à l'administration de siRNA anti-PCSK9 (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2008). Enfin, une dernière piste serait la mise au point de petits peptides inhibant la liaison de

PCSK9 sécrétée au domaine extracellulaire du LDLR. Il est montré que l'ajout du domaine EGF-A du LDLR au milieu de culture d'hépatomes traités par de la PCSK9 recombinante empêche la dégradation du LDLR et restaure son activité (Shan *et al.*, 2008). La forme mutée H306Y du LDLR est associée à l'hypercholestérolémie familiale. Cette mutation du LDLR augmente son affinité pour PCSK9. Là aussi, l'ajout de fragment du LDLR H306Y à des hépatomes surexprimant PCSK9 empêche la liaison de ce dernier à la forme mature du LDLR à la surface membranaire et restaure ainsi son expression (McNutt *et al.*, 2009). Enfin, le développement d'anticorps reconnaissant la partie de PCSK9 se liant au LDLR résulte en une augmentation de l'expression du LDLR *in vitro* mais également *in vivo* chez la souris avec une diminution du LDL-C de 36% chez cet animal et de 80% chez le singe (Chan *et al.*, 2009). Le fait que des individus porteurs de mutations perte de fonction de PCSK9 vivent depuis leur naissance avec des taux bas de LDL-C, voire très bas pour les rares individus homozygotes, renforce l'idée de traitements hypocholestérolémiants administrés de façon précoce pour protéger des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, on ne connaît toujours pas la fonction exacte de PCSK9 dans l'organisme. Pourquoi l'évolution aurait-elle conservée le système d'une protéine synthétisée lors de la déplétion en cholestérol alors que son seul but connu est d'empêcher l'entrée du cholestérol dans la cellule ? Une hypothèse serait que PCSK9, agissant essentiellement au niveau du foie, empêche la recapture des lipoprotéines à apo-B synthétisées par le foie par le LDLR hépatique afin de favoriser l'approvisionnement des tissus périphériques en lipides. Notre laboratoire s'est intéressé à d'autres rôles de PCSK9 dans le métabolisme des lipides, notamment en explorant son rôle dans l'intestin ou encore sa fonction dans la dyslipidémie associée à l'insulinorésistance (données non publiées).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement aux interactions entre PCSK9 et le métabolisme du cholestérol de plusieurs façons. Les acides biliaires sont la seule voie de sortie du cholestérol de l'organisme. A l'heure actuelle, on reconnaît clairement la fonction intégrative de ces molécules dans le métabolisme des lipides mais aussi des glucides. C'est donc naturellement que nous nous sommes posés la question de savoir si les ABs pouvaient réguler l'expression de PCSK9 étant donné leurs profils d'expression similaires dans l'organisme. Puis des données récentes ont démontré l'implication du cholestérol dans la dysfonction de la cellule β et le diabète. Aucune donnée préalable ne démontre une quelconque implication de PCSK9 dans le pancréas et la sécrétion d'insuline. Néanmoins, le développement d'inhibiteurs de PCSK9 capables de modifier l'expression du LDLR dans les tissus et donc l'entrée du cholestérol dans les cellules nous a poussé à explorer un éventuel rôle dans ce domaine.

TRAVAUX PERSONNELS

I) Etude de la régulation de PCSK9 par FXR et les acides biliaries

1) Introduction

Le gène *pcsk9* code pour une proprotéine convertase impliquée dans le métabolisme du cholestérol. PCSK9 est sécrétée dans la circulation sanguine par le foie et agit tel un inhibiteur naturel de l'expression du LDLR (pour revue : (Costet *et al.*, 2008). Chez l'homme, les mutations gain de fonction de PCSK9 provoquent une hypercholestérolémie et l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose, alors que les mutations perte de fonction sont associées à une diminution des taux circulants de LDL-C et à une protection cardiovasculaire augmentée (Cohen *et al.*, 2006). Chez la souris, la surexpression de PCSK9 induit une hypercholestérolémie et abolit l'expression hépatique de la protéine LDLR (Park *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2004). A l'inverse, les souris invalidées pour PCSK9 sont hypocholestérolémiques et ont une augmentation de l'expression du LDLR au niveau du foie (Rashid *et al.*, 2005). De plus, la surexpression de PCSK9 au cours du jeûne chez la souris induit une hypertriglycéridémie massive (Lambert *et al.*, 2006) tandis que les souris PCSK9^{-/-} ont une hypertriglycéridémie postprandiale très atténuée (Le May C. *et al.*, 2009). Récemment, les mesures des concentrations de PCSK9 chez l'homme sur de larges populations montrent une corrélation positive entre PCSK9 circulant et TG plasmatiques (Lakoski *et al.*, 2009).

Les données de la littérature décrivant les effets hypotriglycéridémisants des ABs dans les modèles animaux sont nombreuses. Les traitements avec les ABs corrigent l'hypertriglycéridémie rencontrée dans les modèles de rongeurs insulino-résistants (Ma *et al.*, 2006; Bilz *et al.*, 2006; Cariou *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006a). Chez l'homme, les traitements au CDCA améliorent aussi l'hypertriglycéridémie en clinique (Bateson *et al.*, 1978). L'activation du récepteur nucléaire FXR par les ABs, qui sont les ligands endogènes de ce récepteur, a été identifiée comme capitale pour conduire les effets hypotriglycéridémisants des ABs. Ceci est démontré par des approches pharmacologiques en utilisant des agonistes spécifiques de FXR comme le GW 4064 (Cariou *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006a), par manipulations génétiques en invalidant FXR (Ma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006a) ou encore en exprimant des formes constitutivement actives de ce récepteur nucléaire (Zhang *et al.*, 2006a). Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sont régulés par FXR (pour revue : (Cariou *et al.*, 2007b).

Si FXR et PCSK9 possèdent le même profil d'expression tissulaire dans l'organisme, à savoir qu'ils sont tous 2 fortement exprimés dans les organes régulateurs du métabolisme lipidique : foie et intestin, et dans une moindre mesure dans les reins, il existe une relation inverse concernant leur implication dans ce métabolisme lipidique du point de vue de la littérature. On remarque également que si l'expression de PCSK9 est augmentée en période postprandiale et diminuée au cours du jeûne (Costet *et al.*, 2006), c'est l'inverse qui est vrai pour l'expression de FXR (Duran-Sandoval *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Ceci permet donc d'imaginer une possible relation entre FXR et ses ligands les ABs et l'expression de PCSK9.

Pour cela, j'ai caractérisé les variations d'expression ARNm et protéique de PCSK9 *in vitro* consécutives aux traitements par différents ABs par des analyses en RT-PCR quantitative et western blot, respectivement. Les modèles de culture d'hépatocytes humains utilisés sont bien caractérisés dans la littérature et correspondent à la fois à des lignées d'hépatomes : les HepG2 (Javitt, 1990) et des hépatocytes humains immortalisés (IHH) (Schippers *et al.*, 1997). Des travaux menés en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille dans l'équipe du Pr. Bart Staels m'ont permis de travailler à partir d'ARNm d'hépatocytes primaires de souris. Dans le but de valider d'un point de vue fonctionnel la régulation de l'expression de PCSK9, j'ai adapté au laboratoire le test d'activité du LDLR *in vitro* à partir de la méthode développée par Brown et Goldstein (Goldstein *et al.*, 1983). Enfin, afin d'identifier les mécanismes moléculaires sous jacents à la régulation de l'expression de PCSK9, j'ai procédé à différentes approches pharmacologiques (ligands de FXR et de PXR) et moléculaires (utilisation de siRNA) *in vitro*.

2) **Article I:** Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes

FEBS Letters 582 (2008) 949–955

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Available online 25 February 2008

Edited by Robert Barouki

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

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

2.2. Cell culture

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

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

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

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

2.3. Western blots

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

2.4. RNA extraction and real time PCR

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

LDLR: AAGGCTGTCCCAAGA forward, CGAACTGCCGAGAGATGCA reverse; **PCSK9:** ACGTGGCTGGCATTGCA forward, AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA reverse; **18S:** AAG-

TCCCTGCCCTTTGTACACA forward, CGATCCGAGGGCCTC-ACTA reverse; **UGT2B4:** CAACCAGTGAAGCCCTTGA forward, GAAGGTGCTTGGCTCCTTATG reverse; **SHP:** CTCTTCCTGCTTGGGTGGC forward, GCACATCGGGGTGAAGAGG reverse; **CYP3A4:** CTCTTCACCGTGACCCAAAGTACT forward, AGCAAACCTCATGCCAATGC reverse.

2.5. Isolation and radiolabelling of LDL

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

2.6. Binding of 125 I-labelled LDL

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

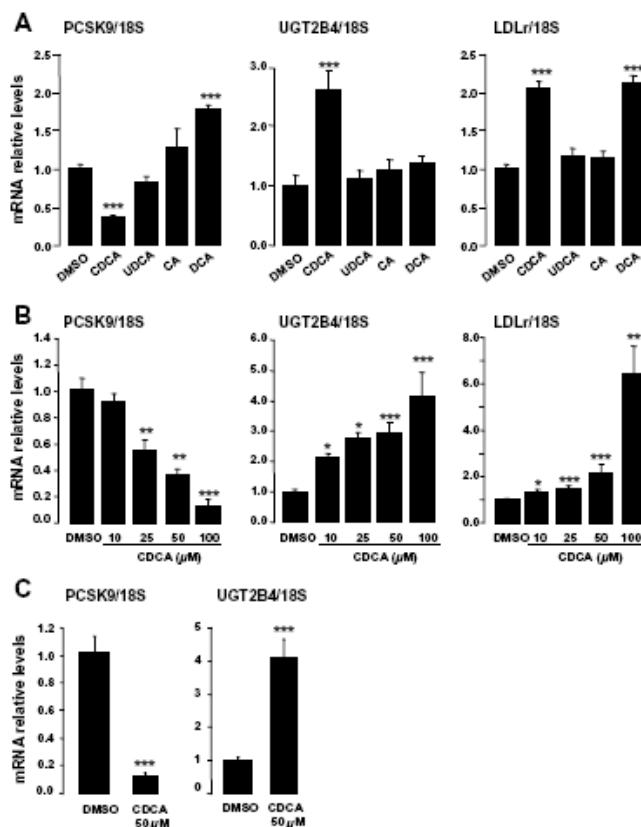


Fig. 1. CDCA reduces PCSK9 mRNA levels in human hepatocytes cell lines. PCSK9, UGT2B4 and LDLr mRNA contents were measured by Q-PCR. (A) IHH cells were incubated for 48 h with 50 μ M CDCA, CA, UDCA, DCA or vehicle (DMSO). (B) IHH cells were treated with increasing concentrations (as indicated) of CDCA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

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

2.7. Statistics

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

3. Results

3.1. Repression of PCSK9 by chenodeoxycholic acid in human hepatocytes

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

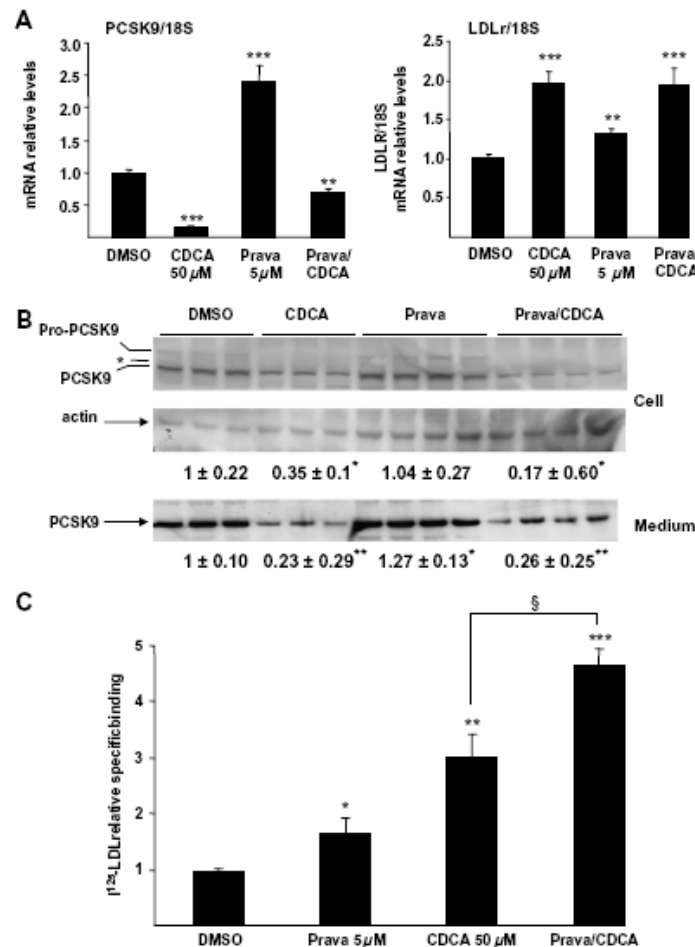


Fig. 2. CDCA amplifies the effect of pravastatin on LDLr activity. IHH cells were pre-treated with 50 μM CDCA or vehicle (DMSO) for 24 h. Then, 5 μM pravastatin was added, or not, to each condition for additional 24 h (DMSO, Prava, CDCA, CDCA+Prava). (A) PCSK9 and LDLr mRNA contents were measured by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

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

3.2. CDCA amplifies the effect of pravastatin on LDLr activity

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

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

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

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

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

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

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

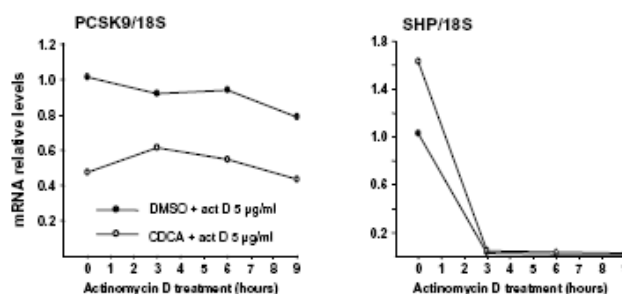


Fig. 3. CDCA regulates PCSK9 expression at the transcriptional level. The half-life of PCSK9 mRNA is unaffected by CDCA. IHH cells were cultured for 24 h in the presence or absence of $50 \mu\text{M}$ CDCA. Actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$) was then added to all dishes, and RNA was isolated after the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

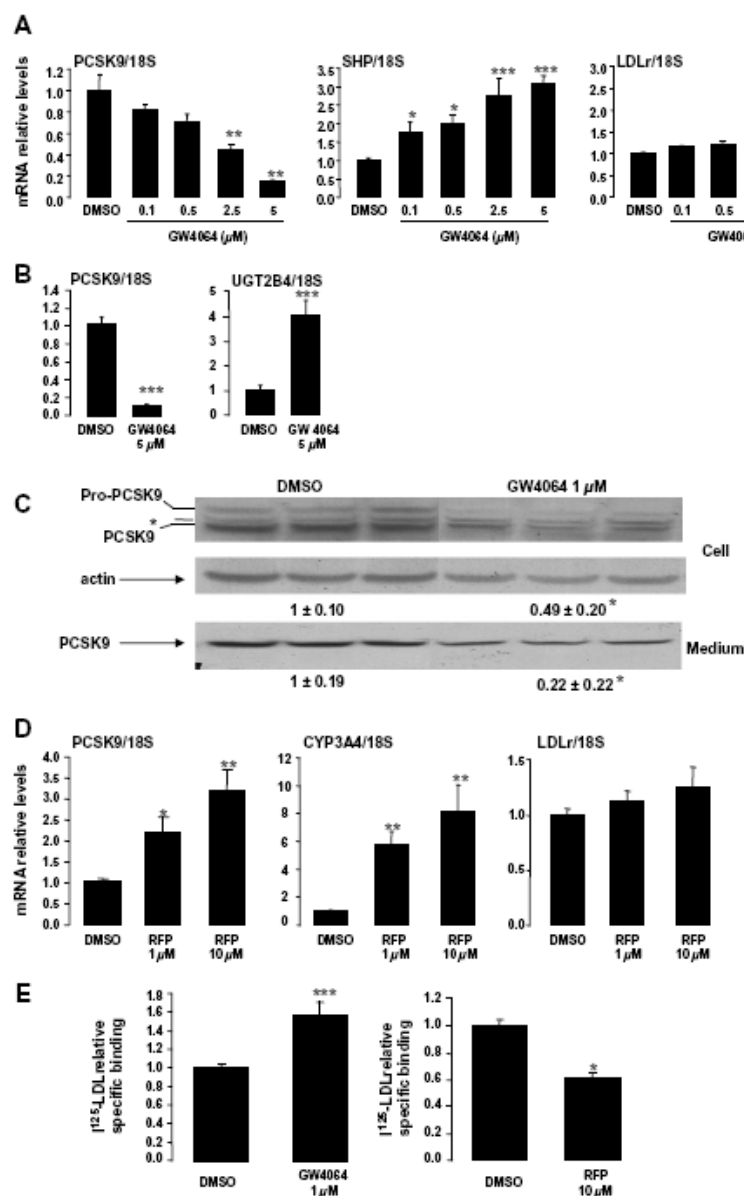


Fig. 4. FXR synthetic agonist GW 4064 represses PCSK9 expression and increases LDLr activity. IHH (A) and HepG2 (B) cells were treated with the indicated concentrations of the FXR synthetic agonist GW4064. PCSK9, SHP, LDLr and UGT2B4 mRNA contents were measured by Q-PCR as described in Fig. 1. Values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

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

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

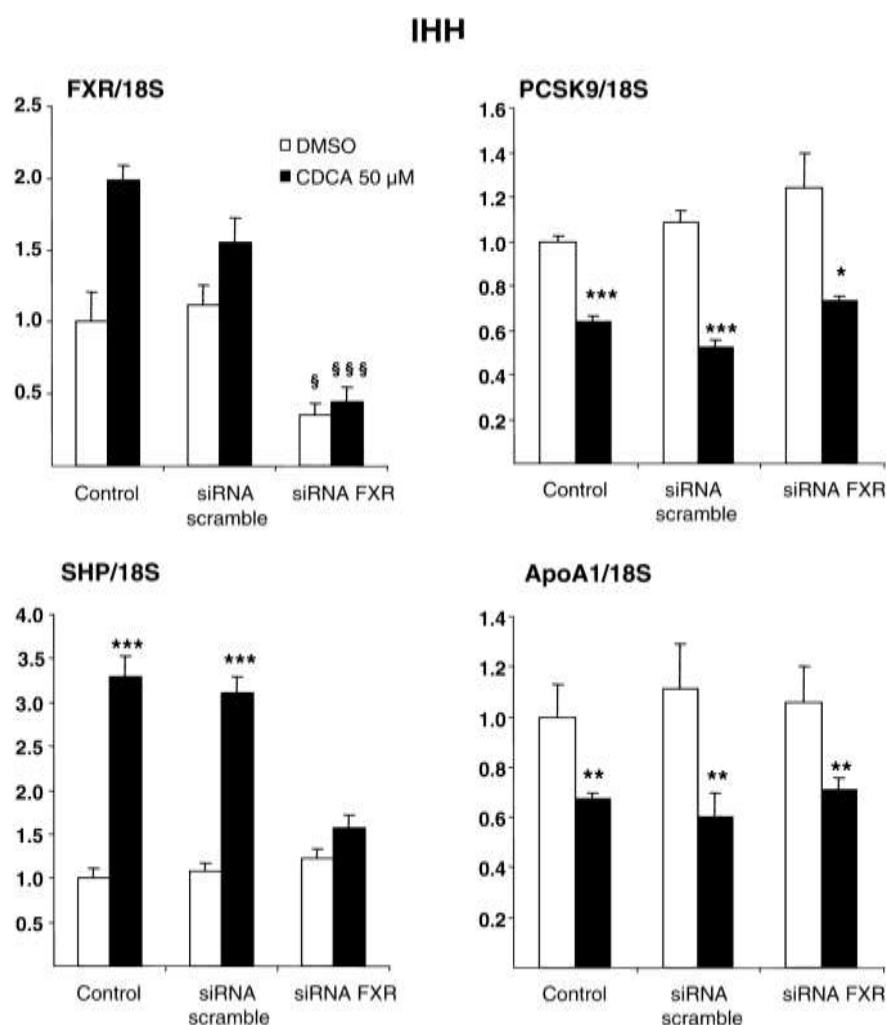
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2008.02.038.

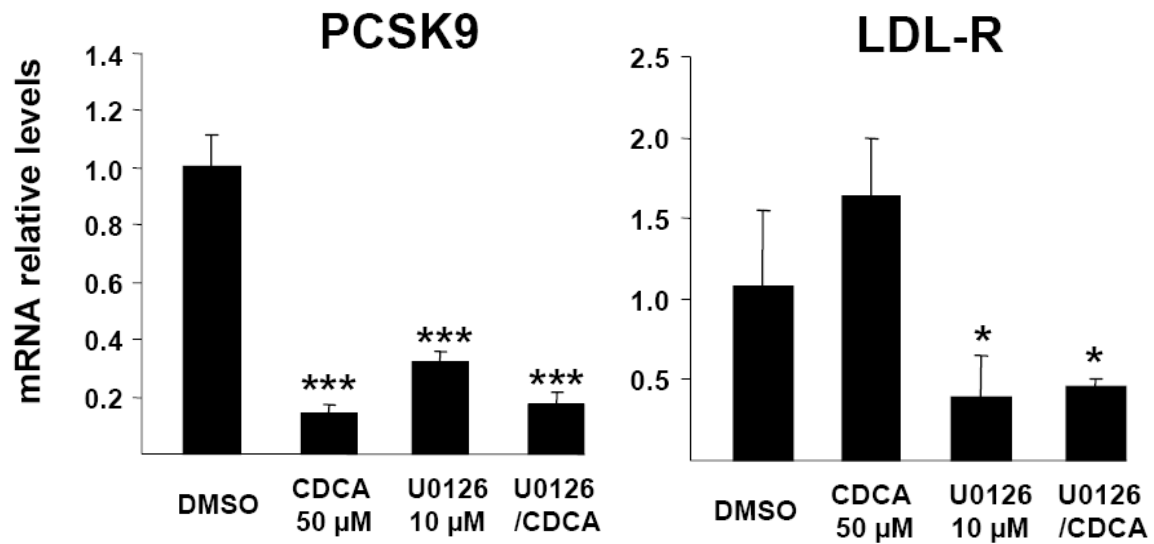
References

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

Appendix A. Supplementary data



Supplementary Fig. S1. IHH cells were infected with non-target or predesigned FXR SiRNA (Dharmacon, SMART Pool). Transfections were carried out with Dharmafect (Dharmacon) over 7 h, with a final concentration of 100 nM siRNA in six well-plates according to the manufacturer's recommended procedures. The cells were then incubated in fresh medium for 24 h, before being incubated with 50 μ M CDCA or vehicle for additional 24 h (DMSO). FXR, PCSK9, SHP and Apo-A1 mRNA contents were measured by Q-PCR. Values are normalized relative to 18S mRNA and are expressed (means $\pm$ S.E.M.) relative to those of vehicle-treated cells, which are set at 1. Statistically significant differences compared to vehicle-treated cells under each conditions ($^{\$ \$ \$}P < 0.001$; $^{\$ \$}P < 0.01$; and $^{\$}P < 0.05$) or to vehicle-treated cells infected with non target siRNA for FXR expression ($^{**}P < 0.001$) are indicated.



Supplementary Fig. S2. IHH cells were pre-treated, or not, for 1h with the specific MAP kinase ERK-1/2 inhibitor U0126 (10 μ M) before being incubated for 24h with 50 μ M CDCA or vehicle (DMSO) in the absence of serum. PCSK9 and LDLR mRNA contents were measured by Q-PCR. (Student's t-test: ***P < 0.001; **P < 0.01; and *P < 0.05) are indicated.

Supplementary data 2 : Données préliminaires du PHRC FXR/PCSK9

	ratio FXR / cyclophiline A versus		
	p =	r =	n =
PCSK9 plasmatique	NS (0,17)		32
Ratio ARN PCSK9 / cyclophiline A	<0,0001	0,734	36

Tableau I : Corrélation entre l'expression hépatique de FXR et PCSK9

	Concentration AB plasma versus		
	p =	r =	n =
PCSK9 plasmatique	NS (0.23)		45
Ratio ARN PCSK9 / cyclo	NS (0.43)		31
Ratio ARN FXR / cyclo	NS (0.99)		31

Tableau II : Corrélation entre les concentrations en AB et PCSK9

3) Discussion

C'est dans ce contexte de recherche de moyens d'inhibition de l'expression de PCSK9 que se sont déroulés mes premiers travaux de thèse. A ce jour, différentes voies de régulation de l'expression de PCSK9 sont connues. Ainsi PCSK9 est surexprimée par les statines et SREBP2 (Dubuc *et al.*, 2004), et par l'insuline et SREBP1c (Costet *et al.*, 2006). Des voies de répressions ont été identifiées comme les fibrates qui stimulent PPAR α (Kourimate *et al.*, 2008) et la berbérine (Cameron *et al.*, 2008c).

Ces travaux, menés essentiellement *in vitro* dans des hépatomes (HepG2) ou des hépatocytes humains immortalisés (IHH), montrent pour la première fois que l'activation pharmacologique de FXR par son agoniste naturel le plus puissant : le CDCA, ou par un agoniste synthétique spécifique : le GW 4064, réprime l'expression ARNm et protéique de PCSK9. La concentration de CDCA utilisée : 50 μ M, est une dose physiologique et correspond à l'EC50 du CDCA pour FXR. Cette concentration suffit à réprimer l'ARNm de PCSK9 de 60% en 48h de traitement dans les IHH. Les expériences de doses-réponses avec le CDCA et le GW 4064 attestent bien des effets répresseurs de ces molécules sur l'expression ARNm de PCSK9. Les autres ABs primaires testés, CA et UDCA, sont sans effet sur l'expression de PCSK9 alors que de façon surprenante l'AB secondaire DCA induit son expression. Le DCA étant l'agoniste naturel le plus puissant du récepteur membranaire aux ABs TGR5, ceci soulève l'intérêt de regarder son rôle sur l'expression de PCSK9. De plus, un traitement combiné de CDCA avec une statine, la pravastatine, empêche l'induction de l'expression de PCSK9 par la statine. *In vitro*, ceci est corrélé avec une augmentation de l'activité du LDLR en réponse au traitement par le CDCA et avec une potentialisation de l'effet statine sur l'activité du LDLR dans les IHH, alors que l'expression ARNm du LDLR n'est pas potentialisée par ce traitement combiné. Ceci est donc en faveur du rôle de PCSK9 sur la potentialisation de l'activité du LDLR en réponse à ce traitement combiné.

En effet, comme décrit précédemment dans la littérature, nous retrouvons une induction de l'expression ARNm du LDLR par le CDCA (+ 104% avec 48h de CDCA 50 μ M), précédemment attribuée à la stabilisation de l'ARNm du LDLR suite à l'activation des MAPKinases ERK 1/2 (Carlson *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 1994; Nakahara *et al.*, 2002). Ici, nous montrons également pour la première fois que l'activation de FXR par le GW 4064 stimule l'expression du LDLR et augmente l'activité de ce récepteur.

In vitro, le traitement d'hépatocytes primaires de souris par le CDCA ou de rats traités avec le GW4064 ne régule pas l'expression de PCSK9 malgré l'induction de gènes cibles de FXR comme SHP (données non publiées). Ainsi l'analyse de l'expression ARNm de PCSK9 entre des foies de souris sauvages et invalidées pour FXR ne montre aucun changement (données non publiées). La littérature nous donne l'exemple d'autres gènes régulés par FXR uniquement chez l'homme et non chez la souris comme PPAR α (Pineda, I *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2006), la lipase hépatique (Sirvent *et al.*, 2004b) ou le syndécan (Anisfeld *et al.*, 2003). Afin de vérifier par des approches moléculaires que FXR est bien à l'origine de la répression de PCSK9, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre FXR pour éteindre son expression. Malgré une diminution de l'expression ARNm de FXR de 80%, nous observons toujours une répression de PCSK9 par le CDCA alors que l'induction de SHP est inhibée. Seulement, l'analyse de gènes réprimés par FXR comme l'apo-AI est présente, ce qui suggère que l'activité trans-répressive de FXR est toujours fonctionnelle dans ces conditions (supplemental data). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'utilisation de shRNA anti-FXR afin de travailler sur des IHH sous-exprimant FXR de façon constitutive (données non publiées). Dans ces expériences, les niveaux d'expression protéique de FXR n'ont pas été vérifiés.

Nous avons alors testé et vérifié l'implication des autres voies de signalisation potentiellement induites par les acides biliaires, et notamment le CDCA, afin de les écarter. L'autre récepteur nucléaire pouvant être activé par de fortes concentrations d'ABs est PXR. L'induction de PXR par un agoniste spécifique, la rifampicine, provoque l'induction de PCSK9, ce qui exclu cette voie dans la répression de PCSK9 par le CDCA. Cette induction de l'ARNm de PCSK9 se traduit par une diminution de l'activité du LDLR, sans qu'aucun changement d'expression du LDLR n'ait lieu. Les ABs sont aussi capables d'activer les MAPK (Werneburg *et al.*, 2003; Dent *et al.*, 2005). Nous montrons qu'un traitement avec le U0126 à 10 μ M, un inhibiteur de la voie MEK / ERK, réprime l'expression de PCSK9 en condition normale et n'interfère pas avec la répression du CDCA (supplemental data). Ceci tend à suggérer que les MAPK pourraient activer l'expression de PCSK9. Enfin, les ABs peuvent activer le récepteur membranaire TGR5 (Watanabe *et al.*, 2006). Le DCA est l'agoniste le plus puissant de ce récepteur. Nos résultats montrent qu'un traitement au DCA active l'expression de PCSK9.

Pour démontrer que la répression de PCSK9 par le CDCA se joue au niveau de la transcription de ce gène et non sur la stabilité de l'ARNm, nous avons utilisé un inhibiteur de la transcription : l'actinomycine D, avec le traitement au CDCA. Ainsi, un prétraitement des

IIH avec du CDCA pendant 24h puis l'ajout de l'actinomycine D à 5 µg/ml dans le milieu de culture n'induit pas de différence quant à la stabilité de l'ARNm par rapport aux conditions non traitées avec le CDCA. Une information étonnante qui ressort de ces données est la durée de la demi-vie de l'ARNm de PCSK9 relativement longue puisqu'estimée à au moins 9h. Ces résultats sont confortés par l'étude de Cameron et collaborateurs parue après la publication de ces travaux. Dans l'objectif de vérifier si la berbérine altère la stabilité de l'ARNm de PCSK9 dans des cellules HepG2, les auteurs se sont placés dans les mêmes conditions que nous et constatent là aussi que l'ARNm de PCSK9 est stable sur 4h dans les conditions contrôles et traitées avec la berbérine (Cameron *et al.*, 2008c).

Cette régulation de PCSK9 par le CDCA est donc transcriptionnelle et est stimulée suite à l'activation du récepteur nucléaire FXR par le GW 4064. Les mécanismes de répression de PCSK9 par FXR peuvent être directs sur le promoteur du gène cible (exemple de l'apo-AI), ou indirects et nécessitent l'induction du récepteur nucléaire atypique SHP. SHP se lie à d'autres récepteurs nucléaires, tel que LXR ou le LRH-1, et les inhibe. C'est le cas de la répression par la voie FXR / SHP de SREBP1c ou de la CYP7A1 (pour revue : (Lefebvre *et al.*, 2009). Au cours de nos manipulations en vue de diminuer l'expression de FXR par les siRNA, nous avons observé que la répression de PCSK9 avait toujours lieu avec le traitement CDCA, alors que l'induction de SHP était complètement abolie dans ces conditions. Ceci suggère que la voie SHP dépendante n'est pas requise pour la répression de PCSK9 par FXR. L'analyse de recherche d'élément de réponse à FXR (FXRE) du promoteur à partir de la séquence nucléotidique publiée de 1.07 kb avec le logiciel Genomatix-Gene2Promoter a été effectuée. Cette analyse révèle l'existence d'une FXRE correspondant à une séquence répétée inversée espacée d'un nucléotide (IR1) : ₅₀₈AGGGCGCCGGCCT₋₄₉₆. Cependant, la comparaison avec les IR1 d'autres gènes cibles de FXR indique qu'une thymine très conservée à la position +4 est remplacée par une guanine.

Au cours des mes travaux sur l'étude de la régulation de PCSK9 par FXR, une étude clinique menée chez des patients traités par CDCA ou cholestyramine a exploré l'influence de ces traitements sur l'expression de plusieurs gènes hépatiques dont PCSK9. Des patients souffrant de lithiase biliaire ont été traités pendant 3 semaines avec de la cholestyramine, une résine séquestrant les ABs, ou avec CDCA. Puis des biopsies hépatiques ont été prélevées au cours d'une cholécystectomie. Les résultats montrent que le traitement à la cholestyramine induit une augmentation de l'expression ARNm du LDLR de 65% et de PCSK9 de 70% alors que le traitement au CDCA réprime le LDLR de 50% et est sans effet sur l'expression de PCSK9 (Nilsson *et al.*, 2007). Cette discordance entre nos résultats *in vitro* et ces résultats

obtenus chez l'homme ne concerne pas seulement PCSK9, il faut noter l'absence de régulation d'autres gènes hépatiques sous contrôle de FXR comme l'apo-AI ou l'apo-CIII avec le traitement CDCA dans cette étude. De plus, plusieurs études *in vitro* dont la nôtre avaient déjà montré que le CDCA induit l'expression du LDLR (Carlson *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 1994; Nakahara *et al.*, 2002), c'est pourtant l'inverse qui est observé *in vivo* chez l'homme. Concernant la régulation de PCSK9 par les ABs *in vitro*, des travaux conduits sur des cellules entérocytaires CaCo2 confirment nos résultats et montrent une diminution de l'expression de PCSK9 par les ABs (Leblond *et al.*, 2009). Ces résultats témoignent de la difficulté de comparer les données *in vitro* et *in vivo* tant les mécanismes intégratifs des différentes voies de signalisations activées par les ABs sont nombreux.

La nécessité de développer des modulateurs sélectifs des récepteurs nucléaires tel que FXR (SBARMs : selective bile acids receptor modulators) devient donc évidente à la vue de ces données. Chez l'homme, les traitements avec le CDCA réduisent la triglycéridémie mais ont tendance à augmenter le LDL-C plasmatique en clinique (Schoenfeld *et al.*, 1981). Récemment, le développement de l'agoniste de FXR WAY-362450 a montré des résultats bénéfiques tant sur la triglycéridémie que sur la baisse du LDL-C dans divers modèles de souris dyslipidémiques (Evans *et al.*, 2009) alors que l'administration de l'agoniste 6-EaCDCA dans une étude clinique chez des diabétiques de type 2 améliore la sensibilité à l'insuline mais augmente légèrement le LDL-C (abstract congrès ADA 2009 numéro 13-LB).

En résumé, ces travaux montrent : 1) que les agonistes de FXR répriment l'expression de PCSK9 et augmentent l'expression du LDLR, 2) en association avec les statines, les agonistes de FXR potentialisent l'augmentation de l'activité du LDLR, 3) les autres voies de signalisations activées par les ABs (PXR, MAPK, TGR5) semblent induire l'expression de PCSK9 et dénotent la difficulté à réconcilier les effets des ABs entre l'*in vitro* et l'*in vivo* chez l'homme.

L'absence de régulation de PCSK9 par FXR chez la souris a réduit notre champ d'investigation *in vivo* du rôle de FXR et PCSK9 dans les troubles lipidiques, notamment associés aux états d'insulinorésistance. Néanmoins, au laboratoire, un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) sous la direction du Dr Bertrand Cariou consiste à recueillir des biopsies hépatiques de patients obèses au cours d'une intervention de chirurgie bariatrique. Nous pouvons ainsi corréler les expressions ARNm de PCSK9 et FXR avec différents paramètres physiologiques comme le degré de stéatose hépatique ou d'insulinorésistance ainsi qu'à des marqueurs plasmatiques comme la glycémie, les mesures de TG, cholestérol, de PCSK9 circulant. Les résultats préliminaires en supplemental data numéro 2 montrent que

l'expression ARNm de FXR est corrélée positivement avec l'ARNm de PCSK9 dans le foie de ces patients ($r=0.74$, $p<0.0001$, $n=36$ patients). Aucune relation significative n'apparaît lorsque l'on compare les niveaux d'expression de FXR aux concentrations plasmatiques de PCSK9, de même que pour les concentrations plasmatiques en acides biliaires avec l'ARNm de PCSK9 et la protéine PCSK9 circulante.

II) Etude du rôle fonctionnel de PCSK9 dans le pancréas

1) Introduction

Durant la 2^{ème} partie de ma thèse, je me suis intéressé à un aspect particulier de PCSK9 qui consista à explorer la fonction de PCSK9 dans le pancréas endocrine. En dehors de son rôle dans le foie, peu d'études se sont penchées sur la fonction extra-hépatique de PCSK9. On peut citer les travaux conduits au laboratoire qui ont caractérisés PCSK9 dans l'intestin (Le May C. *et al.*, 2009) ou dans la littérature avec la surexpression rénale de PCSK9 (Luo *et al.*, 2008). Les travaux sur les souris invalidées pour PCSK9 spécifiquement dans le foie montrent que si le foie est l'organe majeur de production de la forme sécrétée de PCSK9 chez la souris, le phénotype hypocholestérolémiant de ce modèle KO tissu spécifique compte pour 2/3 du phénotype des KO systémiques (Zaid *et al.*, 2008). Ceci laisse donc envisager un rôle des organes extra-hépatiques dans la régulation du métabolisme du cholestérol par PCSK9. Ainsi, l'administration de la forme purifiée de PCSK9 chez la souris induit la dégradation du LDLR dans les poumons, les reins, le tissu adipeux, l'intestin (Schmidt *et al.*, 2008a). De façon surprenante, aucun effet n'est constaté dans les surrénales, qui expriment pourtant la plus grande quantité de LDLR proportionnellement aux autres organes (Luo *et al.*, 2008; Grefhorst *et al.*, 2008). Comprendre pourquoi PCSK9 régule le LDLR dans certains organes et pas dans d'autres permettrait de mieux appréhender les mécanismes moléculaires de l'action inhibitrice de PCSK9 sur le LDLR, notamment dans l'identification d'un 3^{ème} partenaire plausible (Zhang *et al.*, 2008a). Mes travaux dans le pancréas s'inscrivent dans cette problématique.

Le contexte qui nous a amené à travailler sur le rôle de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol dans le pancréas est le suivant. Récemment, un certain nombre de données de la littérature ont suggéré que la fonction insulino-sécrétrice des cellules β du pancréas serait influencée par la concentration en cholestérol intracellulaire. Ainsi, l'accumulation de cholestérol dans la cellule β pourrait altérer la sécrétion d'insuline alors que la déplétion en cholestérol potentialiserait la sécrétion d'insuline. Dans une première étude utilisant un modèle d'hypercholestérolémie : les souris invalidées pour l'apo-E (apo-E^{-/-}), les auteurs induisent uniquement une augmentation du cholestérol dans les îlots de Langerhans des souris apo-E^{-/-} par rapport aux îlots des souris sauvages (Hao *et al.*, 2007). Les tests de sécrétion d'insuline stimulés par le glucose *ex vivo* sur îlots isolés montrent une altération de la

sécrétion d'insuline dans les îlots de souris apo-E^{-/-}. Des résultats identiques sont retrouvés avec des lignées de cellules β de rat, les INS-1, traitées avec du cholestérol en culture. A l'inverse, la déplétion en cholestérol dans des îlots isolés de souris sauvages traitées par une statine, la mévastatine, ou par un agent chélateur du cholestérol : la méthyl- β -Cyclodextrine (M β CD) augmente la sécrétion d'insuline *ex vivo* et restaure la sécrétion d'insuline dans les îlots des souris hypercholestérolémiques (Hao *et al.*, 2007).

Une seconde étude a exploré le rôle du transporteur ABCA1 dans la cellule β (Brunham *et al.*, 2007). ABCA1 conduit l'efflux du cholestérol en excès de la cellule vers l'apo-AI des HDL et initie la première étape du retour inverse du cholestérol. L'invalidation de l'expression de ABCA1 spécifiquement dans la cellule β n'altère pas de façon systémique le métabolisme du cholestérol puisque ces souris ont des concentrations en cholestérol plasmatique identiques aux souris sauvages. Par contre, ces souris accumulent le cholestérol dans les îlots du pancréas. *In vivo*, ces souris développent une intolérance au glucose associée à des troubles de la sécrétion d'insuline. *Ex vivo*, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose est altérée dans les îlots isolés des souris invalidées pour ABCA1 par rapport aux îlots des souris sauvages (Brunham *et al.*, 2007).

Enfin, dans une troisième étude, la surexpression de SREBP2 spécifiquement dans la cellule β chez la souris provoque une accumulation de cholestérol dans la cellule. Les souris Tg- β -SREBP2 deviennent diabétiques avec une diminution de la sécrétion d'insuline (Ishikawa *et al.*, 2008).

Le LDLR, cible de PCSK9, est clairement exprimé et fonctionnel dans la cellule β (Cnop *et al.*, 2002) ;(Roehrich *et al.*, 2003). L'expression du LDLR est retrouvée dans des culture primaires d'îlots isolés chez l'homme, le rat, la souris et dans des lignées tumorales comme les MIN-6, les β TC3, les INS-1 et les HIT-15 (Cnop *et al.*, 2002) ;(Roehrich *et al.*, 2003;Abderrahmani *et al.*, 2007) ;(Okajima *et al.*, 2005). L'exposition aux LDL *in vitro* est toxique pour les cellules β . La mort par nécrose est constatée chez les cellules β isolées de rat (Cnop *et al.*, 2002) et par apoptose dans les îlots isolés de souris (Roehrich *et al.*, 2003).

Compte-tenu du fait que PCSK9 régule l'expression du LDLR dans le foie et divers autres organes, nous avons émis l'hypothèse que PCSK9 pourrait moduler la sécrétion d'insuline *via* son rôle sur l'expression du LDLR et donc sur la capture des LDL. Nous ne pouvons pas exclure non plus une influence de PCSK9 sur la fonction β -cellulaire en dehors de son rôle connu sur le LDLR. Dans la mesure où la liaison des LDL est toxique sur les cellules β et au vu des données de la littérature sur l'accumulation délétère du cholestérol dans

ces cellules ; ces travaux prennent un intérêt particulier pour discuter des effets putatifs des futures thérapies visant à augmenter l'expression et l'activité du LDLR en inhibant l'action de PCSK9. A l'heure actuelle, aucune donnée clinique ne lie les mutations gain de fonction ou perte de fonction de PCSK9 à l'incidence du diabète chez l'homme. Seule les dernières études cliniques menées sur de larges populations montrent une corrélation positive entre les taux circulants de PCSK9 et la glycémie (Brunham *et al.*, 2007;Lakoski *et al.*, 2009).

Ces travaux ont pour but de caractériser l'expression de PCSK9 dans le pancréas chez la souris, de vérifier la fonction régulatrice de PCSK9 sur le LDLR dans cet organe et d'explorer les conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie du glucose de l'invalidation de PCSK9 chez la souris. Pour cela, j'ai procédé à l'isolement d'îlots de Langerhans de souris sauvages et invalidées pour PCSK9 sur lesquelles j'ai pratiqué les tests de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS). *In vivo*, j'ai mené des tests de tolérance au glucose et de sécrétion d'insuline. Un partenariat avec le laboratoire de Francois Pattou à Lille nous a permis d'avoir accès à des îlots isolés humains et aux techniques de marquage immunohistochimique des coupes de pancréas humains et murins.

2) **Article II** : PCSK9 modulates the expression of LDL receptor in pancreatic islets without affecting insulin secretion

PCSK9 modulates the expression of LDL receptor in pancreatic islets without affecting insulin secretion

Cédric Langhi^{1,2*}, Cédric Le May^{1,2*}, Valéry Gmyr⁴, Brigitte Vandewalle⁴, Sanae Kourimate^{1,2}, Julie Kerr-Conte⁴, Michel Krempf^{1,2,3}, François Pattou⁴, Philippe Costet^{1,2,3} and Bertrand Cariou^{1,2,3}

¹ INSERM, U915, Nantes F-44000, France

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

³ CHU de Nantes, Clinique d' Endocrinologie, Institut du Thorax, Nantes F-44000, France

⁴ INSERM U859, Thérapie Cellulaire du Diabète, Faculté de Médecine, Lille F-59000, France

* These authors contributed equally to this work

1 **ABSTRACT**

2 **Aim:** PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9) is a proprotein convertase that plays a
3 key role in cholesterol homeostasis by decreasing hepatic low-density lipoprotein receptor (LDLR)
4 protein expression. Since recent data underlined a link between cholesterol homeostasis and beta-cell
5 function, we investigated the function of PCSK9 in pancreatic islets.

6 **Methods:** PCSK9 expression was analysed in human and mice pancreatic islets by Q-PCR and
7 immunohistochemistry. LDLR expression and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) were
8 assessed on isolated islets from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice, as well as after treatment with human
9 recombinant PCSK9. *In vivo* glucose homeostasis was investigated in both genotypes under basal
10 conditions and following streptozotocin treatment.

11 **Results:** Immunohistochemistry analysis showed that PCSK9 co-localized specifically with
12 somatostatin in human pancreatic delta-cells, with no expression in alpha- and beta-cells. PCSK9-
13 deficiency did not influence somatostatin secretion. PCSK9 was not found to be secreted from human
14 isolated islets. PCSK9-deficiency led to a 200% increase in LDLR protein content in mouse isolated
15 islets, mainly in the beta-cells. Conversely, incubation of pancreatic islets with recombinant PCSK9
16 almost abolished LDLR expression. PCSK9-deficiency did not alter cholesterol content in mouse
17 islets. GSIS was not altered by PCSK9-deficiency in mouse isolated islets, even in presence of high
18 LDL concentrations. Finally, *in vivo* glucose tolerance was similar in PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice.

19 **Conclusions:** PCSK9 was specifically expressed in pancreatic delta-cell and was able to regulate
20 LDLR expression in pancreatic islet. However, PCSK9-deficiency did not influence intracellular
21 cholesterol content and insulin secretion in mice.

22

1 INTRODUCTION

2 PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9), also known as NARC-1, is the ninth
3 member of the proprotein convertase (PC) family (1). Recent studies have shown that PCSK9 plays a
4 key role in the regulation of cholesterol homeostasis (for review see (2)). PCSK9 is secreted by the
5 liver and acts as a natural inhibitor of the low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) pathway.
6 PCSK9 promotes the down-regulation of hepatic LDLR in a post-transcriptional manner. Secreted
7 PCSK9 binds to the epidermal growth factor-like repeat A (EGF-A) of the extra-cellular domain of the
8 LDLR and interferes with its recycling to the plasma membrane, thereby targeting the LDLR to
9 endosome/lysosomes (3;4).

10 In humans, “gain-of-function” *Pcsk9* mutations are associated to autosomal dominant
11 hypercholesterolemia and premature atherosclerosis (5). In contrast, “loss-of-function” *Pcsk9*
12 mutations lead to low levels of LDL-cholesterol (LDL-C) and confer protection against cardio-
13 vascular disease (6). Accordingly, overexpression of *Pcsk9* in mice results in a marked decrease in
14 hepatic LDLR and subsequent increase in serum LDL-C (7;8). In contrast, *Pcsk9*-deficient (*Pcsk9*^{-/-})
15 mice exhibit high level of hepatic LDLR protein, leading to decreased plasma LDL-C (9).

16 Some positive and negative regulatory pathways for PCSK9 have been identified. Hepatic
17 PCSK9 expression is up-regulated by statin (10), an hypocholesterolemic drug, and also by insulin
18 (11). These regulations involve the transcription factors SREBP2 and SREBP1c, respectively. It has
19 been demonstrated that PCSK9 is down-regulated by the farnesoid X receptor (12) and peroxisome
20 proliferator activated receptor alpha (PPAR α) (13;14), which are respectively activated by bile acids
21 and fibrates.

22 The LDLR is expressed in pancreatic β -cell in human, rat (15) and mouse (16). As a functional
23 consequence, atherogenic lipoproteins like VLDL and LDL are toxic for β -cells because they induce
24 necrosis (17) or apoptosis (16). Recently, some studies have suggested that cholesterol homeostasis in
25 pancreatic β -cell play a crucial role in β -cell function and thus in glucose homeostasis. Mice lacking
26 the ATP Binding Cassette transporter A1 (*Abca1*) specifically in β -cell displayed cholesterol
27 accumulation in pancreatic islet due to defective cholesterol efflux, leading to impaired insulin
28 secretion and glucose intolerance (18). Another study demonstrated that β -cell function was altered by

1 the variation of intra-cellular cholesterol pool (19). In isolated islets, high cholesterol content was
2 associated with reduced glucose stimulating insulin secretion (GSIS), while cholesterol depletion
3 induced by methyl- β -cyclodextrin or statin treatments enhanced GSIS in isolated islets (19).

4 To date, no study has addressed the presence and functional significance of PCSK9 in the
5 endocrine pancreas. However, hepatic PCSK9 expression was found to be altered in rodent model of
6 diabetes (20). Very recently, it has been demonstrated that plasma PCSK9 levels were positively
7 correlated with fasting blood glucose in human (21). In view of these data, it can be suggested that
8 PCSK9 may alter cholesterol homeostasis and beta-cell function in pancreatic islets. Thus, we
9 investigated the expression and function of PCSK9 both in mouse and human isolated islets, as well as
10 its functional role in glucose homeostasis *in vivo* in mice.

11

12

1 **METHODS**

2 **Hormone immunoassays.** Insulin content and secretion were assessed in mice by radioimmunoassay
3 (RIA) using a commercial kit (Linco Research, St Charles, Missouri USA). Plasma insulin levels in
4 mice were measured by ELISA using mouse insulin as a standard (Crystal Chem Inc., Chicago,
5 Illinois, USA). Secreted insulin and insulin content of human islets were assessed with an
6 immunoradiometric assay (Bi-Insulin IRMA, SANOFI Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette,
7 France). Somatostatin secretion of isolated islets was measured using an EIA kit after a lyophilization
8 step (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, California USA).

9 **Lipoprotein preparation.** Human LDL (d=1.019–1.063 g/ml) were isolated by ultracentrifugation
10 from human plasma of healthy volunteers after an overnight fast, as previously described (12).

11 **Animals.** *Pcsk9*^{-/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Maine, USA) and interbred to
12 produce *Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{+/-} littermates. They were genotyped as described elsewhere (22). Animals
13 had free access to food and water under a 12-hour light/12-hour dark cycle in a temperature-controlled
14 environment. For the multiple low doses of streptozotocin (STZ) model, mice aged 8–10 weeks were
15 injected i.p. for 5 consecutive days with STZ (Sigma, France) dissolved in 50 mM citrate buffer, pH
16 4.5, at a concentration of 50 mg/kg body weight. For the single high-dose model, STZ was injected i.p.
17 at a concentration of 150 mg/kg body weight. For glucose tolerance tests, tail blood samples were
18 collected from 6h-fasted mice after i.p. injection or oral gavage of 2 g/kg glucose. For insulin
19 tolerance tests, blood samples were obtained at 0, 30, 60, 90, 120 and 150 minutes after i.p. injection
20 of 0.75 U/kg insulin (Actrapid, Novo Nordisk, France). Plasma glucose levels were measured using
21 an automatic glucose monitor (Accu-check Active, Roche, Germany). *In vivo* insulin secretion test
22 were performed by i.p. injection of glucose (2 g/kg) after an overnight fast. Blood samples were
23 obtained at 0, 2, 5, 15 and 30 minutes, and plasma insulin levels were measured by ELISA, as
24 described. All animal studies were approved by the Unité de Thérapeutique Expérimentale (Animal
25 Facility agreement N° BP44015).

26 **Human and mouse islets isolation.** Human pancreases were harvested from adult brain-dead donors
27 in accordance with French Regulations and with the local Institutional Ethical Committee. Pancreatic
28 islets were isolated after digestion of the tissue with Liberase® (Roche Diagnostics, Meylan, France)

1 according to the method of Ricordi *et al* (23). Semi-purification was achieved with continuous density
2 gradients using a COBE 2991 cell separator. Islet number was determined on samples of each
3 preparation after dithizone staining and expressed as equivalent number of islets (IE).

4 Pancreatic islets from 8 to 12-week-old male PCSK9^{-/-} or PCSK9^{+/+} mice were isolated by collagenase
5 type V digestion (Sigma, France), as previously described (24). After several washes with HBSS,
6 islets were hand-picked, and cultured in RPMI 1640 medium containing 11 mM glucose supplemented
7 with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

8 For PCSK9 incubation experiments, isolated islets were cultured for 6h in presence of 5 or 10 µg/ml
9 of human recombinant purified PCSK9 (generous gift from Dr Nan Ying G) with 5% LPDS RPMI.

10 For LDL treatments, islets were maintained in 5% LPDS RPMI with 6.4 mM human LDL for 24h.

11 **Cholesterol assay in islets.** Cholesterol content was quantified in isolated mouse islets with a
12 fluorometric method using an enzyme-coupled reaction provided by the Amplex Red Cholesterol
13 Assay kit (Molecular probes), as detailed in the *Supplemental Data*.

14 **Human and mouse glucose-stimulated insulin secretion measurements.** Human isolated pancreatic
15 islet insulin content was measured by immunoradiometric assay after insulin extraction of islets (3X40
16 IE per condition) with 2M acetic acid containing 0.2% BSA. To determine acute insulin release in
17 response to glucose stimulation, islets (5X40 IE per condition) were preincubated for 30 min in RPMI
18 medium containing 10% newborn calf serum and 2.8 mM glucose and subjected to two successive 1h
19 incubations with 2.8 (basal) and 20 (stimulation) mM glucose. At the end of each incubation period,
20 medium was collected and insulin measured. The stimulation index was defined as the ratio of
21 stimulated over basal insulin secretion. For static incubations of mouse islets, groups of 10 islets were
22 preincubated in 12-well plates 2 x 30 minutes at 37°C in 1 ml Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer
23 containing 0.1% BSA and 2.8 mM glucose followed by 1h incubation. The last incubation was in the
24 same buffer supplemented with 25 mM glucose. Islets were lysed for protein normalisation and insulin
25 was measured in the 1 ml KRB buffer 2.8 mM and 25 mM glucose by using insulin RIA kit, as
26 described.

27 **Immunohistochemistry.** Human and mouse pancreases were fixed overnight at 4°C in 4%
28 paraformaldehyde (PAF) solution and then embedded in paraffin and sectioned (5 µm) before

1 processing. In some experiments, cell pellets were included in biological glue (Tissucol®, Roche),
2 fixed in 4 % PAF and further processed for paraffin embedding. The *Supplemental Table 1* lists
3 antibody specificities and dilutions. Deparaffinized sections were incubated with specific antibodies
4 for 2h at room temperature (PCSK9, LDLR) followed by an overnight incubation at 4 °C (insulin,
5 glucagon, somatostatin). Antibodies were revealed with streptavidin-biotin FITC and Alexa fluor 594
6 (Molecular probes, In Vitrogen). Nuclei were counterstained with DAPI.

7 **Western Blot.** Protein extraction and western blots were performed as described elsewhere (25).
8 Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (GE Healthcare, France) and quantified
9 with ImageJ software. Secreted PCSK9 was measured in the medium of cultured isolated human islets
10 and immortalized human hepatocytes (IHH), as described in the supplemental data. The nature and
11 origin of the antibodies are detailed in the *Supplemental Data*.

12 **Real Time quantitative PCR.** Human (3000 IE per condition) or mice islets were lysed in a 1% β-
13 mercaptoethanol-containing buffer obtained from an RNA extraction kit (Macherey Nagel, Hoerd, France).
14 Real time quantitative PCR (Q-PCR) was performed as previously described (26). The
15 primers used are detailed in the *Supplemental Data*.

16 **Statistical analysis.** Each experiment is representative of at least two independent experiments with a
17 minimum of triplicates per condition. All values are reported as means ± SEM. Statistical significance
18 was analyzed using a Student's unpaired *t* test. The values of $p < 0.05$ were considered significant.

1 RESULTS

2 PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells from human islets

3 As a first approach, we verified the expression of PCSK9 mRNA in isolated pancreatic islets
4 from wild-type mice. Real-time Q-PCR analysis showed that PCSK9 expression in mouse isolated
5 islets was about 30% of the quantity detected in mouse liver (Fig. 1A). PCSK9 was also expressed in
6 the mouse insulinoma cell line MIN6 at a significant level ($C_t = 22.21 \pm 1.47$), but not in the rat
7 insulinoma cell line INS-1 ($C_t = 31.11 \pm 0.66$). PCSK9 mRNA expression was detected in human
8 islets from pancreases donors (n=3) at a similar level than that observed in the IHH cell line. In
9 contrast, PCSK9 was not expressed in the human pancreatic carcinoma cell line Panc1 (Fig. 1B).

10 Immunostaining of paraffin embedded human pancreas demonstrated that PCSK9 co-localized
11 with somatostatin expressing delta-cells. In contrast, neither co-localization of PCSK9 with insulin
12 expressing beta-cell nor with glucagon-expressing alpha-cells was observed (Fig. 1C). In addition, no
13 PCSK9 immunostaining was detected in exocrine tissue. Unfortunately, immunohistochemistry
14 analysis failed to detect PCSK9 in mouse pancreas section due to a non-specific binding with all the
15 antibodies we tested (*data not shown*).

16 In order to assess whether PCSK9 can modulate somatostatin secretion, pancreatic islets were
17 isolated from *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice and somatostatin secretion was measured *ex-vivo*. As shown
18 in Fig. 1C, *Pcsk9*-deficiency did not alter somatostatin secretion from fresh isolated islets. In
19 accordance with this observation, gross examination revealed that immunostaining for somatostatin
20 was similar in pancreas from *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice (Fig 1D).

21 PCSK9 reduces LDLR in mouse and human pancreatic islets.

22 Since PCSK9 is expressed in pancreatic islets, we assessed whether PCSK9 can regulate
23 LDLR expression in this organ. Immunostaining pattern of LDLR clearly showed an increased LDLR
24 content within islets from *Pcsk9^{-/-}* mice when compared to *Pcsk9^{+/+}* mice (Fig. 2A).
25 Coimmunostaining experiments demonstrated that LDLR overexpression mainly occurred in beta-cells
26 from *Pcsk9^{-/-}* mice (Fig. 2B), with only weak staining in both alpha- (Fig. 2C) and delta-cells (Fig.
27 2D). Accordingly, western blot analysis performed with freshly isolated islets showed that LDLR
28 protein content is increased by near 200% in *Pcsk9^{-/-}* mice (Fig. 3A, left part). To further determine

1 **PCSK9-deficiency does not alter *in vivo* glucose homeostasis in mice.**

2 To determine whether *Pcsk9*-deficiency can alter *in vivo* glucose homeostasis, an oral glucose
3 tolerance test (OGTT) was performed in *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice. *Pcsk9^{-/-}* mice had normal glucose
4 tolerance at 10 weeks of age (Fig. 5A). Similar results were obtained when we performed an intra-
5 peritoneal glucose tolerance test (IPGTT) (*data not shown*). Insulin sensitivity was assessed by an
6 insulin tolerance test (ITT) in *Pcsk9^{-/-}* mice, and was indistinguishable from that in *Pcsk9^{+/+}* mice (Fig.
7 5B). To further assess the beta-cell function under stressed condition, we generated a model of
8 multiple low doses of STZ-induced diabetes in *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice. After the last injection,
9 random fed blood glucose levels raised in a similar manner in both genotypes (Fig. 5C). In addition,
10 there was no difference in body weight during the follow-up (Fig. 5D). IPGTT were performed before
11 (Fig. 5E) and 20 days after the last injection of STZ (Fig. 5F). *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice became
12 equally glucose intolerant following STZ injections. In order to assess insulin secretion *in vivo*, we
13 measured first-phase insulin response 2 minutes after a glucose challenge (2 g/kg body weight). Under
14 basal condition, plasma insulin levels were increased similarly in *Pcsk9^{+/+}* and *Pcsk9^{-/-}* mice (Fig. 5G).
15 The two phases of insulin secretion following the glucose challenge were abolished after STZ
16 injections in a similar manner in both genotypes (Fig. 5H).

17 Finally, we used a model of drastic insulinopenic diabetes following a unique high dose of
18 STZ (150 mg/kg body weight). Seven days after the injection, the kinetics of the onset of diabetes
19 appeared to be delayed in *Pcsk9^{-/-}* compared to *Pcsk9^{+/+}* mice. However, a similar number of mice
20 became diabetic in each genotype at the end of the follow-up (Fig. 6A). Total pancreatic insulin
21 content (PIC) was measured 7 days after high dose STZ injection, and no difference was identified in
22 PIC/blood glucose between *Pcsk9^{+/+}* (0.02 ± 0.01) and *Pcsk9^{-/-}* (0.01 ± 0.005) mice (Fig. 6B).

23 Altogether, these results indicate that *Pcsk9*-deficiency did not alter glucose homeostasis
24 under basal conditions and after STZ treatment in mice.

25

1 DISCUSSION

2 During the last 5 years PCSK9 has emerged as an important target for the treatment of
3 hypercholesterolemia, and PCSK9 inhibition is thought to be a promising way to achieve low-levels of
4 LDL-C in combination with statins (2). The best characterized function of PCSK9 is to down-regulate
5 LDLR expression in liver. PCSK9 is secreted by the hepatocytes and circulates in the blood stream at
6 hormonal concentrations (i.e: 33-2988ng/ml) (21;27;28). Both parabiosis experiments and *in vivo*
7 infusion of physiological concentrations of human recombinant PCSK9 clearly demonstrate that
8 circulating PCSK9 controls hepatic LDLR expression (28;29). In addition, circulating PCSK9 also
9 reduces LDLR in extra-hepatic tissues like adipose tissue, lung, kidney and intestine (30). In contrast,
10 PCSK9 infusion has no effect on LDLR expression in adrenals (29).

11 For the first time, we demonstrate that PCSK9 is also able to modulate LDLR expression in
12 both human and mice pancreatic islets. As reported before in other organs such as the liver (9) and the
13 small intestine(31), LDLR expression was increased in pancreas from *Pcsk9*^{-/-} mice compared to wild-
14 type mice. Conversely, the incubation of both mouse and human isolated islets with recombinant
15 PCSK9 abolished LDLR expression. Since we found that PCSK9 was expressed in human pancreatic
16 delta-cells, we assessed whether PCSK9 could be secreted locally, thereby acting in a paracrine
17 manner in the islets. However, we failed to detect secreted PCSK9 in the culture medium from human
18 isolated islets, although we can not exclude that PCSK9 secreted by delta-cells could be internalized
19 by the surrounding LDLR in beta-cells. Moreover, the up-regulation of LDLR expression in isolated
20 islets from *Pcsk9*^{-/-} mice was not maintained over the time *ex-vivo*. Altogether, these results suggest
21 that PCSK9 modulates LDLR expression in an endocrine rather than in a paracrine manner in the islets.

22 Recent studies have focused on the potential relationship between cholesterol homeostasis and
23 insulin secretion, with a deleterious effect of high intra-cellular cholesterol content on GSIS (32). The
24 most convincing data arose from the phenotypic characterization of the mice with selective
25 inactivation of *Abca1* in beta-cells (18). Despite normal plasma cholesterol levels, these mice have
26 elevated total cholesterol content in islets due to impaired cholesterol efflux. Of functional relevance,
27 these mice exhibited decreased GSIS and impaired glucose tolerance *in vivo*. Considering the increase
28 of LDLR expression in *Pcsk9*^{-/-} mice, we determined whether *Pcsk9*-deficiency was associated with

1 defective GSIS. Importantly, there was no alteration of the GSIS in isolated islets of *Pcsk9*^{-/-} mice, even
2 in the presence of high LDL concentrations. Conversely, the incubation of recombinant PCSK9 did
3 not alter the GSIS in human isolated islets. This lack of deleterious effect of *Pcsk9*-deficiency on
4 insulin secretion was probably linked to the absence of intra-cellular cholesterol accumulation in the
5 islets. This apparent discrepancy between the increased LDLR expression of freshly isolated islets and
6 their cholesterol content remains unclear. It can not be excluded that *Pcsk9*-deficiency may increase
7 cholesterol efflux from the islets. Moreover, consequences of the LDLR up-regulation in the islets
8 might be counteracted by lower circulating LDL-C levels in *Pcsk9*^{-/-} mice. Thus, pancreas-specific
9 knockout *Pcsk9*^{-/-} mice, that would be expected to have normal cholesterolemia, will certainly help to
10 unravel the function of PCSK9 in the pancreatic islet. Based on PCSK9 expression data in the human
11 islet, a delta-cell specific deficient mouse should be anticipated. However, to our knowledge, such a
12 tissue-specific mouse model has not been described in the literature.

13 One striking data of this study is the observation that PCSK9 is specifically expressed in
14 human pancreatic delta-cells, with neither expression in the beta-cells nor in the alpha-cells.
15 Unfortunately, we failed to perform similar immunohistochemistry analysis in mouse, due to the lack
16 of specific antibody. Since PCSK9 mRNA was detected in mouse insulinoma cell line, such as MIN6
17 and β -TC3 (1), we can not exclude that PCSK9 is expressed in mouse beta-cells. However, PCSK9
18 was not detected in the rat insulinoma cell line INS-1. On the other hand, insulinoma cell lines should
19 be used cautiously since PCSK9 is involved in apoptosis and cell proliferation (1;33). To avoid this
20 bias, we used primary isolated islets to conduct our functional experiments. As highlighted recently
21 with the characterization of somatostatin-deficient mice, somatostatin exerts a paracrine regulatory
22 action on the islet function (34). Somatostatin inhibits both insulin and glucagon secretion, thereby
23 facilitating the islet response to cholinergic activation (34). The functional role of PCSK9 in the delta-
24 cell remains unknown. In accordance with the neutral effect of PCSK9 on GSIS, *Pcsk9*-deficiency did
25 not alter the secretion of somatostatin in isolated islets. Thus, additional studies are needed to decipher
26 PCSK9 function in delta-cells. It would be also of interest to determine whether PCSK9 is co-
27 expressed with somatostatin in neurons and in the intestinal neuroendocrine cells.

1 To further assess whether PCSK9 is involved in the control of whole-body glucose
2 homeostasis, we performed dynamic tests in *Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{+/+} mice. In accordance with a neutral
3 effect of PCSK9 on glucose homeostasis, both the glucose and insulin tolerance were similar in both
4 genotypes. To investigate a potential role of PCSK9 in beta-cell survival and regeneration, we
5 performed additional streptozotocin experiments in *Pcsk9*^{-/-} and *Pcsk9*^{+/+} mice. The onset of diabetes
6 and the *in vivo* insulin secretion were similar in both genotypes following streptozotocin treatment,
7 excluding a role for PCSK9 in beta-cell survival.

8 In summary, we demonstrate for the first time that PCSK9 is specifically expressed in delta-
9 cells of human pancreas. While the precise function of PCSK9 in the delta-cell remains unknown,
10 exogenous PCSK9 is able to reduce LDLR content in the whole islet. However, PCSK9 does not alter
11 beta-cell function both *ex-vivo* and *in vivo*. Taken together, these results suggest, at least in mice, that
12 the pharmacological inhibition of PCSK9 will be expected to be not deleterious for glucose
13 homeostasis.

14

1 **ACKNOWLEDGMENTS**

2 We gratefully acknowledge Dr Philippe Lefebvre (INSERM U545) for providing us the
3 MIN6, INS-1 and Panc1 cell lines. We are indebted to Dr Nan Ying (Merck, Rahway) for
4 giving us human recombinant PCSK9.
5

Reference List

1. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M 2003 The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:928-933
2. Costet P, Krempf M, Cariou B 2008 PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci* 33:426-434
3. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, Deisenhofer J 2008 Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1820-1825
4. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH 2007 Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282:18602-18612
5. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C 2003 Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34:154-156
6. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH 2006 Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 354:1264-1272
7. Lallanne F, Lambert G, Amar MJ, Chetiveaux M, Zair Y, Jarnoux AL, Ouguerram K, Friburg J, Seidah NG, Brewer HB, Jr., Krempf M, Costet P 2005 Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res* 46:1312-1319
8. Maxwell KN, Breslow JL 2004 Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7100-7105
9. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, Horton JD 2005 Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5374-5379
10. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A 2004 Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1454-1459
11. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lallanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, Staels B, Krempf M 2006 Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281:6211-6218

- 1 12. **Langhi C, Le MC, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B**
2 2008 Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human
3 hepatocytes. *FEBS Lett* 582:949-955
- 4 13. **Kourimate S, Le MC, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, Nguyen P,**
5 **Krempf M, Cariou B, Costet P** 2008 Dual Mechanisms for the Fibrate-mediated
6 Repression of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *J Biol Chem* 283:9666-
7 9673
- 8 14. **Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, Krempf M,**
9 **Costet P** 2006 Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein
10 convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein
11 hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology* 147:4985-4995
- 12 15. **Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk CF, Hannaert JC, Van Berkel TJ,**
13 **Pipeleers DG** 1997 Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet
14 beta cells. *Endocrinology* 138:4064-4068
- 15 16. **Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, Bideau M, Capponi**
16 **A, Nicod P, Haefliger JA, Waeber G** 2003 Insulin-secreting beta-cell dysfunction
17 induced by human lipoproteins. *J Biol Chem* 278:18368-18375
- 18 17. **Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG** 2002 Low density lipoprotein
19 can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification.
20 *Endocrinology* 143:3449-3453
- 21 18. **Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ,**
22 **Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR** 2007 Beta-cell
23 ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to
24 thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13:340-347
- 25 19. **Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW** 2007 Direct effect of
26 cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction.
27 *Diabetes* 56:2328-2338
- 28 20. **Niesen M, Bedi M, Lopez D** 2008 Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression
29 in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 470:111-115
- 30 21. **Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH** 2009 Plasma levels of
31 PCSK9 in a large multiethnic population. *J Clin Endocrinol Metab*
- 32 22. **Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE,**
33 **Moon YA, Horton JD** 2005 Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to
34 statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5374-5379
- 35 23. **Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW** 1988 Automated method for
36 isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420
- 37 24. **Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-**
38 **Jarvis F** 2006 Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent
39 insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9232-9237

- 1 25. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lallanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A,
2 Staels B, Krempf M 2006 Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status
3 via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281:6211-
4 6218
- 5 26. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lallanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A,
6 Staels B, Krempf M 2006 Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status
7 via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281:6211-
8 6218
- 9 27. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner
10 EM, Konrad RJ 2007 Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated
11 directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem* 53:1814-1819
- 12 28. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson
13 NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD 2006 Secreted PCSK9 decreases the number of
14 LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 116:2995-
15 3005
- 16 29. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD 2008 Plasma PCSK9 preferentially
17 reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res* 49:1303-1311
- 18 30. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE,
19 Konrad RJ, Cao G 2008 Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces
20 both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem*
21 *Biophys Res Commun* 370:634-640
- 22 31. Le MC, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, Collet X,
23 Kuipers F, Krempf M, Cariou B, Costet P 2009 Proprotein convertase subtilisin kexin
24 type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb*
25 *Vasc Biol* 29:684-690
- 26 32. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR 2008 Cholesterol in islet
27 dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 118:403-408
- 28 33. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J,
29 Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, Prat A 2008 Proprotein
30 convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein
31 receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 48:646-
32 654
- 33 34. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ,
34 Christie MR, Persaud SJ, Jones PM 2009 Somatostatin secreted by islet delta-cells
35 fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58:403-411

36
37

1 **FIGURE LEGENDS**

2
3 **Figure 1: PCSK9 is expressed in human pancreatic delta-cells.** (A) PCSK9 mRNAs levels were
4 measured by Q-PCR analysis in liver and isolated pancreatic islets from C57BL/6J mice. Values are
5 normalized to cyclophilin and are expressed relatively to those of liver mice arbitrarily set at 1. (B)
6 PCSK9 mRNAs levels were measured by Q-PCR analysis in Immortalized Human Hepatocytes (IHH),
7 human isolated pancreatic islets and Panc1 pancreatic carcinoma cell line. Values are normalized to β
8 actin and are expressed relatively to those of IHH arbitrarily set at 1. (C) Immunostaining and
9 confocal imaging of representative pancreatic islet from human lean donors showed co-localization of
10 PCSK9 (red) and somatostatin expressing delta-cells (green, merged in yellow). No co-staining of
11 insulin expressing beta-cells (green) or glucagon expressing alpha-cells (green) was observed. Nuclei
12 are counterstained with DAPI (blue) (magnification X40). (D) Secreted somatostatin levels from
13 PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice isolated islets. Data represent a pool of 3 independent experiments (with
14 120 islets/experiments). (E) Immunostaining and confocal imaging of representative pancreatic islet
15 from 12-week-old PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice for somatostatin (green). (magnification X40). Data
16 represent mean $\pm$ SEM. * p<0.05.

17 **Figure 2: LDLR expression is increased in beta-cells from PCSK9-deficient mice.** (A)
18 Immunostaining and confocal imaging of representative pancreatic islet from 12-week-old PCSK9^{+/+}
19 and PCSK9^{-/-} mice for LDLR (red). (B) Co-localization of LDLR (red) and insulin expressing beta-
20 cells (green, merged in yellow). No co-staining of LDLR with glucagon expressing alpha-cells (green)
21 (C) or somatostatin expressing delta-cells (green) (D) was observed. Nuclei are counterstained with
22 DAPI (blue) (magnification X40).

23 **Figure 3: PCSK9 controls LDLR protein expression in pancreatic islets.** (A) Immunoblot analysis
24 of LDLR and actin expression in freshly isolated (on left part) and 24h-cultured (on right part) islets
25 isolated from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice. (B) Immunoblot analysis of PCSK9 secreted in the media
26 of human islets and Immortalized Human Hepatocytes (IHH). LDLR content quantification of mouse
27 (C) and human (D) islets cultured for 6h with the indicated amounts of purified human recombinant

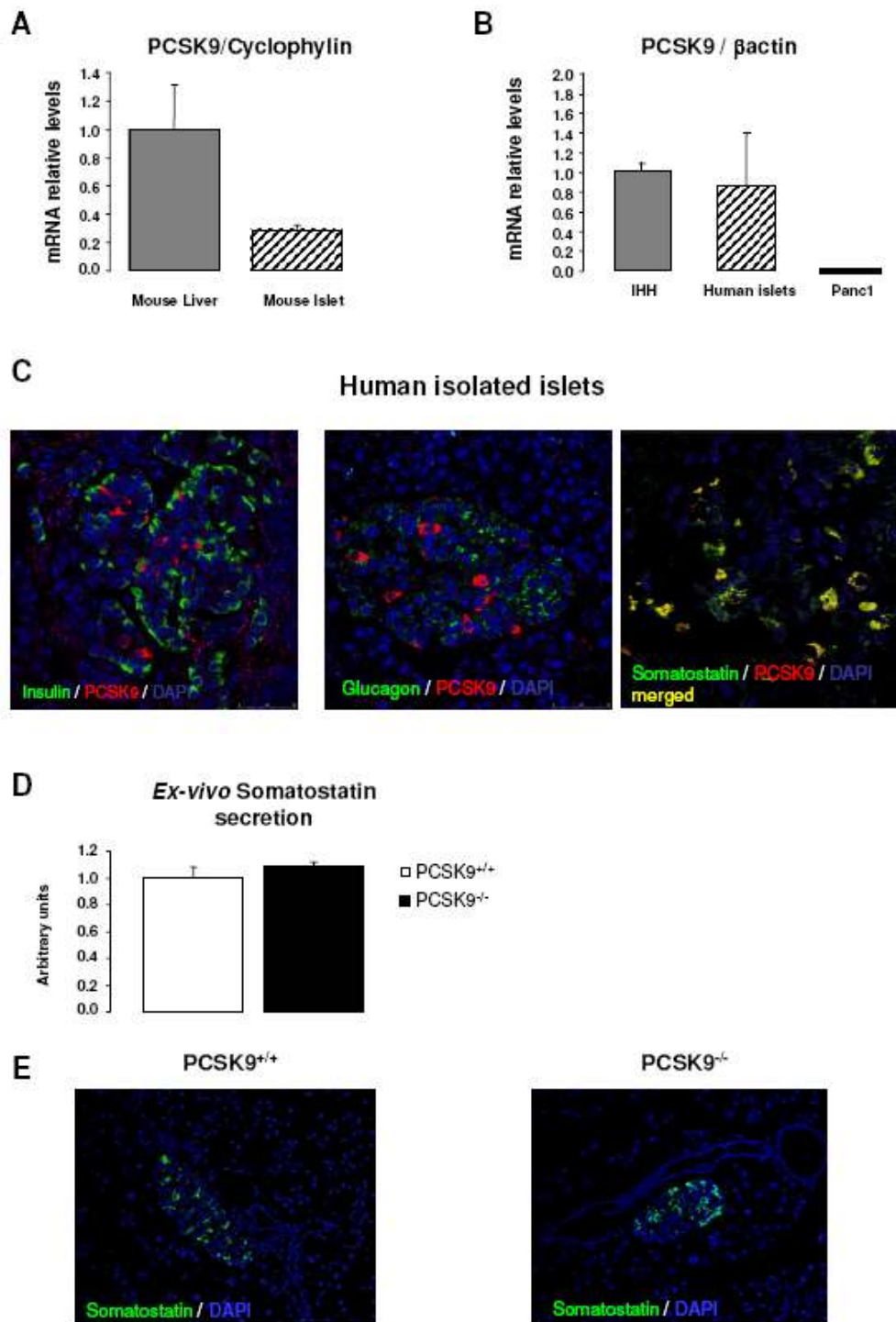
1 PCSK9. Similar results were obtained in 2 independent experiments. Data represent mean $\pm$ SEM. **
2 $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

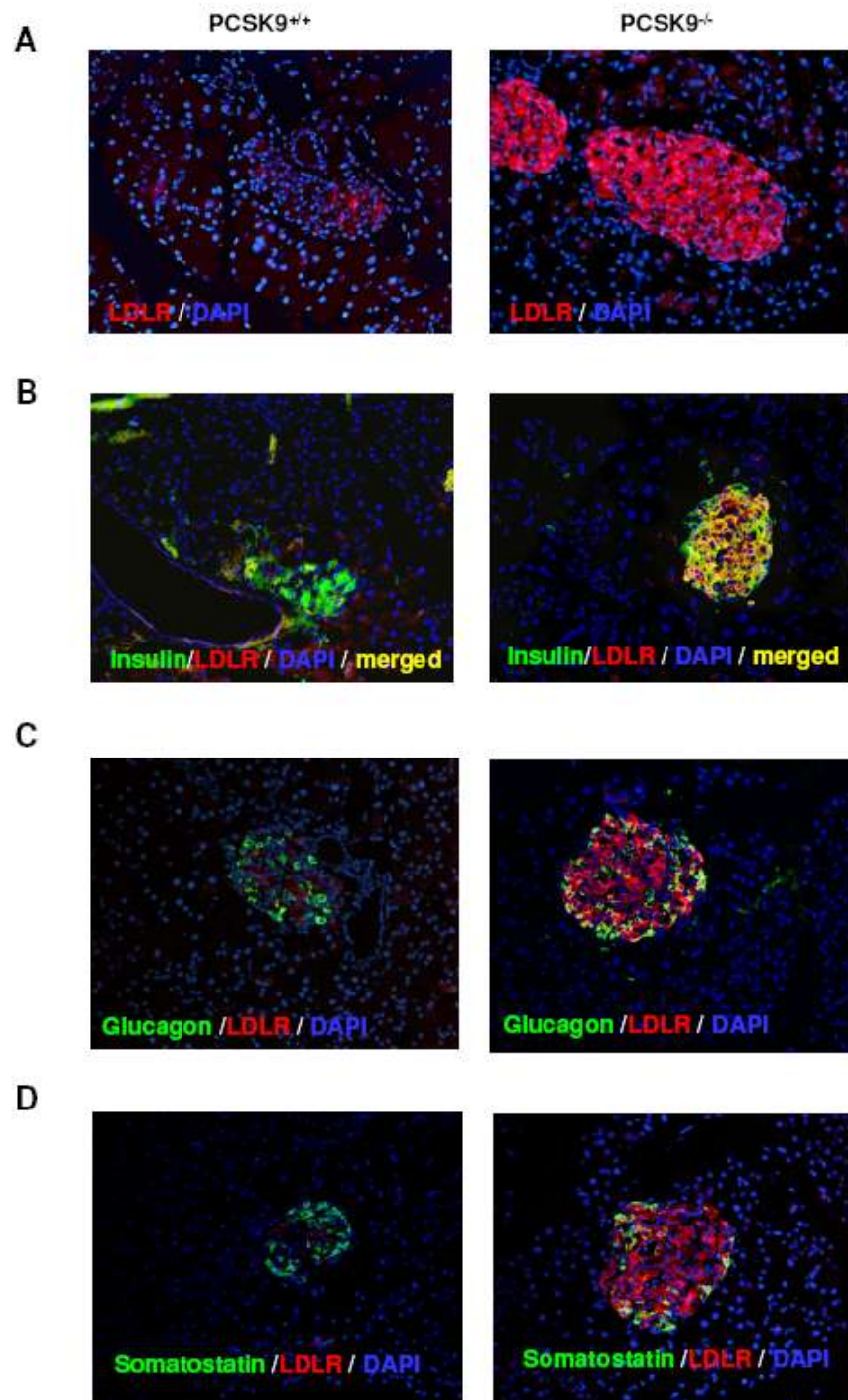
3 **Figure 4: PCSK9 deficiency does not alter insulin secretion in mice and human isolated islets.**
4 (A) Cholesterol content was measured in islets isolated from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice by
5 fluorometric detection. (B) Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) was assessed in static
6 incubations from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice isolated islets. Data represent a pool of 6 independent
7 experiments. The fold induction is the ratio of stimulated insulin secretion (25 mM glucose) over basal
8 insulin secretion (2.8 mM glucose). (C) GSIS from PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice islets cultured in
9 presence or in absence of 6.2 mM LDL for 24h. This figure is representative of 3 independent
10 experiments. Data represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison with 2.8
11 mM glucose condition. § $p < 0.05$ in comparison with 6.2 mM LDL. (D) Human isolated islets were
12 cultured for 6h with the indicated amounts of purified recombinant PCSK9 concentration. GSIS (5X40
13 IE per condition) was measured as described in material and methods. Data are a pool of experiments
14 performed with islets isolated from 3 different donors. Data represent mean $\pm$ SEM.

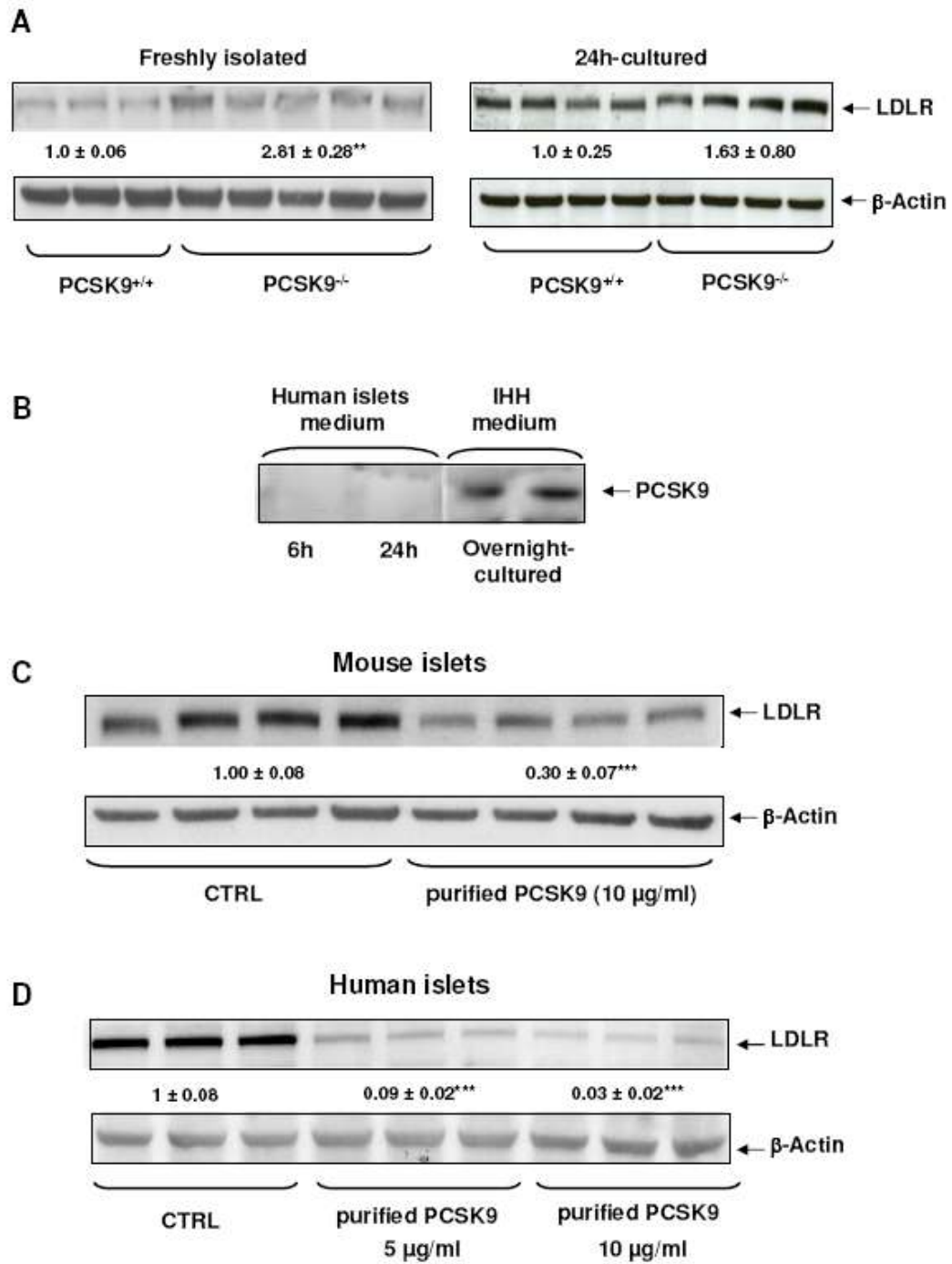
15 **Figure 5: PCSK9 deficiency does not alter insulin secretion *in vivo* in basal and streptozotocin-**
16 **induced diabetes conditions.** PCSK9^{+/+} (n=9) and PCSK9^{-/-} (n=8) mice were fasted for 6h. Blood
17 glucose levels was determined before (time 0) and at the indicated time after mice received (A) an oral
18 glucose load (2g/kg body weight, OGTT) and (B) an intraperitoneal insulin injection (0,75U/kg body
19 weight, ITT). Data represent mean $\pm$ SEM. NS: non significant, $P > 0.05$. PCSK9^{+/+} (n=7) and PCSK9^{-/-}
20 (n=7) mice were treated with 5 injections of low-dose streptozotocin (STZ, 50 mg/kg body weight).
21 Blood glucose levels (C) and total body weight (D) were monitored on 6h-fasted mice after the last
22 injection of STZ. We performed intra-peritoneal glucose tolerance test (2g/kg body weight, IPGTT)
23 before and 20 days after the last injection of STZ on 12h-fasted mice. Blood glucose (E) and (F) and
24 plasma insulin (G) and (H) levels were monitored at the indicated times. Data represent mean $\pm$ SEM.

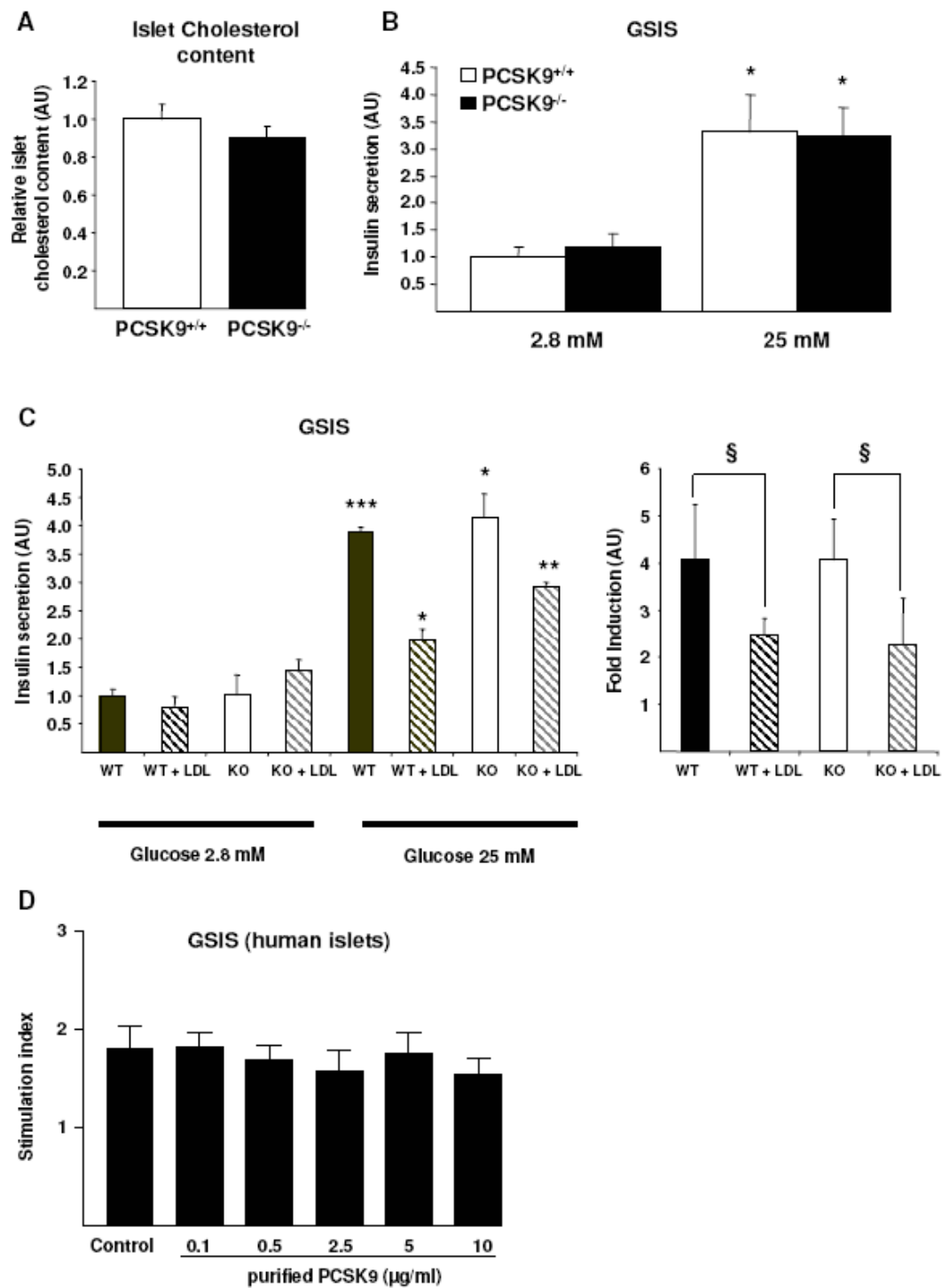
25 **Figure 6: PCSK9 deficiency does not alter the course of streptozotocin-induced diabetes in mice.**
26 (A) Random blood glucose levels and incidence of diabetes in PCSK9^{+/+} (n=7) and PCSK9^{-/-} (n=7)
27 mice injected with a single dose of 150 mg/kg body weight of STZ. (B) Ratio Pancreas Insulin

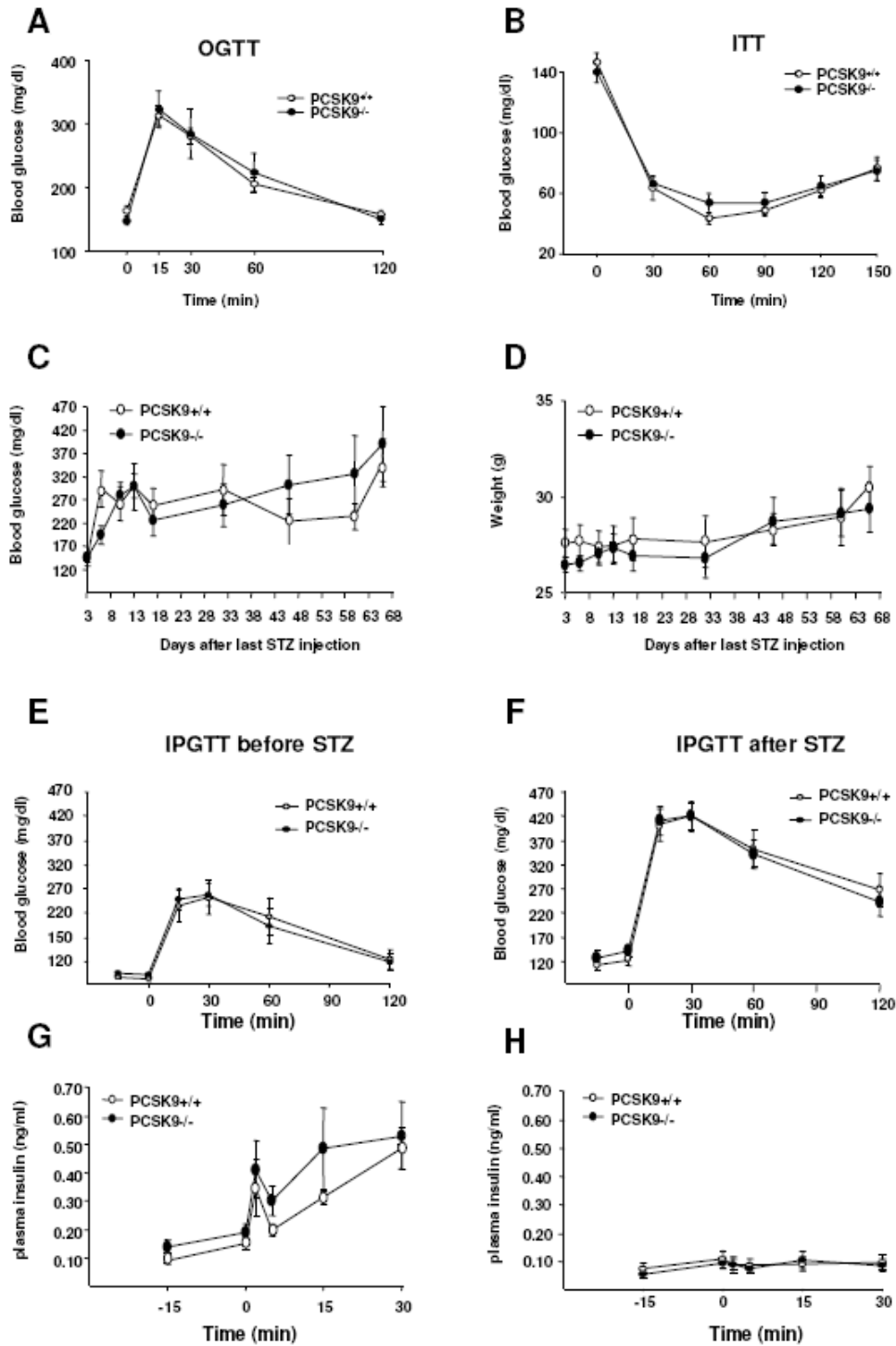
- 1 Content/Blood glucose (PIC: measured by RIA (ng/ml/mg of pancreas) to blood glucose levels
- 2 (mg/dl)). Data represent mean $\pm$ SEM.
- 3



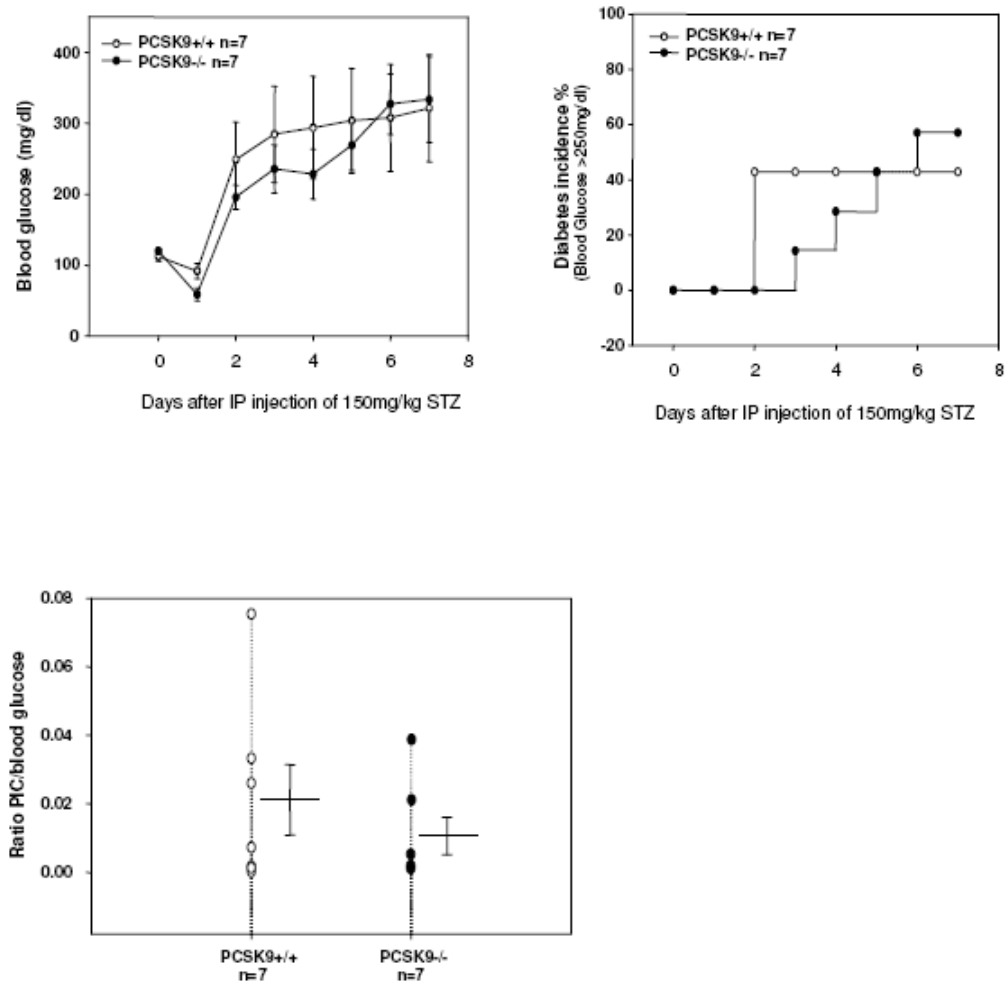








Langhi et al. Figure6



Supplementary data

Supplemental methods

Mouse islet cholesterol assay

Cholesterol content was quantified in a 96-well plate by a fluorometric method (Amplex Red Cholesterol Assay kit, Molecular Probes). 40 isolated islets were lysed in 110 μ L of reaction buffer (5 mM cholic acid, 0.1 M potassium phosphate, 0.05 M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.4) for 30 min at 4 °C and then sonicated. 50 μ L of the lysates were used for cholesterol determination in duplicate according to the instructions of the manufacturer. Fluorescence was detected using the Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA).

Measurement of PCSK9 secretion in cultured isolated human islets and hepatocytes

Human isolated islets (1000 IE) were cultured for 6h and 24h in medium without serum. Immortalized Human Hepatocytes (IHH) (10^6 cells) were cultured overnight in William's E medium without serum. Proteins from culture medium were precipitated with acetone and immunoblot analysis of PCSK9 was performed.

Antibodies for western blot analysis

Membranes were probed with a polyclonal rabbit IgG directed against the CRSRHLAGASQELQ peptide (Neosystem, Strasbourg, France), an epitope of the C-terminal domain of human PCSK9, a polyclonal rabbit anti mouse LDLR antibody directed against the CPSRQMVSLEDDVA peptide (a kind gift of Dr Herz) or a commercial one (R&D Systems, Lille, France) or with the monoclonal anti β -actin AC-15 antibody (Sigma, France).

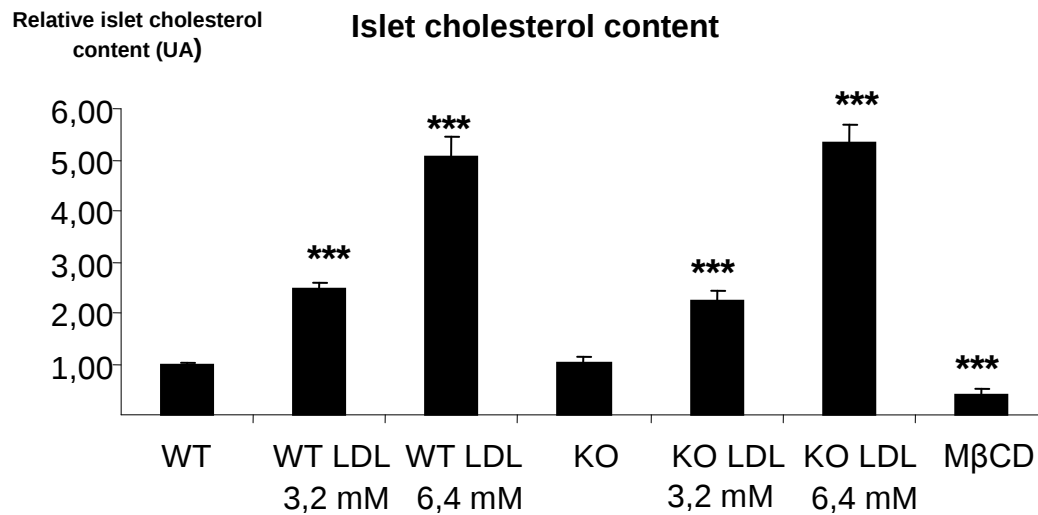
PCR primers

mGLUCOKINASE: GCACACGTGGTGCTTTTGAG forward, GCCTTCGGTCCCCAGAGT reverse;
mPCSK9: AGGTGGAGGTGTATCTCTTAGATACCA forward, CGCTGTTGAAGTCGGTGATG reverse;
mCYCLOPHYLIN: TGGCAAATGCTGGACCAAA forward, GCCATCCAGCCATTTCAGTCT reverse;
hLDLR: AAGGCTGTCCCCCAAGA forward, CGAACTGCCGAGAGATGCA reverse;
hPCSK9: ACGTGGCTGGCATTGCA forward, AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA reverse;
hINSULIN: GCAGCCTTTGTGAACCAACA

forward, GGTGTGTAGAAGAAGCCTCGTT reverse, hACTINE:
CCGTGTGGATCGGCGGCTCCA forward, CTGCTTGCTGATCCACATCTG reverse.

Characteristics of antibodies for immunohistochemistry

Antibodies	source	type (clone)	dilution
PCSK9	Home-made	Polyclonal	1:100
LDL-R	R&D Systems	Polyclonal	1:200
Insulin/Proinsulin	AbD serotec	Monoclonal (D6C4)	1:500
Somatostatin	Genetex	Monoclonal (SOM-018)	1:50
Glucagon	Sigma	Monoclonal (K79bB10)	1:500



Supplementary Fig. S1. 40 islets from WT or PCSK9^{-/-} mice (n=3 for each condition) were cultured in LPDS 5% in presence of LDL at the indicated concentration for 24h. Methyl-β Cyclodextrine 10 μM was added to culture medium 1h before measure of cholesterol content. Cholesterol content is assessed as described in methods and normalised by protein content.. (Student's t-test: ***P < 0.001 versus each control without LDL)

3) Discussion

Cette étude originale est la première à s'intéresser au rôle de PCSK9 dans le pancréas et notamment au niveau la sécrétion d'insuline par la cellule β . Certes, les premiers travaux caractérisant le profil d'expression de PCSK9 avaient déjà détecté l'expression ARNm de PCSK9 dans des lignées d'insulinome chez le rat, les Rin-m5F, et de souris, les β TC3 (Seidah *et al.*, 2003). Aucune détection de l'expression de PCSK9 n'est cependant retrouvée dans le pancréas de rat (Seidah *et al.*, 2003) ou de souris (Zaid *et al.*, 2008). Nos résultats de l'analyse de l'expression ARNm de PCSK9 par RT-PCR montrent clairement que PCSK9 est relativement bien exprimée dans les îlots de Langerhans chez la souris, puisqu'elle représente 30% de l'expression retrouvée dans le foie. Nous détectons également PCSK9 de manière significative dans les îlots du pancréas de donneurs humains par RT-PCR. Ces données sont confirmées par les marquages immunohistochimiques réalisés sur des coupes de pancréas humains, où PCSK9 n'est exprimée que dans la partie endocrine du pancréas. Le pancréas endocrine ne représente que 3% de la masse totale de cet organe. Ainsi, tout comme ABCA1 qui n'est exprimé que dans les îlots de Langerhans et dont l'expression n'est pas détectée à l'échelle de l'organe entier (Brunham *et al.*, 2007), nous montrons pour la première fois l'expression de PCSK9 dans les îlots de Langerhans. De façon inattendue, l'expression de PCSK9 n'est pas colocalisée avec les cellules productrices d'insuline ou de glucagon, les cellules β et α respectivement, mais se situe spécifiquement dans les cellules δ sécrétrices de la somatostatine. Ces résultats *in vivo* tranchent donc avec les données des lignées tumorales Rin-m5F et β TC3. Nos tests de détection de PCSK9 par RT-PCR dans d'autres lignées de cellules β confirment l'expression chez la souris avec les cellules MIN-6 mais pas chez le rat avec les INS-1. De même, aucune expression de PCSK9 n'est rapportée dans les lignées ductales humaines Panc-1. Les données de l'expression de PCSK9 dans des lignées cellulaires tumorales sont à interpréter avec précaution tant PCSK9 semble impliquée dans les phénomènes de différenciation cellulaire (Seidah *et al.*, 2003) et de régénération tissulaire (Zaid *et al.*, 2008).

Ensuite, comme dans le foie (Rashid *et al.*, 2005) et l'intestin (Le May C. *et al.*, 2009) des souris PCSK9^{-/-}, nous observons que l'expression protéique du LDLR est augmentée de près de 200% dans les îlots isolés des souris PCSK9^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Nous avons alors regardé si l'ajout de la protéine purifiée de PCSK9 induisait la dégradation du LDLR en culture sur des îlots isolés. En effet, avec les valeurs utilisées dans la littérature sur

des hépatocytes en culture (Lagace *et al.*, 2006), un traitement de 6h avec PCSK9 à 10 µg/ml réduit l'expression protéique du LDLR de 70% chez la souris et abolit son expression chez l'homme. Au sein de l'îlot, c'est au niveau des cellules β que se fait essentiellement l'augmentation de l'expression du LDLR comme montrée par immunohistochimie chez la souris. Ainsi, il semble bien que les mécanismes de régulation du LDLR par PCSK9 soient parfaitement fonctionnels dans la cellule β . Lorsque les îlots isolés de souris sont maintenus dans leur milieu de culture avec du sérum déplété en lipoprotéines pendant 24h, on constate une absence de différence significative entre les niveaux de LDLR entre les souris sauvages et PCSK9^{-/-}. Cette perte de régulation du LDLR chez les îlots des souris PCSK9^{-/-} est sûrement à mettre en relation avec l'absence de détection de PCSK9 sécrété dans le milieu de culture des îlots par western blot, mais également par test ELISA. Ceci suggère une régulation endocrine de PCSK9 sécrétée par le foie plutôt qu'une régulation paracrine des cellules δ sur les cellules β au sein de l'îlot. Dans la littérature, aucune donnée ne fait mention de la sécrétion de PCSK9 par un organe autre que le foie. Les souris invalidées pour PCSK9 spécifiquement dans le foie ont des taux circulants de PCSK9 qui sont indétectables, suggérant le foie comme organe producteur majeur de PCSK9 sécrétée (Zaid *et al.*, 2008). Seule une étude de surexpression de PCSK9 dans le rein atteste que d'autres organes sont capables de sécréter PCSK9 (Luo *et al.*, 2008).

Nous avons ensuite procédé à la caractérisation phénotypique des souris PCSK9^{-/-} sur l'homéostasie glucidique. Les tests de tolérance à l'insuline (ITT) ne montrent aucun changement dans la sensibilité à l'insuline entre souris sauvages et PCSK9^{-/-}. La pratique de tests de tolérance au glucose intrapéritonéaux (IPGTT) ne révèle aucune différence sur la tolérance au glucose entre ces souris, de même que les tests de tolérance oraux (OGTT) afin de vérifier l'effet de PCSK9 sur l'intestin dans l'absorption du glucose et la sécrétion des incrétines. Ainsi l'absence de PCSK9 ne semble pas perturber l'homéostasie du glucose *in vivo*. *Ex vivo*, la pratique de tests de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) montre une induction de la sécrétion d'insuline identique entre les îlots de souris sauvages et PCSK9^{-/-}. Chez l'homme, l'incubation des îlots du pancréas avec des concentrations de PCSK9 comprises entre 0.1 et 10 µg/ml n'altère pas non plus la sécrétion d'insuline. Afin de comprendre l'absence de différence entre la fonction β des souris KO et sauvages alors que l'expression du LDLR est augmentée chez les souris PCSK9^{-/-}, nous avons mesuré les concentrations en cholestérol des îlots isolés par dosage fluorométrique. Malgré une plus forte expression du LDLR chez les îlots des souris PCSK9^{-/-}, aucun changement dans le cholestérol intracellulaire n'est observé entre les souris. Une explication à cette observation est que

l'invalidation systémique de PCSK9 induit une hypocholestérolémie du fait de l'augmentation du LDLR hépatique. Ainsi, la diminution des concentrations de particules riches en cholestérol ne permet plus l'accumulation intracellulaire de cholestérol même si le LDLR est augmenté à la surface membranaire. Ces observations sont constatées dans les travaux sur le rôle de ABCA1 dans le pancréas. L'invalidation systémique de ABCA1 provoque une diminution du cholestérol circulant, alors que l'invalidation spécifique dans les îlots est neutre sur les paramètres lipidiques plasmatiques. Ainsi, l'accumulation de cholestérol dans les îlots est plus importante dans le pancréas des souris invalidées tissu-spécifiquement que les souris invalidées de façon systémique. De façon parallèle, le phénotype glucidique est plus sévère dans le premier modèle de souris que dans le deuxième (Brunham et al., 2007). Corroborant nos résultats sur l'absence de variation du cholestérol dans les îlots des souris PCSK9^{-/-}, des résultats identiques sont retrouvés dans le foie des souris PCSK9^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Rashid *et al.*, 2005). De même, la surexpression adénovirale de PCSK9 induit une hypercholestérolémie et abolit l'expression hépatique du LDLR sans modifier non plus les taux de cholestérol hépatique avec les souris contrôles (Maxwell *et al.*, 2004).

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de PCSK9 sur l'insulinosécrétion dans des conditions de stress des îlots, *ex vivo* en les soumettant à des conditions lipotoxiques et *in vivo* en induisant leur destruction par traitement à la streptozotocine (STZ). *Ex vivo*, nous avons choisi de maintenir les îlots en culture en présence de LDL dans des conditions hautes de cholestérol (6.4 mM) pendant 24h, durée à laquelle ces concentrations deviennent juste pro-apoptotiques (Roehrich *et al.*, 2003). De façon attendue, ces conditions altèrent la sécrétion d'insuline dans les îlots des souris sauvages, mais également dans les îlots des souris PCSK9^{-/-} de manière similaire. Pour expliquer l'absence de différence entre îlots sauvage et déficients pour PCSK9, il faut rappeler nos observations sur la perte de régulation du LDLR en culture dans les îlots des souris PCSK9^{-/-} au bout de 24h. Dans le même sens, l'incubation des îlots des souris sauvages et PCSK9^{-/-} avec des LDL à 6.4 mM pendant 24h augmente le cholestérol intracellulaire de manière identique entre les 2 phénotypes (supplemental data). Récemment, des données de la littérature attestent clairement du rôle du LDLR dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Rutti *et al.*, 2009). Des îlots isolés humains et de souris sont maintenus en culture pendant 4 jours en présence ou non de concentrations de LDL-C à 3.2 mM. Ces conditions expérimentales altèrent le GSIS *ex vivo*. Par contre, les îlots des souris invalidées pour le LDLR sont protégés de ces effets délétères des LDL, suggérant un rôle protecteur de l'absence du LDLR dans ces conditions. Cependant, il n'est pas rapporté les mesures du contenu intracellulaire de cholestérol dans ces expériences, ce qui aurait validé

l'hypothèse de l'influence néfaste du cholestérol cellulaire sur la sécrétion d'insuline. Cette étude montre que l'incubation avec des LDL réduit la prolifération cellulaire dans les îlots humains et de souris en culture, effet qui est cependant maintenu dans les îlots des souris LDLR^{-/-} (Rutti *et al.*, 2009).

PCSK9 est impliquée dans la régénération hépatique, et l'absence de PCSK9 perturbe les mécanismes de régénération après une hépatectomie partielle chez la souris (Zaid *et al.*, 2008). Nous avons exploré ce rôle de PCSK9 dans le pancréas endocrine en induisant la destruction des îlots de Langerhans par traitement à la streptozotocine. Une manipulation réalisée avec une forte dose de STZ de 150 mg/kg pour induire un diabète insulino-pénique rapide ne montre pas de différence dans l'incidence du diabète, ni dans le contenu pancréatique en insuline après traitement entre souris sauvages et PCSK9^{-/-}. Pour compléter cette première expérience, une seconde approche s'est orientée vers une destruction progressive des îlots de Langerhans. Pour cela, nous avons opté pour des injections multiples de faibles doses de STZ, à savoir 50 mg/kg/j pendant 5 jours. Un test IPGTT est pratiqué en même temps qu'un test de sécrétion d'insuline sur les souris avant le traitement. Nous avons suivi l'évolution de la glycémie et l'induction du diabète sur 20 jours jusqu'à la stabilisation de la glycémie puis nous avons pratiqué un 2^{ème} IPGTT et test de sécrétion d'insuline. L'induction du diabète s'est déroulée de manière identique entre les souris sauvages et PCSK9^{-/-}. L'IPGTT pratiqué après le traitement STZ atteste bien des perturbations de la tolérance au glucose causées par ce traitement, sans aucune différence entre souris sauvages et PCSK9^{-/-}. Enfin, au niveau de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, les résultats étaient similaires entre les 2 phénotypes avant le traitement STZ et montrent une abolition complète de la sécrétion d'insuline pour les 2 groupes après le traitement STZ. Ainsi, l'absence de PCSK9 n'intervient pas dans la survie des cellules β dans ces conditions de toxicité induite par la STZ.

Finalement, la donnée la plus surprenante de ces travaux est l'expression de PCSK9 exclusivement dans les cellules δ . Peu de données sont disponibles concernant le rôle de ces cellules dans l'îlot. La somatostatine (SST) est sécrétée sous l'induction du glucose, comme l'insuline, et provoque l'inhibition paracrine de la sécrétion d'insuline et de glucagon. *Ex vivo*, la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose est amplifiée dans les îlots des souris déficientes en SST par rapport aux îlots des souris sauvages (Hauge-Evans *et al.*, 2009). Mais la somatostatine est retrouvée dans différents tissus neuroendocriniens comme dans l'intestin et au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Comme PCSK9 a tout d'abord été identifiée dans les neurones en apoptose et que son expression induit la

différenciation neuronale (Seidah *et al.*, 2003), sa co-expression avec la somatostatine dans le pancréas ouvre la voie pour des investigations futures sur le rôle précis de PCSK9 dans les tissus neuroendocriniens. La proSST est une protéine de 92 acides aminés qui subit un clivage protéolytique aboutissant à une forme mature de 28 acides aminés (SST-28) ou de 14 acides aminés (SST-14). Les 2 sites de clivages sont bien connus et font intervenir les PC clivant après les acides aminés basiques. Ainsi la forme SST-28 est produite par l'action de la furine ou de PACE4 au niveau de la séquence RLELQR₆₄↓ *in vitro* alors que la SST-14 est produite par PC1 ou PC2 au niveau de la séquence RERK₇₈↓ (Brakch *et al.*, 1995). Dans la cellule δ , c'est la forme SST-14 qui est majoritairement produite, PC2 est d'ailleurs la seule de ces PC détectée dans ces cellules par immunohistochimie (Portela-Gomes *et al.*, 2008). Les sites de clivage conduisant aux différentes formes connues de la SST ne correspondent pas à des séquences reconnues par PCSK9. Dans nos expériences, la sécrétion basale de SST ne semble pas modifiée entre les îlots des souris sauvages et PCSK9^{-/-}.

Pour résumer, nos résultats démontrent que : 1) PCSK9 est exprimée dans la cellule δ des îlots du pancréas, 2) PCSK9 circulante régule l'expression du LDLR dans la cellule β , probablement de manière endocrine, 3) l'absence de PCSK9 n'influence pas l'homéostasie du glucose *in vivo* ni la sécrétion d'insuline *ex vivo* dans notre modèle en accord avec l'absence de variation du cholestérol intracellulaire. La génération de souris invalidées pour PCSK9 spécifiquement dans la cellule δ s'avérerait un atout considérable pour ne pas influencer la cholestérolémie, cependant un tel modèle n'a jamais été réalisé car peu de données relatives à la cellule δ sont disponibles et la somatostatine est exprimée dans d'autres tissus. 4) Les modèles de stress des îlots par traitement à la STZ ne mettent aucun rôle en avant de PCSK9 dans la survie des cellules β .

Les études expérimentales chez la souris ont bien établi que l'accumulation de cholestérol dans la cellule β altère la sécrétion d'insuline alors que la déplétion intracellulaire en cholestérol potentialise la sécrétion d'insuline (Hao *et al.*, 2007; Brunham *et al.*, 2007). De plus, l'incubation avec des LDL est toxique pour la cellule β *ex vivo* (Cnop *et al.*, 2002; Roehrich *et al.*, 2003). Chez l'homme, peu de données cliniques traitent de l'effet du cholestérol sur la fonction β -cellulaire. Dans l'étude WOSCOPS, un traitement par statine, la pravastatine, diminue l'incidence du diabète de type 2 de 30% (Freeman *et al.*, 2001). Néanmoins, il a été récemment retrouvé dans l'étude JUPITER avec la rosuvastatine une augmentation de l'incidence des cas de diabète dans le bras statine (Ridker *et al.*, 2008b). Concernant PCSK9, une corrélation positive est retrouvée entre les taux circulants de PCSK9 et la glycémie (Lakoski *et al.*, 2009). Chez le rat rendu diabétique par traitement à la STZ,

l'expression hépatique de PCSK9 est effondrée (Niesen *et al.*, 2008). L'expression hépatique de PCSK9 est sous le contrôle positif de l'insuline *via* l'induction du facteur de transcription SREBP1c (Costet *et al.*, 2006). Enfin, des homologies ont été remarquées dans la structure de PCSK9 et la résistine, une adipokine impliquée dans la résistance à l'insuline (Hampton *et al.*, 2007). L'inhibition de l'action de PCSK9 sur le LDLR est un enjeu thérapeutique majeur dans la prise en charge des hypercholestérolémies en clinique. Prises dans leur ensemble, nos données vont dans le sens d'une absence d'effet secondaire de l'inhibition de PCSK9 sur l'homéostasie du glucose chez la souris.

CONCLUSION GENERALE

Bien que ne suivant pas un axe d'étude parfaitement linéaire, mes travaux s'intègrent dans la problématique de l'équipe focalisée sur la compréhension de la régulation de PCSK9 et de ses liens moléculaires avec le métabolisme lipidique. A partir de PCSK9 comme point commun, mes résultats enrichissent les données sur 2 grandes thématiques actuelles (**figure 33**). PCSK9 est d'abord identifiée comme un régulateur du métabolisme du cholestérol. Le Farnesoid X Receptor est un récepteur nucléaire dont l'importance dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des triglycérides est clairement établie. De plus, FXR intervient dans l'homéostasie du glucose et la sensibilité à l'insuline et possède des actions vasculaires, ce qui en fait sans conteste une cible pharmacologique majeure dans la prise en charge du syndrome métabolique. Seule voie de dégradation du cholestérol par l'organisme, les ABs apparaissent comme des hormones à part entière, notamment *via* leur interaction avec FXR. La découverte de la répression de PCSK9 par les ABs *via* FXR apporte en quelque sorte une pierre à l'édifice et un argument de plus au développement de modulateurs sélectifs de FXR. Néanmoins, au cours de cette étude, il s'est avéré impossible de pousser plus loin les investigations sur le rôle physiologique *in vivo* de cette régulation en raison d'une régulation spécifique d'espèce. Ce projet continue sous la forme d'une étude clinique visant à comparer les profils d'expression de FXR et PCSK9 dans le foie de patients obèses bénéficiant d'une chirurgie bariatrique avec différents paramètres métaboliques, lipidiques et glucidiques.

J'ai alors abordé un autre axe de recherche qui a réactualisé l'importance du métabolisme du cholestérol dans la physiopathologie du diabète de type 2. Il me fallut donc quitter le foie pour m'intéresser au pancréas et plus particulièrement aux îlots de Langerhans. Si les variations de cholestérol dans la cellule β sont capables d'influencer sa fonction insulino-sécrétrice, alors l'activité du LDLR qui est exprimé au niveau de la cellule β doit contribuer aux mécanismes régulateurs de la sécrétion d'insuline. Le rôle du LDLR sur la fonction β -cellulaire n'est pas clairement établi. Nous sommes les premiers à montrer que PCSK9 est exprimée dans les îlots du pancréas et qu'elle est fonctionnelle sur la régulation du LDLR. Contrairement à l'étude précédente, ces travaux m'ont permis d'explorer le rôle de PCSK9 sur la sécrétion d'insuline *in vivo* chez la souris. Les résultats obtenus montrent cependant que PCSK9 n'influence pas la sécrétion d'insuline dans nos modèles expérimentaux. Continuer les recherches sur le rôle du LDLR dans le pancréas apportera de nouvelles voies de traitement du diabète de type 2 puisque cette pathologie est associée aux troubles du métabolisme des lipoprotéines, et permettra sans doute de clarifier les effets des statines sur l'incidence du diabète tout en anticipant les effets éventuels des inhibiteurs de PCSK9 sur la fonction β -cellulaire. La littérature rapporte des éléments liant PCSK9 au

diabète chez l'homme et l'animal. Un projet développé au laboratoire est tourné vers le rôle de PCSK9 dans l'insulinorésistance et le diabète. Les variations d'expression hépatique de PCSK9 sont regardées dans divers modèles d'insulinorésistance. La mise en place d'une insulinorésistance suite à des manipulations nutritionnelles est comparée entre souris sauvages et invalidées pour PCSK9.

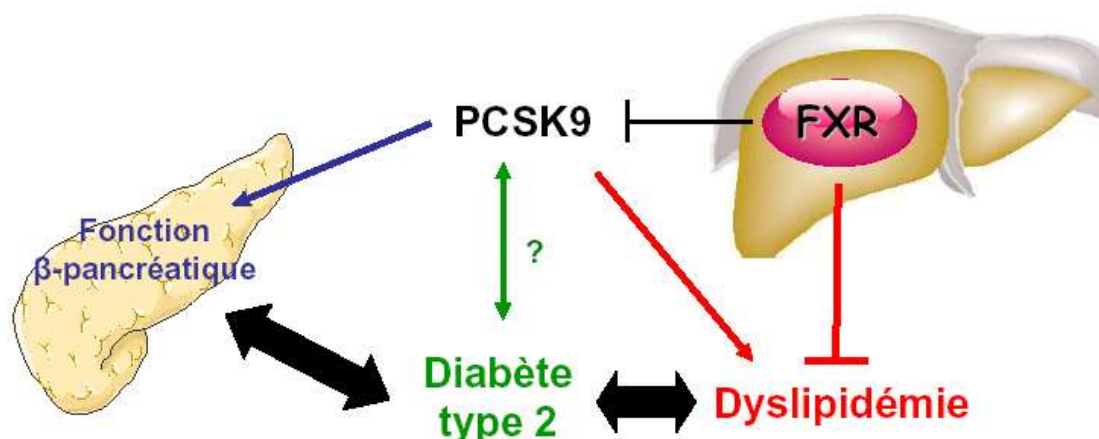


Figure 33 : PCSK9 au centre des perturbations métaboliques

S'intéresser aux fonctions extrahépatiques de PCSK9 est un moyen d'éclaircir les autres fonctions physiologiques de PCSK9. Des travaux publiés du laboratoire auxquels j'ai participé et qui sont présentés en annexe se sont focalisés sur le rôle de PCSK9 dans l'intestin. Dans cette continuité, un projet de recherche en cours porte sur le rôle de PCSK9 dans les états inflammatoires, notamment dans la réponse lipidique aux états de stress post-traumatiques. Dans un contexte plus clinique, nous approfondissons l'hypothèse issue des travaux de régulation de BACE1 par PCSK9, qui prévoit une augmentation du risque de maladie d'Alzheimer en l'absence de PCSK9, en dosant les taux circulants de PCSK9 chez des patients atteints de la maladie. Enfin, j'ai participé à la caractérisation d'une nouvelle mutation perte de fonction de PCSK9 identifiée au CHU de Nantes. Les résultats sont présentés en annexe et montrent que le patient porteur de cette mutation R104C/V114A sur un allèle possède des taux très bas de LDL-C semblables aux individus perte de fonction de PCSK9 sur les 2 allèles avec des taux circulants de PCSK9 indétectables. *In vitro*, cette mutation agit tel un dominant négatif de la sécrétion de PCSK9.

Les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose sont la première cause de mortalité dans nos sociétés occidentales. Parmi les facteurs de risques classiques tels que l'âge, le sexe ou le tabagisme, on trouve évidemment les concentrations élevées de LDL-C. Pour preuve de l'enjeu thérapeutique que représente la prise en charge des hypercholestérolémies, les statines sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde. Le développement d'inhibiteurs de PCSK9 en clinique devrait être un outil supplémentaire dans la réduction des taux circulants de cholestérol associé aux LDL et pour la lutte contre les maladies cardiovasculaires.

En démontrant que PCSK9 régule l'expression du LDLR dans les îlots du pancréas, mes travaux apportent une donnée de plus sur l'effet de PCSK9 dans les organes extrahépatiques, ce qui conduira à identifier les mécanismes qui font que PCSK9 est fonctionnelle dans certains organes uniquement. Une seconde perspective de recherche qu'ouvre ma thèse est la compréhension de l'expression spécifique de PCSK9 dans les cellules sécrétrices de somatostatine, ce qui contribuera sans doute à expliquer pourquoi PCSK9 a été conservée au cours de l'évolution.

ANNEXES

I) Article 1 : Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M705831200/DC1>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 283, NO. 15, PP. 9666–9673, APRIL 11, 2008
© 2008 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

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

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

Sanae Kourimate^{†¶1}, Cédric Le May[‡], Cédric Langhi[‡], Anne Laure Jarnoux[§], Khadija Ouguerram^{¶||}, Yassine Zaïr^{‡***}, Patrick Nguyen^{‡‡}, Michel Krempf^{¶||**}, Bertrand Cariou^{‡***}, and Philippe Costet^{‡¶2}

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

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

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

Sanae Kourlimate^{†1}, Cédric Le May[‡], Cédric Langhi[‡], Anne Laure Jarnoux[§], Khadija Ougueram^{¶1}, Yassine Zaïr^{***}, Patrick Nguyen^{††}, Michel Krempf^{‡‡}, Bertrand Carliou^{†††}, and Philippe Costet^{†‡2}

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

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

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

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

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

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

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

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

[¶]The abbreviations used are: PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; LXR, liver X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; PC5/6A, proprotein convertase 5/6A; LDLR, low density lipoprotein receptor; HDL, high density lipoprotein; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; IHH, immortalized human hepatocytes; LPDS, lipoprotein-deficient serum; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; FA, fenofibrate acid; PV, pravastatin; wt, wild type; mut, mutant; siRNA, short interfering RNA.

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PC5/6A and Furin Expression

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

Here we show that various fibrates repressed PCSK9 expression in immortalized human hepatocytes (IHH). We show for the first time that fibrates also increase the synthesis of PC5/6A and furin in a PPAR α -dependent fashion, suggesting a dual mechanism of action on PCSK9 both at the transcriptional and protein levels. Fenofibric acid (FA), the active form of fenofibrate, reduced the protein content of PCSK9 in IHH as well as its cellular secretion and prevented its accumulation caused by statins or the LXR agonist T0901317. These repressive effects were reproduced at the PCSK9 promoter level. To test the functional relevance of these findings, we verified that FA amplified the effect of pravastatin on LDLr activity.

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTS

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

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PCS/6A and Furin Expression

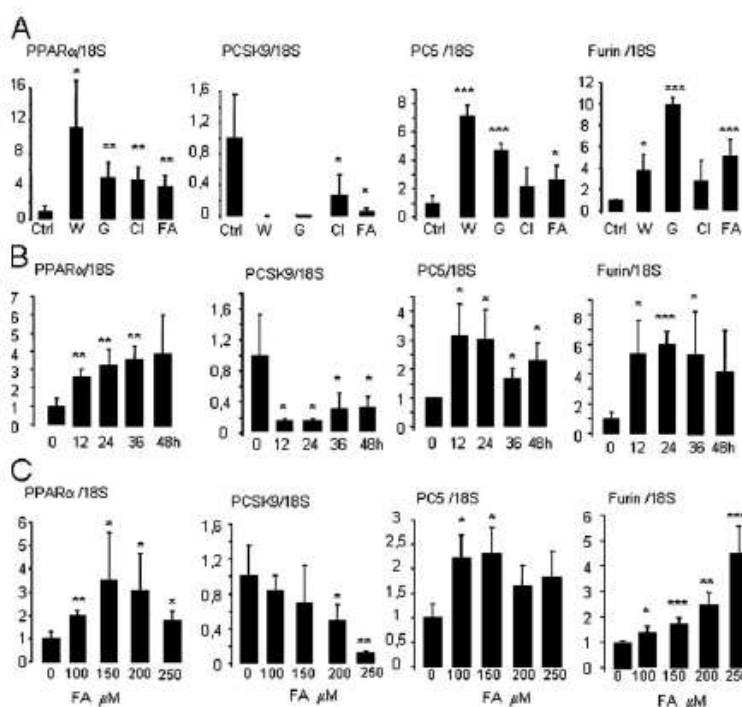


FIGURE 1. Fibrates reduce PCSK9 and increase PCS and furin mRNA quantity. A, IHH were exposed for 24 h to various agonists of PPARα: Wy14643 (100 μM, W) or 250 μM FA (FA), clofibrate (CI), gemfibrozil (G). B, IHH were exposed from 0 to 48 h to FA (250 μM) in 5% LPDS or C, to increasing doses of FA for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

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

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

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

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

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

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

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

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PC5/6A and Furin Expression

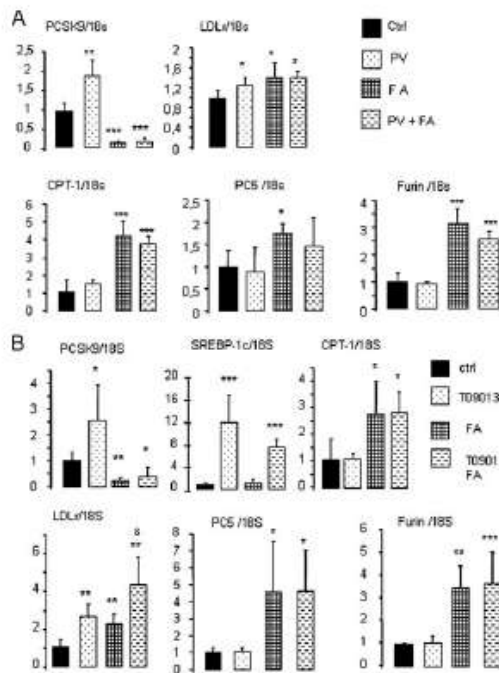


FIGURE 2. FA impairs PCSK9 mRNA accumulation in the presence of statins or T0901317. A, IHH cells were exposed for 24 h to FA (250 μ M), and/or pravastatin (10 μ M) in the presence of 5% LPDS. Gene-specific expression was measured by real-time PCR analysis. B, similar experiment was run for 48 h using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

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

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

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

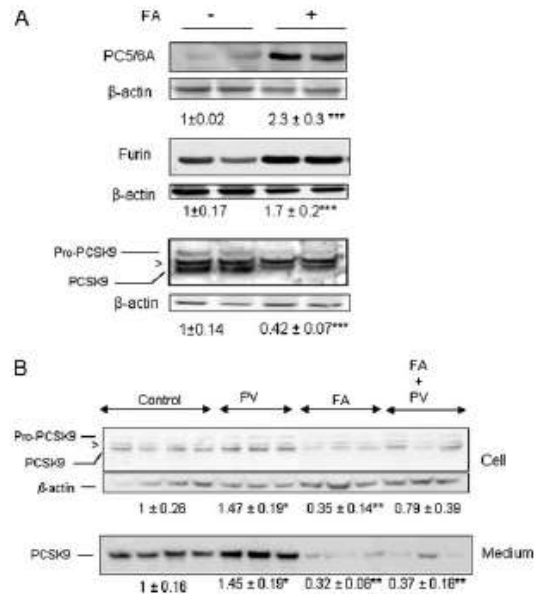


FIGURE 3. FA impairs pravastatin-mediated increases of PCSK9 content in cells and medium. A, IHH cells were exposed for 48 h to FA (250 μ M) in William's E medium. Cell lysates were collected, and their protein content analyzed by Western blot using antibodies raised against PCS, furin, or PCSK9. The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

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

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

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

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PC5/6A and Furin Expression

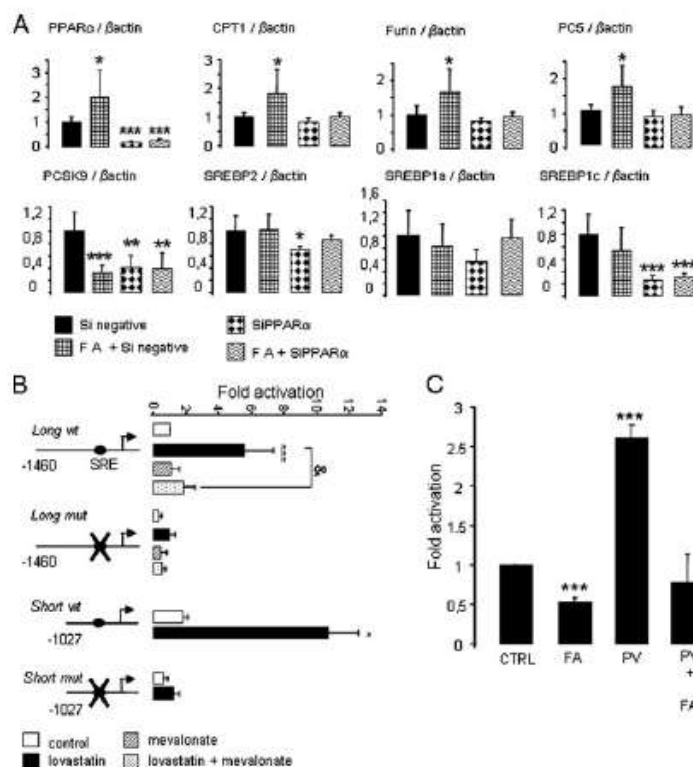


FIGURE 4. Fenofibrate acid transcriptionally regulates PCSK9, PC5, and furin. A, IHH cells were transfected with nontargeting siRNA (Si negative) or siRNA directed against PPAR α (SPPAR α) and cultured as described under "Materials and Methods." Gene-specific expression was measured by real-time PCR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

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

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

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

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

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

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PC5/6A and Furin Expression

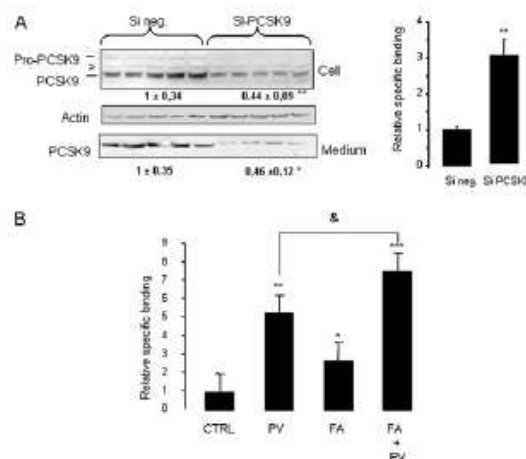


FIGURE 5. FA represses LDLr activity and potentiates statin-mediated binding of LDL. A, to validate IHH cells as an appropriate model, we first decreased PCSK9 expression using siRNA targeting PCSK9 mRNA (Si-PCSK9), compared with cells exposed to "negative" nontargeting siRNA (Si neg.). IHH were cultured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

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

DISCUSSION

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

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

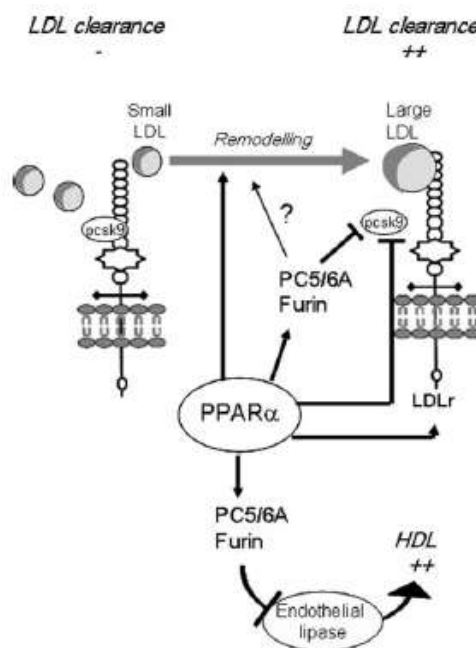


FIGURE 6. PPAR α activation acts on proprotein convertases PCSK9, PC5, and furin to promote LDL clearance and increase HDL-C concentrations. PPAR α activation promotes PCSK9 repression by inhibiting its transcription and increasing PC5 and furin expression. Fibrates also directly increase the synthesis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

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

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

Fibrates Repress PCSK9 and Increase PC5/6A and Furin Expression

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCES

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

II) Article 2 : Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Null Mice Are Protected From Postprandial Triglyceridemia

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

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

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

Conclusion—These findings indicate that in addition to its effect on LDL-cholesterol, PCSK9 deficiency might protect against cardiovascular disease by reducing postprandial triglyceridemia. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:684-690.)

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Null Mice Are Protected From Postprandial Triglyceridemia

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

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

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

Conclusion—These findings indicate that in addition to its effect on LDL-cholesterol, PCSK9 deficiency might protect against cardiovascular disease by reducing postprandial triglyceridemia. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:684-690.)

Key Words: PCSK9 ■ chylomicron ■ postprandial ■ intestine ■ CaCo-2

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

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

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

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

Chylomicrons are secreted into the mesenteric lymph to eventually deliver lipids to the peripheral tissues and organs.⁹ It is believed that the number of chylomicrons does not change during the postprandial phase, but their size increases because of their TG enrichment.¹⁰ Because a single copy of apoB48 is present per chylomicron,¹¹ the intestinal output of apoB remains constant during the absorptive process. ApoB48 is the preferred protein for the intestine to coat chylomicrons in mice.¹² Chylomicron remnants are cleared from the blood by the LDLr and the LDLr-related protein

Received November 25, 2008; revision accepted February 18, 2009.

From the INSERM U915 (C.L.M., S.K., C.L., M.C., M.K., B.C., P.C.), CHU de Nantes, France; Université de Nantes, EA Biometadys (A.J.), Nantes, France; INSERM U563 (C.C., X.C.), Toulouse, France; the Center for Liver, Digestive, and Metabolic Diseases (F.K.), University of Groningen, The Netherlands; Université de Nantes, l'Institut du thorax (M.K., B.C.), Clinique d'Endocrinologie et Nutrition, Nantes, France; the Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Nantes (M.K., P.C.), Nantes, France; and INRA UR66 (C.C.), France.

Correspondence to: Philippe Costet, INSERM U915, CHU Hôtel Dieu, 3ENORD, 9, Quai Moncousu, 44000, Nantes, 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.108.181586

(LRP).¹³ PCSK9-deficient mice display an increase in hepatic LDLr protein, but not in LRP.⁸

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

Methods

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

Human Tissues

The human tissue fragments were processed according to the French Guidelines for Research on Human Tissues.¹⁴ Informed patient consent was obtained, according to the French bioethics law.¹⁵ A detailed protocol and information concerning patients are available in the supplemental materials.

Animals

PCSK9^{+/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me), interbred to produce PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} (wild-type [wt]) littermates, and genotyped as described elsewhere.⁸ Mice had free access to food and water under a 12-hour light/12-hour dark cycle in a temperature-controlled environment. All animal studies were conducted with age-matched male mice (2-month-old), and approved by the Unité de Thérapeutique Expérimentale (Agreement No. BP44015). Before surgery, mice were anesthetized with a single intraperitoneal injection of 100 μ L of ketamin/ivermectine (Imalgène 1000, Merial).

Statistics

Each experiment was representative of at least 2 independent experiments with a minimum of triplicates per condition. Values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical significance was analyzed using a Student unpaired *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered as significant.

Results

PCSK9 Is Expressed in the Small Intestine of Mice and Humans

Using real-time quantitative PCR, we first examined PCSK9 and the LDLr mRNA quantities along the gastrointestinal tract in mice (Figure 1A). PCSK9 expression in the stomach was virtually undetectable. However, PCSK9 was expressed throughout the small intestine and colon, at a level which did not vary significantly along the intestinal cephalo-caudal axis, and which was similar to that in the liver (Figure 1A). As previously published,¹⁷ the LDLr was abundantly expressed along the digestive tract.

Using confocal microscopy, we determined for the first time the localization of PCSK9 protein in frozen sections of normal, human, small intestines. PCSK9 was expressed almost exclusively in the epithelial barrier of the human duodenum and ileum, both in enterocytes and goblet cells (Figure 1B). PCSK9 immunostaining was observed in the cytoplasm of epithelial cells and accumulated at the apical and basolateral sides of the cells (Figure 1B). Blocking of the PCSK9 antibody with an excess of antigen peptide abolished the staining (Figure 1B, upper panel, right), confirming the specificity of the antibody. We also examined the localization of PCSK9 in the human colonic, enterocyte-like cell line,

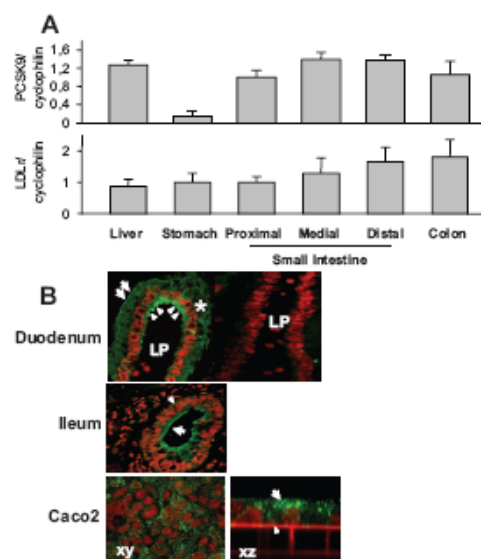


Figure 1. PCSK9 is highly expressed in the small intestine and enterocytes. **A**, Real-time PCR measurement of PCSK9, LDLr gene expression in PCSK9^{+/+} mice. **B**, Immunofluorescence staining in human duodenum and ileum, and CaCo-2. See also supplement Methods.

CaCo-2, maintained as polarized by culturing on filters. As shown in Figure 1B (lower panel), the xy image (left) shows a punctuated staining within CaCo-2 cells, and the xz image (right) shows a strong PCSK9 immunostaining mainly in the apical compartment of the cells.

PCSK9 Is Upregulated by Pravastatin in CaCo-2 Cells and the LDLr Expression Is Increased in Intestines of PCSK9^{-/-} Mice

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

PCSK9 Deficiency Protects Mice Against Postprandial Lipemia

Random-fed PCSK9^{-/-} mice had lower total cholesterol than wt littermates ($\sim$ 35% in 3-month-old mice, *P* < 0.001), and similar plasma TG concentrations (supplemental Figure 1IA). Plasma TG levels were measured over a 4-hour period in 14 hour-fasted mice after they received an intragastric bolus of olive oil (200 μ L; Figure 2). At T0, plasma levels of TG were comparable between PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice. Two hours after gavage, PCSK9^{+/+} mice showed a 209% increase in plasma TG, whereas PCSK9^{-/-} littermates displayed a

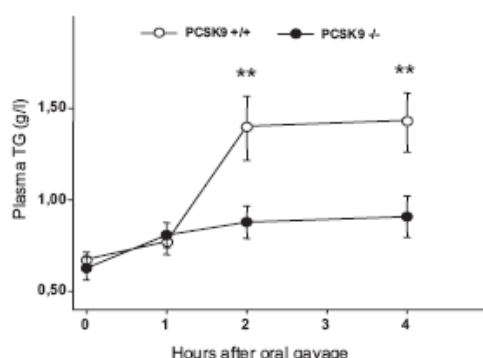


Figure 2. Postprandial lipemia is reduced in PCSK9^{-/-} mice. 14 hour-fasted PCSK9^{+/+} (white circles, n=12 mice) and PCSK9^{-/-} littermates (black circles, n=14 mice) received an intragastric olive oil load. Blood samples were collected before gavage (time 0) and at 1, 2, 3, and 4 hours after gavage and plasma triglycerides concentrations determined. ***P*<0.01.

strongly attenuated TG postprandial response. Mean TG appearance rates were, respectively, 0.19 ± 0.032 and 0.082 ± 0.022 g/L/h for PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice, ie, 62% less (n=12 PCSK9^{+/+} and n=14 PCSK9^{-/-} mice from 2 independent experiments).

Fractionation by fast protein liquid chromatography (FPLC) showed that the difference in triglyceridemia observed 2 hours after gavage was attributable to a decrease in the TG content of chylomicrons/VLDL lipoproteins (supplemental Figure IIB and supplemental Methods and Results).

Gastric Emptying, Intestinal Transit, and Fat Absorption After Oral Oil Challenge

The defect in postprandial lipemia observed in PCSK9^{-/-} mice could be attributable to (1) decreased intestinal lipid absorption, or chylomicron production, or (2) accelerated lipolysis or clearance of TG-rich lipoproteins. We first measured the radioactivity content of intestinal segments of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} littermates 2 hours after a gavage with olive oil containing ³H-triolein (Figure 3A). Triolein is a triglyceride and unsaturated fat formed from oleic acid, the main constituent of olive oil. This method reflects (1) the enterocytic uptake of ³H-oleate, (2) the intracellular non esterified or reesterified ³H-oleate, (3) the reuptake of radio-labeled nascent particles. PCSK9^{-/-} mice had a tendency to accumulate less ³H in the proximal and medial part of their intestine compared to wt mice, suggesting that lipid uptake could be defective in these segments. To determine intestinal fat absorption, we measured food intake and collected feces every 24 hours for 3 consecutive days. Food intake, weight of excreted feces, and fecal fat excretion were not significantly different between mice (supplemental Table II). PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice absorb fat with the same efficiency (Figure 3B) demonstrating that reduced lipemia in PCSK9^{-/-} mice is not attributable to fat malabsorption. As a control, PCSK9^{+/+} mice fed with orlistat, an inhibitor of pancreatic lipases, showed a 45% decrease in total fat absorption compared to PCSK9^{+/+} mice under normal chow (Figure 3B).

Altered postprandial lipemia could also be attributable to gastric emptying or intestinal motility defect. We performed an oral gavage with a nonabsorbable 70-KDa FITC conjugated dextran marker diluted in olive oil. After 30 minutes, about 10% of the marker was still present in the stomach of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (Figure 3C), demonstrating that PCSK9 deficiency does not alter gastric emptying. Intestinal transit was also similar in both genotypes (Figure 3C).

Thus, although there was a trend toward less accumulation of ³H-triolein in the proximal and medial intestine of PCSK9^{-/-} mice after an olive oil gavage, they do not show a defect in fat absorption, gastric emptying or intestinal transit.

Chylomicron Secretion in PCSK9^{-/-} Mice

To directly explore the impact of PCSK9 deficiency on chylomicron output, we cannulated the lymph ducts from 2 hour-fasted PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} littermates. After establishing a 30-minute baseline collection, we injected a bolus of olive oil in their duodenums, and collected the lymph at timed intervals for 210 minutes (Figure 4A). Lymph flow was reduced by 20% in knockout mice ($0.59 \mu\text{L}/\text{min}$ versus $0.47 \mu\text{L}/\text{min}$, *P*<0.05). No difference in cumulative TG contents was observed in the first 1.5 hour. In a second phase, the accumulation tended to be reduced in PCSK9^{-/-} mice, although it did not reach significance (Figure 4A).

Lymph samples collected at various times after olive oil injection were pooled, and equal amounts were loaded on a gel for separation of the proteins by electrophoresis (Figure 4B). As expected, the quantity of apoB was relatively constant during the absorption process within each genotype, and apoB48 was more abundant than apoB100.¹⁰ However, apoB100 and apoB48 contents were significantly lower in lymph from PCSK9^{-/-} mice (-39%, *P*<0.05 and -40%, *P*<0.01), suggesting that PCSK9 deficiency results in less chylomicrons being secreted. The positive relation between PCSK9 expression and the apoB output was confirmed in CaCo-2 cells (supplemental Figure III and supplemental Methods and Results). We also determined the content of the other apolipoprotein by electrophoresis. No striking difference between genotypes was observed. There was a tendency toward an accumulation of apoE in lymph from PCSK9^{-/-} mice (Figure 4C).

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

Chylomicron Catabolism in PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} Mice

We next measured the hepatic TG content after olive oil gavage. There was no change in hepatic TG contents in fed PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (Figure 5A). Fasting in-

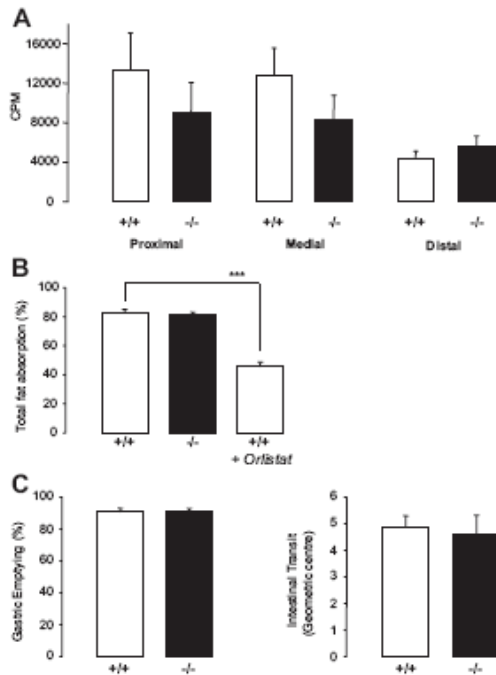


Figure 3. PCSK9^{-/-} mice do not present with altered intestinal fat absorption. **A**, Radioactivity in intestinal segments of PCSK9^{+/+} and PCSK9^{-/-} mice (n=8 mice) 2 hours after gavage. **B**, Total fat absorption in mice on chow diet (n=18 mice). ***P<0.001. **C**, Gastric emptying and intestinal transit (n=4 mice).

duced an accumulation of TG by 100% in both genotypes ($P<0.01$). Two hours after olive oil gavage, hepatic TG contents were similar to those of PCSK9^{+/+} mice in the fed state, but remained elevated in PCSK9^{-/-} mice. Consequently, there was 54% more TG in livers of knockout mice after gavage ($P<0.05$), suggesting that TG originated from olive oil fatty acids. To confirm this, ³H-triolein diluted in olive oil was orally administered to fasted mice, and 2 hours later the amount of hepatic radioactivity was measured. PCSK9^{-/-} mice exhibited almost 200% more radioactivity than wt littermates showing that the hepatic uptake of chylomicrons was increased in these mice (supplemental Figure IV).

We verified whether the clearance of chylomicrons is enhanced in knockout mice (Figure 5B). Chylomicrons obtained by mesenteric lymph duct cannulation of wt and knockout mice (chyl^{+/+} and chyl^{-/-}) were labeled with ¹²⁵I and injected into the circulatory systems of mice from both genotypes. To mimic the postprandial status, we injected chyl^{+/+} in PCSK9^{+/+} mice and chyl^{-/-} in PCSK9^{-/-} mice. Consistent with the phenotype observed in Figure 2, PCSK9^{-/-} mice cleared chyl^{-/-} 37% faster than PCSK9^{+/+} cleared chyl^{+/+} ($P<0.05$). We also performed the experiment crossing the donors and receivers. PCSK9^{-/-} mice cleared chyl^{-/-} 21% faster than PCSK9^{+/+} mice did

($P<0.01$). These results reflect probably the higher hepatic LDLr content observed in PCSK9^{-/-} mice (supplemental Figure IB). Surprisingly, we observed (1) no difference in chyl^{+/+} clearance rates between the genotypes; and (2) PCSK9^{-/-} mice cleared chyl^{-/-} 56% more efficiently than chyl^{+/+} ($P<0.001$).

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

Discussion

This study shows that PCSK9 is highly expressed in enterocytes and plays a critical role in postprandial lipemia in mice. We first determined the expression of PCSK9 in the gastrointestinal tract. We showed that in mice PCSK9 is expressed throughout the digestive tract and colon at levels equivalent to those found in the liver. In the human intestine, PCSK9 is localized in the cytoplasm probably in the endoplasmic reticulum and the golgi, and it accumulates at the subapical and basolateral compartments of the enterocyte. The heterogeneity of this cellular distribution depending on the intestinal segment considered is puzzling. PCSK9 is expressed at both the apical and basolateral pole in the duodenum, and mainly at the apical pole in the ileum. It is possible that PCSK9 is directed toward both poles of the enterocyte in the upper part of the small intestine, in relation with the absorptive process and the lipoprotein secretion, and only to the apical side in the ileum that secretes less lipoproteins. It appears that CaCo-2 cells would be more representative of an ileal enterocyte, in respect to PCSK9 cellular expression. Indeed, in differentiated CaCo-2 cells, most of the signal was concentrated at the apical side. We observed high levels of expression in the ileum where the bile acid reuptake takes place. Since we recently showed that bile acids repress PCSK9,²⁰ it is tempting to speculate that PCSK9 might play a role in their metabolism. We also observed some PCSK9 protein in goblet cells, although its function in this cell type remains unknown.

PCSK9-deficient mice clearly exhibited reduced postprandial lipemia after olive oil gavage. A balance study showed that intestinal fat absorption was not significantly different between genotypes, and that PCSK9 deficiency does not alter the gastric emptying and intestinal transit. We have no clear explanation concerning the trend toward a decrease of accumulation of ³H-triolein in the proximal and medial segments of PCSK9^{-/-} mice. It could explain the weak trend observed during lymph cannulation, with PCSK9^{-/-} mice secreting less TG. Thus, it might reflect some aspects of PCSK9 function in the intestine, in relation or not with the strong phenotype observed concerning the intestinal apoB secretion and postprandial lipemia in PCSK9^{-/-} mice. We investigated whether this phenotype could be attributable to chylomicron production or catabolism. We directly collected the mesenteric lymph after olive oil gavage. TG outputs in lymph were virtually similar in both genotypes. We observed a 20% reduction of lymph flow in PCSK9^{-/-} mice. There is a large number of plausible causes for lymph flow reduction,²¹ and more work is needed to determine which one is responsible for this phenotype. Direct measurement on lymph samples

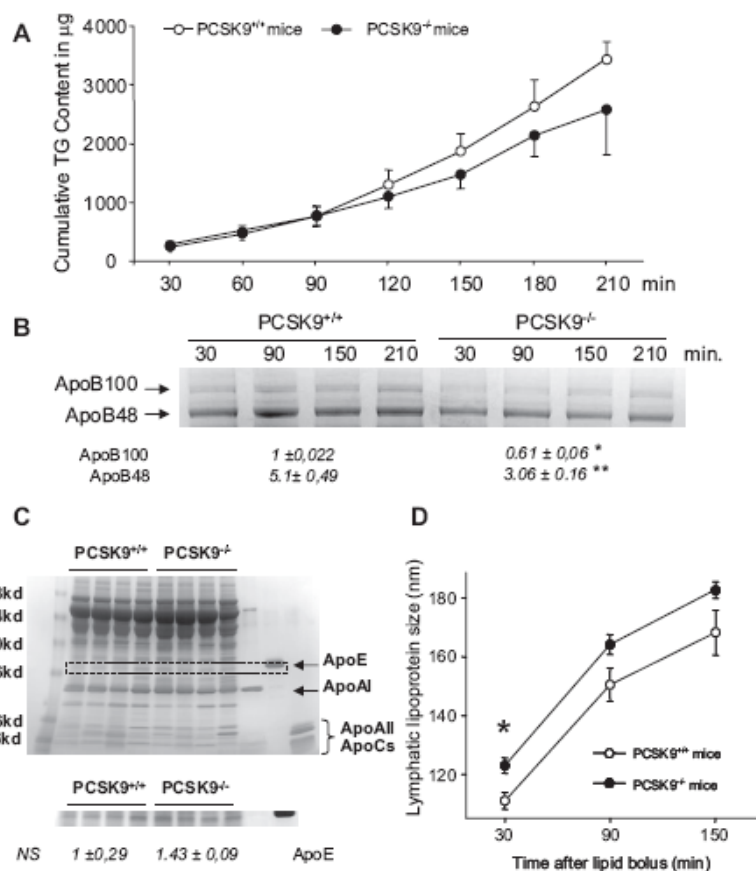


Figure 4. Mesenteric lymph output, composition, and size. **A**, Plasma cumulative TG ($n=10$ mice each genotype). **B**, ApoB100, apoB48 in pooled lymph samples. **C**, ApoE, AI, AII, apoCs in lymph samples ($n=4$ mice), collected after olive oil gavage ($t=30$ minutes). **D**, Lipoproteins size (nm) in lymph samples. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

collected in mice after oil gavage revealed that PCSK9^{-/-} mice secreted less apoB than wt littermates did. The reduction in lymph flow could not account for this, as it was estimated with equal amounts of lymph from both genotypes. Experiments in differentiated CaCo-2 cells confirmed that PCSK9 deficiency results in a decrease in apoB secretion. Interestingly, Rashid et al showed that primary hepatocytes from PCSK9^{-/-} mice exhibit reduced apoB48 secretion.⁸ However, on a high-fat diet, transient PCSK9 knockdown in mice led to a decrease in serum apoB100 content and an increase in apoB48 content, probably because of the upregulation of apobec1.²² Apobec 1 is the enzyme responsible for the production of apoB48 in human intestine and is also expressed in rodent liver.²³ We did not observe a change in the ratio of apoB48 to apoB100 in lymph samples of PCSK9^{-/-} and PCSK9^{+/+} mice, suggesting that apobec1 is not involved in the differences we observed. The lower lymphatic apoB output in PCSK9^{-/-} mice indicates that they secrete less chylomicrons. A direct measurement of their size showed an

average diameter 10% larger than that found in wild-type littermates. The corresponding 25% increase in volume could compensate for the lower number of particles and results in the absence of a significant difference concerning the resulting TG output. Another plausible explanation is the higher expression of LDLr we observed in the intestine of PCSK9^{-/-} mice. In humans and rodents, LDLr is present at the basolateral side of enterocytes, and is able to efficiently capture LDL particles.¹⁷ However, the functional importance of the LDLr in the intestine is unclear. In the liver, Twisk et al showed that the LDLr controls apoB secretion by promoting the reuptake of newly synthesized apoB containing lipoprotein particles.²⁴ We can speculate that intestinal TG-rich lipoproteins are more avidly recaptured in PCSK9^{-/-} mice than in wt mice leading to the secretion of larger particles. Consistent with our results, LDLr-deficient mice present with increased postprandial lipemia after oil gavage compared to wt mice.²⁵ Furthermore, kinetic studies suggested that patients with familial hypercholesterolemia are

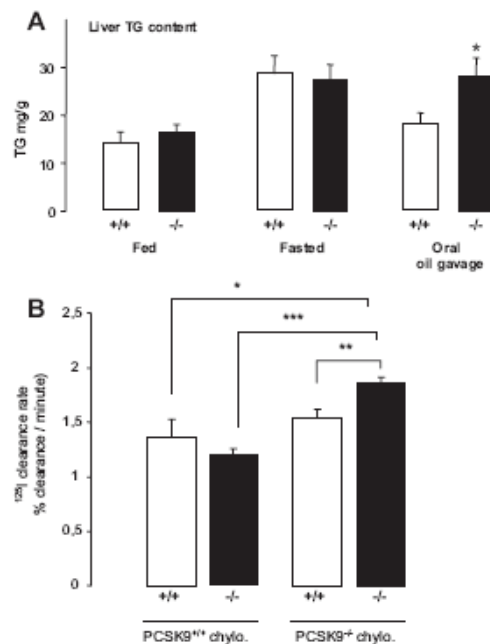


Figure 5. Lipoprotein kinetics in PCSK9^{-/-} mice. **A**, Hepatic TG contents 2 hours after the gavage (n=10 mice of each genotype). **B**, ¹²⁵I-labeled chylomicrons clearance. Data represent mean percentages of total ¹²⁵I clearance rate for each group $\pm$ SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

characterized by an increased intestinal chylomicron production.²⁶ Our experiments also indicated a contribution from the liver to the reduced postprandial lipemia observed in PCSK9^{-/-} mice. It is believed that chylomicron remnant clearance in mice is accountable for 75% of the LDLr, mainly in an apoE-dependent fashion.²⁵ Thus, it makes sense that PCSK9^{-/-} mice that exhibit more LDLr clear their own remnants faster than wt mice. However, a hypothesis entirely based on an LDLr-dependent pathway is unsatisfactory given the fact that PCSK9^{-/-} mice do not clear chylomicrons from wt mice significantly faster than control mice. It seems that there is a combination of specificities attributable to both the lack of hepatic PCSK9 and the nature of PCSK9^{-/-} chylomicrons. We were unable to detect any difference between genotypes in chylomicron lipoprotein contents. They differed only by their larger size, together with a trend to a higher TG to PL ratio, suggesting that other factors may be at play. Future work will determine whether wt chylomicrons actually contain some PCSK9 protein that could interact with their clearance.

To summarize, we believe that the dramatic reduction of postprandial lipemia we observed in PCSK9^{-/-} mice results from the combination of various effects, including the intestinal secretion of larger chylomicrons, and their higher hepatic clearance rate. We can only speculate that the intestinal LDLr plays a role in the reuptake of nascent particles. It is tempting to postulate that a specific intestinal

target of PCSK9 that is still to be discovered is involved. All together these results make postprandial kinetic investigations in human with partial or complete loss of PCSK9 highly desirable. We propose that PCSK9 inhibitors would help manage LDL cholesterol and also postprandial triglyceridemia, 2 important risk factors of cardiovascular disease.

Acknowledgments

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

Sources of Funding

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

Disclosures

None.

References

- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Vilgier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Leecer 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.
- Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:71–77.
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Binding of PCSK9 to EGF-A repeat of LDL receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. 2007;282:18602–18612.
- 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.
- 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;37:161–165.
- Bansal S, Buring JE, Rifai N, Moss S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298:309–316.
- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298:299–308.
- Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, Horton JD. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5374–5379.
- Manubach CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G645–G650.
- Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA, Nutting DF, Bergstedt S, Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol*. 1990;259:G709–G719.
- Phillips ML, Pullinger C, Kroes I, Kroes J, Hardman DA, Chen G, Curtis LK, Gutierrez MM, Kane JP, Schumaker VN. A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. *J Lipid Res*. 1997;38:1170–1177.
- Lo CM, Nordestog BK, Nauli AM, Zheng S, Vonlehmden SB, Yang Q, Lee D, Swift LL, Davidson NO, Tso P. Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294:G344–G352.

13. Martins IJ, Hone E, Chi C, Seydel U, Martins RN, Redgrave TG. Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J Lipid Res.* 2000;41:205–213.
14. [Recommendations for cryopreservation of cells tumor tissues to be used for molecular analyses]. *Ann Pathol.* 2001;21:184–201.
15. French Bioethic Law No. 2004-800. 2008.
16. Deleted in proof.
17. Fong LG, Bonney E, Kosek JC, Cooper AD. Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptors in adrenal gland, liver, and intestine. *J Clin Invest.* 1989;84:847–856.
18. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1454–1459.
19. Kourimate S, Le May C, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, Nguyen P, Krempf M, Cariou B, Costet P. Dual mechanisms for the fibrin-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem.* 2008;283:9666–9673.
20. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, Cariou B. Activation of the farnesoid X receptor represses pcsk9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008;19:949–955.
21. Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness. *JOP.* 2007;8:374–399.
22. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Croke ST, Croke RM. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res.* 2007;48:763–767.
23. Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993;34:1367–1383.
24. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest.* 2000;105:521–532.
25. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, Yamada N. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem.* 1996;271:22422–22427.
26. Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel I, Hogue JC, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Lack of evidence for reduced plasma apo B48 catabolism in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia carrying the same null LDL receptor gene mutation. *Atherosclerosis.* 2004;172:367–373.

III) Article 3 : PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia



Arteriosclerosis, Thrombosis,
and Vascular Biology

PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia

Bertrand Cariou^{1,2,3†}, Khadija Ouguerram^{1,2†}, Yassine Zaïr^{1,2,3}, Raphael Guerois⁴, Cédric Langhi^{1,2}, Sanae Kourimate^{1,2}, Isabelle Benoit^{1,2}, Cédric Le May¹, Constance Gayet¹, Khaldia Belabbas⁵, Fabienne Dufernez⁵, Maud Chétiveaux^{1,2}, Patrizia Tarugi⁷, Michel Krempf^{1,2,3}, Pascale Benlian^{5,6}, and Philippe Costet^{1,3,&}

CARIOU: PCSK9 dominant negative mutant increases LDL clearance

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

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

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

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

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

⁶ UPMC Univ Paris 06, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, F-75012, Paris, France ;

⁷ Department of Biomedical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, I-41100 Modena, Italy;

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 Dufernez, Maud Chétiveaux, Patrizia Tarugi, Michel Krempf, Pascale Benlian, Philippe Costet

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 FBHL (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 FBHL, with no mutation found at other FHBL-causing loci. A dose-effect was also found in FBHL 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 LDLC 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 1:500/1:1000.² 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.

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

Correspondence to Philippe Costet, IRTUN L'Institut du Thorax-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

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.¹³

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 normolipidemic 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 1 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-

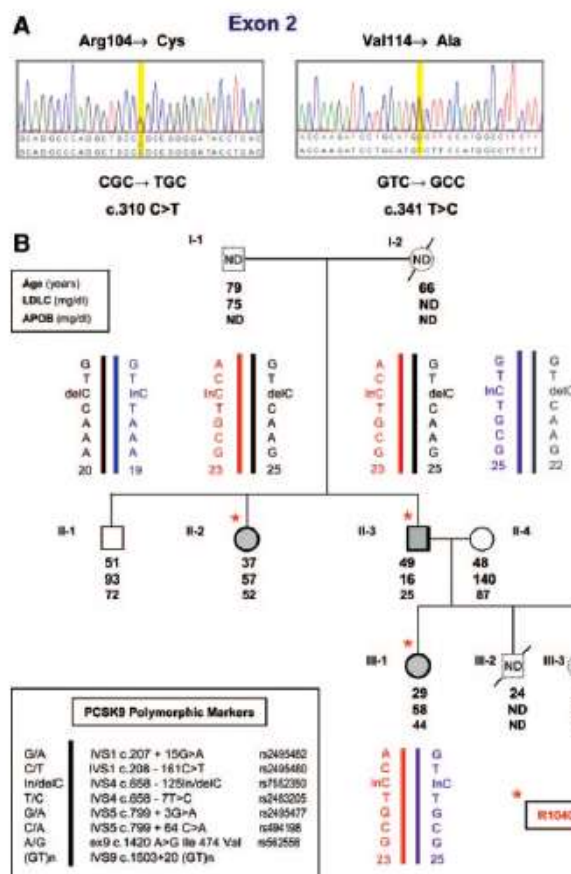


Figure 1. Genotypic findings and cosegregation analysis in the HBL family. **A**, DNA sequence chromatogram (Genssearch output) centered on PCSK9 mutations found in FHBL proband. Exon 2 reference sequence is shown in black letters (bottom line), patient sequence is colored according to PHRED base-calling (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.

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 IV). 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.

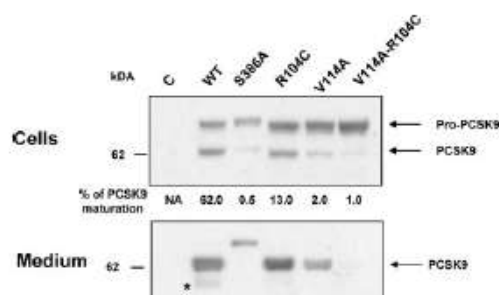


Figure 2. PCSK9 processing is abolished by the double R104C/V114A mutation. Human immortalized hepatocytes were transfected with the plasmid pcDNA3.1 empty (control) or coding for wild-type PCSK9 (WT), the loss-of-function variants S386A, R104C, V114A, or the double mutant R104C/V114A. Proteins were 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 [2H] 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 ($\sim 25\%$; Table 2). This low apoB100 production is related to a lower proportion of apoB100 secreted in VLDL. Importantly, the fractional catabolic rate

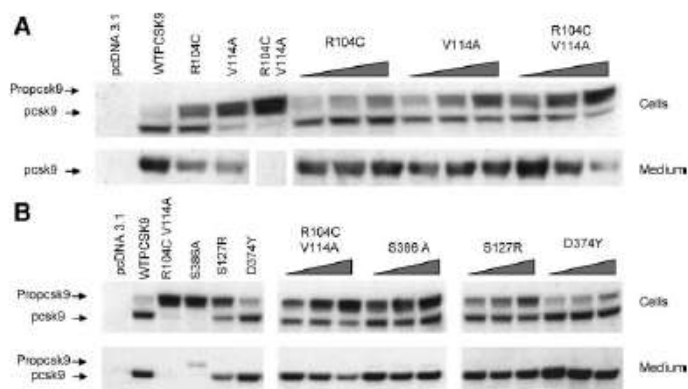


Figure 3. PCSK9R104C/V114A acts as a dominant negative. Human immortalized hepatocytes were transfected with wild-type PCSK9 or mutants coding for PCSK9 variants R104C, V114A, R104C V114A, S127R, S386A, D374Y. Lanes 1 to 5 (A) or 1 to 6 (B) correspond to cells transfected with 5 µg/well empty pcDNA3.1 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 PPARgamma—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 R0651ONS), 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

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

References

1. Tarugi P, Averna M, Di LE, Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, Catlin L, Bertolini S, Calandra S. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*. 2007;195:e19-e27.
2. Linton MF, Farese 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, Sankatsing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Akroo 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, Carriou 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, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerc JM, Luc G, Moulon 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, Ose L, Leien 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-Wosorniu Y, Lagace TA, Kinch L, Grisham 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, Marais 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, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, DiStefano PS, Wood A, Bingham B. Functional characterization of Narcl 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 PC56A: 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, Pollaccia D, Bocchi L, Valentini 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 Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5374-5379.
21. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest*. 2000;105:521-532.
22. Dubuc G, Tremblay M, Pare 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 SO, 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. Croston GE, Milan LB, Marchak 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. Albora WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, Conrad 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 parabiotic 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. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Galland-Jos C, Gamber 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, Laouenan 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.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Methods

BIOCHEMISTRY

Plasma marker analyzes.

Biochemical analysis was performed by the Biochemical Analysis Facility of Nantes University Hospital. PCSK9 concentration in plasma from overnight-fasted individuals, collected in an EDTA tube, was determined in duplicates using an ELISA kit targeting human PCSK9, according to the manufacturer recommendations (CycLex Co, Japan). The ELISA kit employs a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique.

Fast Protein Liquid Chromatography.

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

MOLECULAR GENETICS

DNA was extracted from blood leucocytes by a phase exchange method (Puregene, Gentra systems, Minneapolis, USA) in family members and in 150 healthy blood donors from the Etablissement Français du Sang (Paris, Saint Antoine). Genomic sequences of *PCSK9* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, RefSeq# NC_000001.9, GeneID 255738), *LDLR* (NCBI

Refseq # NC_000019.8, GeneID 3949) and *APOB* (GenBank accession number NM_000384), were PCR-amplified and sequenced as previously described^{1, 2, 31, 39}.

Proximal promoter, exonic and perixonic regions were sequenced on forward and reverse strands, by the Big-Dye terminator cycle-sequencing protocol on a 16-capillary DNA sequencer (ABI 3130, Applied Biosystems, France). For mutation detection, electronic DNA sequence tracks were read using software Seqscape™ (Applied Biosystems). For *APOB* mutation identification amino acid sequence changes in apoB are described according to the National Center for Biotechnology Information reference sequence (NP_000375.2, GI:105990532). *APOE* polymorphism (alleles E2, E3 and E4; dbSNP rs429358 and rs7412, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) was assessed by allele-specific hybridization of PCR products on nitrocellulose strips (InnoGenetics, Belgium). Quality control analyses provided consistent genotyping results from three independent blood samples obtained in family members. A panel of informative Short Tandem Repeats (STR) from 6 independent human chromosomes (AmpliF/STR COfiler, Applied Biosystems) was used to check for genetic relatedness and for quality control purposes.

BIOINFORMATICS

The Gensearch® software (v3.5, Phenosystems, Belgium) was used to analyze raw sequence data for mutation detection and functionality qualification against HUGO criteria and public genomic databases (<http://www.phenosystems.com>). The algorithm uses base caller “Phred” (www.phrap.com/Phred) and incorporates computed criteria for DNA variation (substitutions or In/Del) qualification as possible or probable heterozygous or homozygous mutations, after filtering for known DNA polymorphisms. These criteria derive from computed comparisons of peak areas and relative positions along the sequence track, with genomic reference sequences and with wild-type sequence tracks. In addition, the software

provides links with open-access tools to public databases for genomic comparisons, structure and ontology analyses. In the present study, the BLAT and PhastCons (<http://genome.ucsc.edu/>) tools were used for estimation of evolutionary sequence conservation and genetic polymorphism analysis. Protein sequence alignments (NCBI accession#: NP_777596 (human/ Homo Sapiens Sapiens); NP_001104592 (Chimpanzee/Pan Troglodytes); NP_001106130 (Rhesus Monkey/Macaca Mulatta); NP_705793 (Mouse/Mus Musculus), were performed with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Several amino acid substitution prediction algorithms based on protein sequence comparisons and estimated functional changes from amino-acid structural differences, were used: POLYPHEN <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>; PMut <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>; SNPs3D <http://www.snps3d.org/>; SIFT <http://blocks.fhcrc.org/sift/>. Estimation of potential functionality of an amino acid change was considered as valid, if at least 3 algorithms provided consistent predictions.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Expression constructs for PCSK9-WT and mutant forms of PCSK9

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

Western blot analysis of transfected IHH

Immortalized human hepatocytes (IHH) ³ were cultured on collagen-coated flasks in William's E medium in the presence of a 10% fetal calf serum (FCS). They were seeded (1 X 10⁶ cells/well) in 6-well plates. Expression plasmids (2.5 µg/well) were transiently transfected

into IHH cells with lipofectamine (5µL/well) in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5 mM glucose, according to the manufacturer's protocol (InVitrogen). For co-transfection experiments, a total quantity of 5µg/well was used using empty pcDNA3.1 to reach this value. After 4.5 h, transfection medium was replaced with William's E medium without FCS for 24 h. Cells were scraped and homogenized in 1X phosphate-buffered saline containing 0.25% sodium-deoxycholate, 1% Triton X-100, and a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostic). Proteins were analysed by western blot (70 µg per lane) as described elsewhere ⁴, using a mouse anti-V5 monoclonal antibody (InVitrogen). For secretion analysis, proteins from 500 µl of cell culture media were precipitated with acetone and 30 µg of proteins used for Western blot.

KINETICS OF LIPOPROTEINS

The endogenous labelling of apoB100 was carried out by constant infusion of [2H³]-leucine in subjects fasted overnight for 12 h prior to the study, and who remained fasting during the entire procedure. Each subject received intravenously a prime of 10 µmol.kg⁻¹ of tracer immediately followed by a constant tracer infusion (10 µmol.kg⁻¹.h⁻¹) for 14 h. Venous blood samples were drawn into EDTA tubes (Venoject, Paris, France) at baseline and at 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 2.5 h, and then hourly until 14 h. Sodium azide, an inhibitor of bacterial growth, and Pefabloc SC (Interchim, Montluçon, France), a protease inhibitor, were added to blood samples at a final concentration of 1.5 and 0.5 mmol/L, respectively.

• *Isolation of apoB100 and measurement of enrichment.*

Lipoproteins were separated by ultracentrifugation and apoB100 was isolated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acids obtained by hydrolysis were esterified and derivatized and analyzed by electron-impact gas chromatography-mass spectrometry (5891A gas chromatograph connected with a 5971A

quadrupole mass spectrometer). The isotopic ratio was determined by selected ion-monitoring at m/z of 282 and 285. Calculations of apoB100 kinetic parameters were based on the tracer-to-tracee mass ratio ⁵.

• *Measurements of lipids and apoB100*

Cholesterol and triacylglycerol concentrations were measured using commercially available enzymatic kits (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) at three different sampling times. The percentage recovery of cholesterol, triacylglycerol and apoB100 after FPLC separation was higher than 85%. ApoB100 concentrations were obtained in lipoprotein fractions by combining selective precipitation and mass spectrometry (Beghin, 2000).

• *Modeling*

Kinetic analysis of tracer-to-tracee ratios was achieved using computer software for simulation, analysis and modeling (SAAMII, Resource Facility for Kinetic Analysis, SAAM Institute, Seattle, WA). The model used (**supplemental figure V**) and the measure of the kinetic parameters were previously described ⁶. This model takes into account the heterogeneity of VLDLs, e.g. large (VLDL1) and small VLDL (VLDL2) and the shunt between VLDL and LDL. In this model, a forcing function, corresponding to the time course of plasma leucine enrichment, was used to drive the appearance of leucine tracer into apoB100 during the process of synthesis. Methods provided identified values $\pm$ standard deviation obtained by iterative least squares fitting for individual kinetic parameters. Standard deviations were less than 30% for most of the parameters (data not shown). The use of more complex models did not provide significant improvement in the fitting from F test and Akaike information criterion ⁷. For comparison with controls, the VLDL1 and VLDL2 data were presented as VLDL conversion rate (CR) and VLDL fractional catabolic rate (FCR), which represents the sum of conversion rate and direct removal rate. The VLDL conversion rate was

calculated as VLDL2 delipidation flux divided by total VLDL mass. The VLDL direct removal was calculated as a sum of VLDL1 and VLDL2 direct removal divided by total VLDL mass. The apoB100 production rate (PR) in mg/kg/h represents the product of FCR and pool size of apoB100 in lipoprotein fractions. Pools of apoB100 in VLDL, IDL, LDL were calculated by multiplying the apoB100 concentration by 0.045 (L/kg) assuming a plasma volume of 4.5% of body weight ⁸.

STATISTICS

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

Supplemental Results

Clinical and biological parameters of the proband's family members

Clinical and biological parameters were explored in volunteer family members of the proband (II.3) (**Table 1**). Of note, his son (III.2) was victim of an accidental death and one daughter (III.3) was not available for further investigations. One of his daughters (III.1, LDLC: 44 mg/dl) and his sister (II.2, LDLC: 57 mg/dl) had also FHBL. His wife (II.4, LDLC: 140 mg/dl) and his brother (II-1, LDLC: 93 mg/dl) were normolipidemic. Except for the proband (II.3), fasting plasma glucose was strictly normal in FHBL relatives (II.2: 4.8 mmol/l, III.1: 4.7 mmol/l). As expected, FHBL subjects had also low plasma apoB concentrations. Consequently, FHBL subjects exhibited highly cardioprotective apoB/apoA1 ratio (<0.25). The proband appeared to have low fasted plasma triglycerides levels for a type 2 diabetic patient, while both his sister (II.2) and his daughter (III.1) had near normal levels. In addition,

there was no striking difference in plasma levels of other apolipoproteins (i.e. apoC2, apoC3, apoE, Lp[a]), between FHBL subjects and normolipidemic relatives.

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

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

Independent analysis of amino acid sequence conservation across animal species

The independent analysis of amino acid sequence conservation across animal species suggested a potential functional effect induced in human, by the single allele double R104C/V114A mutation (**supplemental figure III**). Indeed, the presence of two adjacent DNA changes would generate a mutant protein harbouring 2 amino acid substitutions within a 10 amino acid stretch of the PCSK9 prodomain which is highly conserved in 3 primate species, with lower level of amino acid sequence conservation in other mammals (8 species). In contrast, when the R104C or the V114A mutations were considered alone, amino-acid substitution prediction algorithms failed to provide consistent estimations of functionality, both mutations being alternately predicted as probably damaging, possibly deleterious or neutral. The only valid result was obtained for the L483V genetic variant, being consistently estimated as neutral by the four algorithms.

Supplemental Figure Legend

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

Fast-protein liquid chromatography (FPLC) profile of plasma samples from the proband (II-3, black square) and his daughter (III-1, black circle), carrying the R104C/V114A amino acid substitutions, and a 36-year old male (empty square) and 24-year old female (empty circle) controls. Cholesterol (upper panel) and triglycerides (lower panel) concentrations in the eluted fractions are indicated on the y axis.

Figure II: Segregation Analysis of *APOB* Polymorphic Markers 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 (mg/dl) is indicated below symbols (ND: not determined). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are described according to coding sequence numbering.

Figure III: Amino acid sequence alignment across species

Amino acid sequence alignment of PCSK9 N-terminal domain for human (*homo sapiens*), primates (Chimpanzee: *Pan troglodytes*, and Rhesus monkey: *Macaca mulatta*) and mouse (*Mus musculus*). Residues corresponding to the prodomain are coloured in blue. Residues non-identical to human sequence are coloured in red, and marked by a red “*” below sequences; identical residues are marked by a “-”. R104 and V114 residues are highlighted in green and indicated by an arrow.

Figure IV. R104C and V114A amino acid substitutions

A) Ribbon representation of the complex between PCSK9 and EGF-A domain of LDLR using the PDB code 3BPS⁹. PCSK9 pro-domain is coloured from blue to red from the N- to the C-terminus. The catalytic domain is coloured in gray, the EGF-A domain of is coloured in yellow. The locations of various mutants are shown as sticks. The C-terminal domain of PCSK9 is not shown. B) Comparison between the structures of the *Bacillus subtilis* subtilisin (blue ribbon) and of the human PCSK9. The location of the I-48V mutant is shown as pink sticks. Images were produced using PYMOL

Figure V: Model used for the lipoprotein kinetic analyses

This model takes into account the heterogeneity of VLDLs.

Figure VI: Time course of enrichment of VLDL (x), IDL (●), and LDL (■) apolipoprotein B100 in a representative control subject and in the proband (II.3) and his daughter (III.1) subjects during [2H³]-leucine perfusion.

Reference List

- (1) Allard D, Amsellem S, Abifadel M, Trillard M, Devillers M, Luc G, Krempf M, Reznik Y, Girardet JP, Fredenrich A, Junien C, Varret M, Boileau C, Benlian P, Rabes JP. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 2005 November;26(5):497.
- (2) Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, Rabes JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik Y, Vialettes B, de Gennes JL, Brukert E, Benlian P. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 2002 December;111(6):501-10.
- (3) Schippers JJ, Moshage H, Roelofsen H, Muller M, Heymans HS, Ruiters M, Kuipers F. Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol* 1997 July;13(4-5):375-86.
- (4) Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, Staels B, Krempf M. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory-element binding protein 1c. *J Biol Chem* 2006 January 6;281(10):6211-8.
- (5) Cobelli C, Toffolo G, Foster DM. Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism. *Am J Physiol* 1992 June;262(6 Pt 1):E968-E975.
- (6) Ouguerram K, Magot T, Zair Y, Marchini JS, Charbonnel B, Laouenan H, Krempf M. Effect of atorvastatin on apolipoprotein B100 containing lipoprotein metabolism in type-2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 July;306(1):332-7.
- (7) Pont F, Duvillard L, Verges B, Gambert P. Development of compartmental models in stable-isotope experiments: application to lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 June;18(6):853-60.
- (8) Dagher FJ, Lyons JH, Finlayson DC, Shamsai J, Moore FD. Blood volume measurement: a critical study prediction of normal values: controlled measurement of sequential changes: choice of a bedside method. *Adv Surg* 1965;1:69-109.
- (9) Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, Deisenhofer J. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 February 12;105(6):1820-5.

Figure I

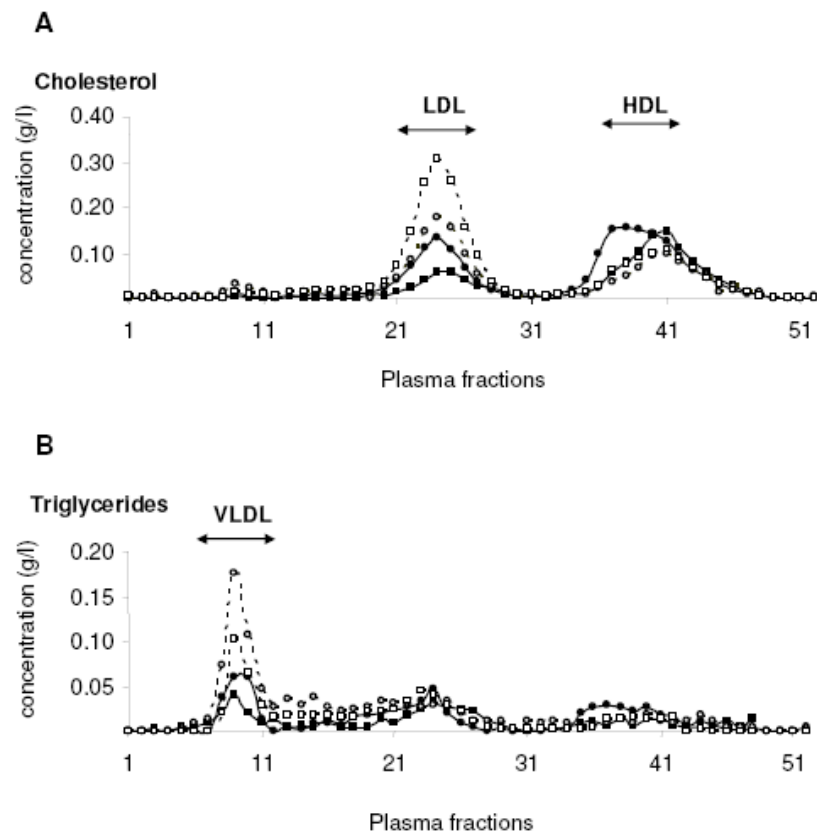


Figure II

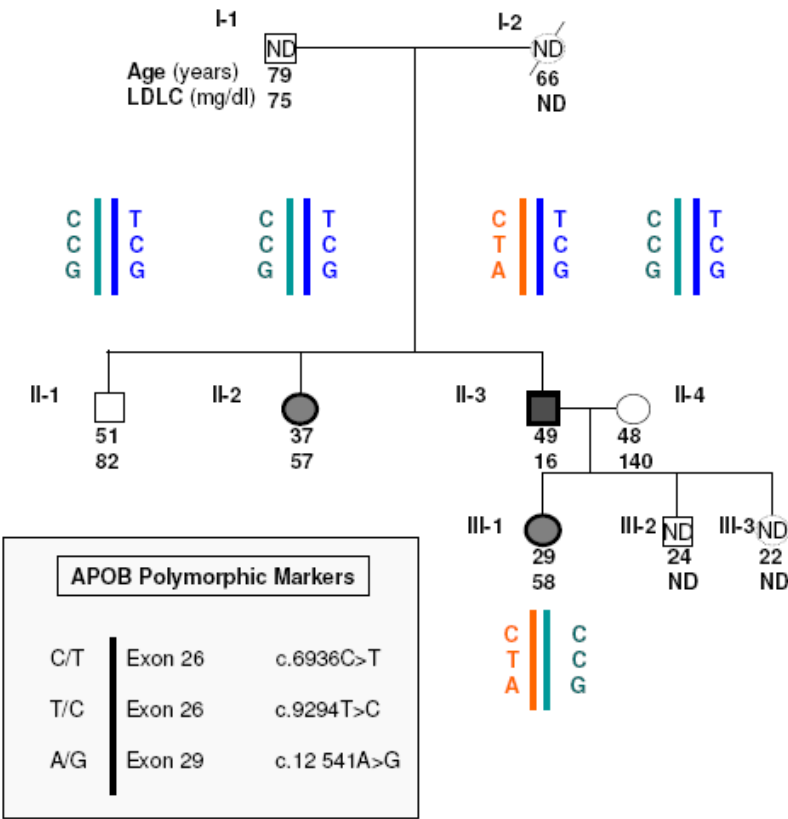
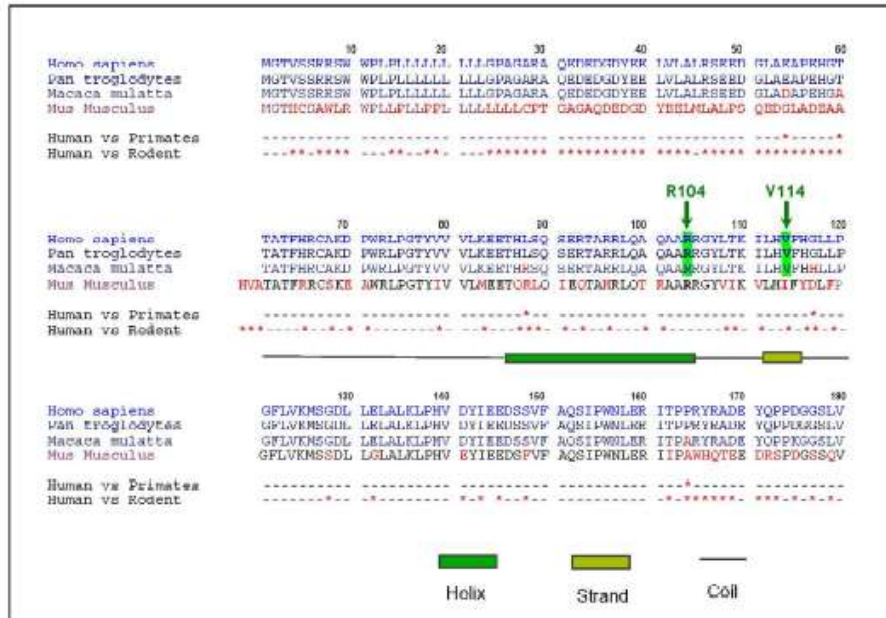
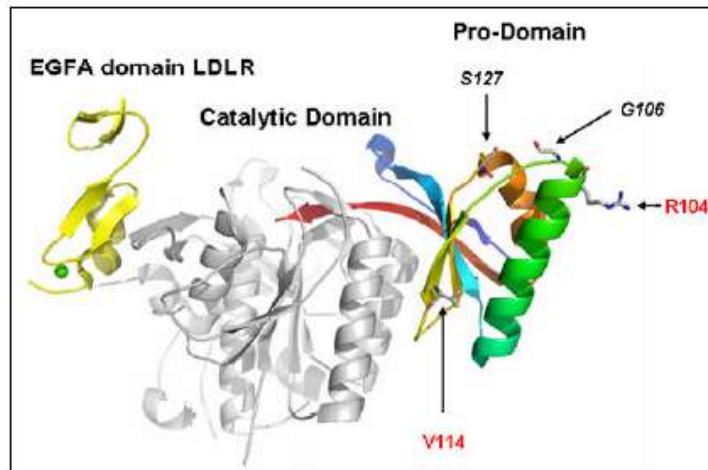


Figure III



A

Figure IV



B

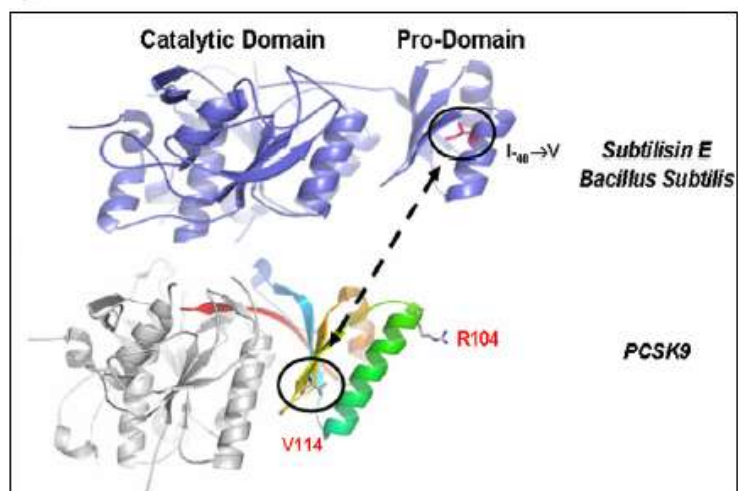


Figure V

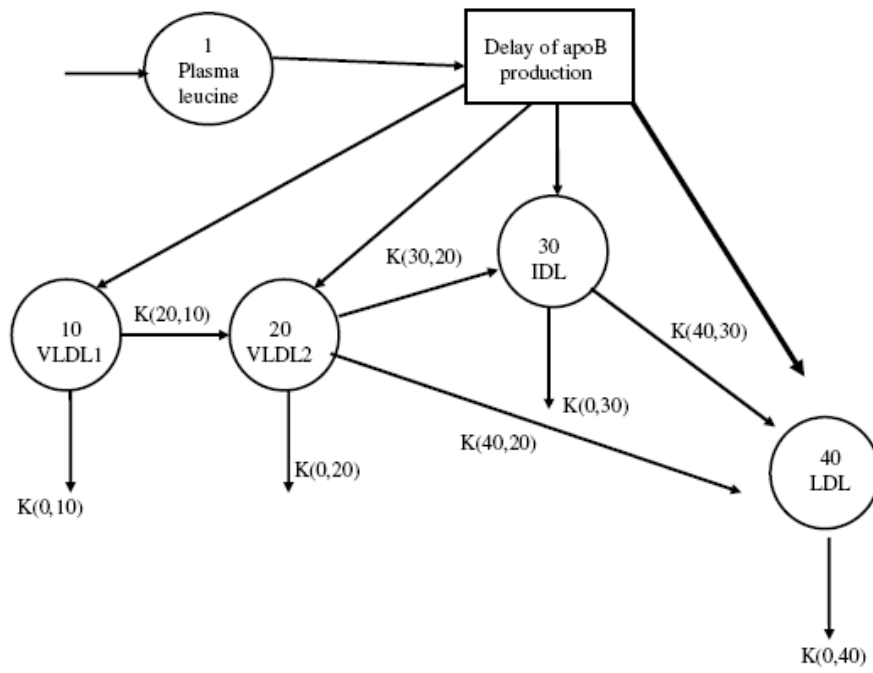
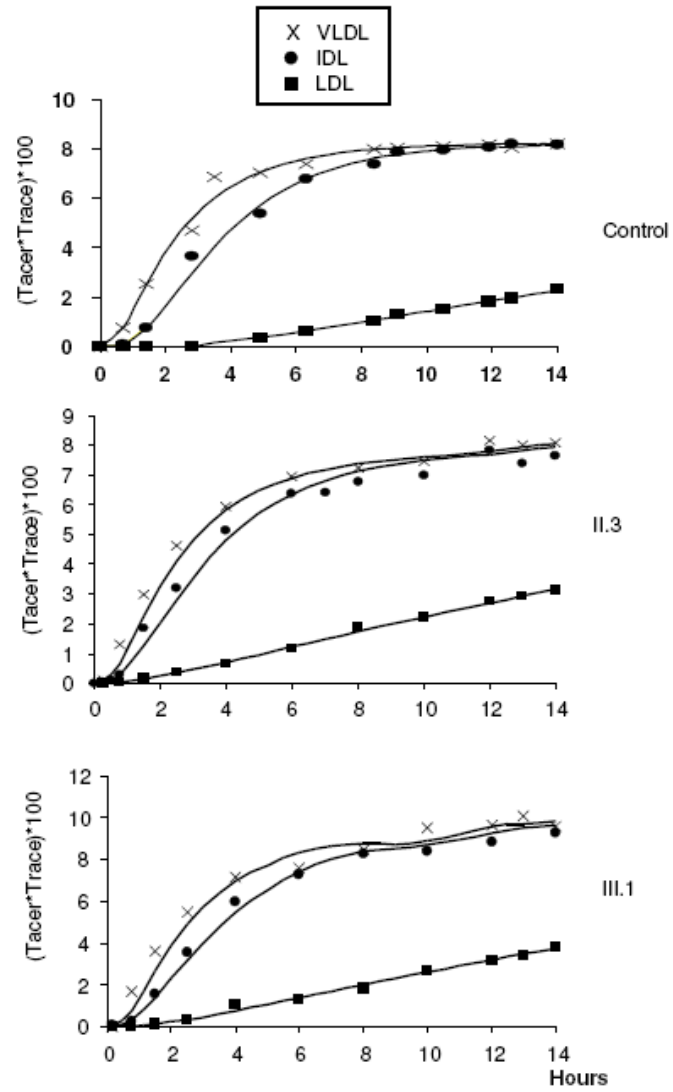


Figure VI



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abderrahmani A, Niederhauser G, Favre D, Abdelli S, Ferdaoussi M, Yang JY, Regazzi R, Widmann C, and Waeber G (2007) Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **50**, 1304-1314.
2. Abifadel M, Rabes JP, Devillers M, Munnich A, Erlich D, Junien C, Varret M, and Boileau C (2009) Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat*, **30**, 520-529.
3. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, and Boileau C (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, **34**, 154-156.
4. Abrams JJ, Ginsberg H, and Grundy SM (1982) Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus. *Diabetes*, **31**, 903-910.
5. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, and Lewis GF (2001) Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med*, **11**, 170-176.
6. Ahren B (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*, **43**, 393-410.
7. Akerlund JE, Bjorkhem I, Angelin B, Liljeqvist L, and Einarsson K (1994) Apparent selective bile acid malabsorption as a consequence of ileal exclusion: effects on bile acid, cholesterol, and lipoprotein metabolism. *Gut*, **35**, 1116-1120.
8. Albers JJ, Grundy SM, Cleary PA, Small DM, Lachin JM, and Schoenfield LJ (1982) National Cooperative Gallstone Study: the effect of chenodeoxycholic acid on lipoproteins and apolipoproteins. *Gastroenterology*, **82**, 638-646.
9. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, and Konrad RJ (2007) Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem*, **53**, 1814-1819.
10. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, Trillard M, Devillers M, Luc G, Krempf M, Reznik Y, Girardet JP, Fredenrich A, Junien C, Varret M, Boileau C, Benlian P, and Rabes JP (2005) Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, **26**, 497.
11. Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K, and Leijd B (1978) Effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on the metabolism of endogenous triglyceride in hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res*, **19**, 1017-1024.
12. Angelin B, Hershon KS, and Brunzell JD (1987) Bile acid metabolism in hereditary forms of hypertriglyceridemia: evidence for an increased synthesis rate in monogenic familial hypertriglyceridemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5434-5438.

13. Angelin B and Leijd B (1980) Effects of cholic acid on the metabolism of endogenous plasma triglyceride and on biliary lipid composition in hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res*, **21**, 1-9.
14. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY, and Edwards PA (2005) Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling. *J Lipid Res*, **46**, 458-468.
15. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, Willson T, and Edwards PA (2003) Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem*, **278**, 20420-20428.
16. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, Levy E, Davignon J, and Lambert M (2009) Plasma PCSK9 Is Associated with Age, Sex, and Multiple Metabolic Markers in a Population-Based Sample of Children and Adolescents. *Clin Chem*.
17. Ballian N, Brunicardi FC, and Wang XP (2006) Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas. *Pancreas*, **33**, 1-12.
18. Bateson MC, Maclean D, Evans JR, and Bouchier IA (1978) Chenodeoxycholic acid therapy for hypertriglyceridaemia in men. *Br J Clin Pharmacol*, **5**, 249-254.
19. Bedi M, Niesen M, and Lopez D (2008) Inhibition of squalene synthase upregulates PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, **470**, 116-119.
20. Beil U, Crouse JR, Einarsson K, and Grundy SM (1982) Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metabolism*, **31**, 438-444.
21. Bell GD, Lewis B, Petrie A, and Dowling RH (1973) Serum lipids in cholelithiasis: effect of chenodeoxycholic acid therapy. *Br Med J*, **3**, 520-523.
22. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie AD, Rader DJ, Boileau C, Brissette L, Chretien M, Prat A, and Seidah NG (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*, **279**, 48865-48875.
23. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, and Seidah NG (2006) The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem*, **281**, 30561-30572.
24. Bennion LJ and Grundy SM (1977) Effects of diabetes mellitus on cholesterol metabolism in man. *N Engl J Med*, **296**, 1365-1371.
25. Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, Lobbens S, Dina C, Durand E, Guerardel A, Boutin P, Jouret B, Heude B, Balkau B, Tichet J, Marre M, Potoczna N, Horber F, Le SC, Czernichow S, Sandbaek A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Andersen G, Kiess W, Korner A, Kovacs P, Jacobson P, Carlsson LM, Walley AJ, Jorgensen T, Hansen

- T, Pedersen O, Meyre D, and Froguel P (2008) Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet*, **40**, 943-945.
26. Béréziat G and Benlian P (1999) Exploration fonctionnelle des lipides. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, **Endocrinologie-Nutrition**.
 27. Berge KE, Ose L, and Leren TP (2006) Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1094-1100.
 28. Berne C (1975b) The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem J*, **152**, 661-666.
 29. Berne C (1975a) The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids. *Biochem J*, **152**, 667-673.
 30. Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS, and Shulman GI (2006) Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **290**, E716-E722.
 31. Bishop-Bailey D, Walsh DT, and Warner TD (2004) Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3668-3673.
 32. Boland LL, Folsom AR, and Rosamond WD (2002) Hyperinsulinemia, dyslipidemia, and obesity as risk factors for hospitalized gallbladder disease. A prospective study. *Ann Epidemiol*, **12**, 131-140.
 33. Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, Ruggeri L, Fisher TS, Santoro JC, Cummings RT, Cubbon RM, Lo SP, Calzetta A, Noto A, Baysarowich J, Mattu M, Talamo F, De FR, Sparrow CP, Sitlani A, and Carfi A (2009) Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J Biol Chem*, **284**, 1313-1323.
 34. Bourbon M and Rato Q (2006) Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Rev Port Cardiol*, **25**, 999-1013.
 35. Brakch N, Galanopoulou AS, Patel YC, Boileau G, and Seidah NG (1995) Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett*, **362**, 143-146.
 36. Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, and Gianturco SH (2000) A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7488-7493.
 37. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, and Hayden MR (2007) Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med*, **13**, 340-347.

38. Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, and Hayden MR (2008) Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **118**, 403-408.
39. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, and Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**, 102-110.
40. Cameron J, Holla OL, Berge KE, Kulseth MA, Ranheim T, Leren TP, and Laerdahl JK (2008a) Investigations on the evolutionary conservation of PCSK9 reveal a functionally important protrusion. *FEBS J*, **275**, 4121-4133.
41. Cameron J, Holla OL, Laerdahl JK, Kulseth MA, Ranheim T, Rognes T, Berge KE, and Leren TP (2008b) Characterization of novel mutations in the catalytic domain of the PCSK9 gene. *J Intern Med*, **263**, 420-431.
42. Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, and Leren TP (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*, **15**, 1551-1558.
43. Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, Leren TP, and Berge KE (2008c) Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis*, **201**, 266-273.
44. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, Troutt JS, Cao G, and Konrad RJ (2008) Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res*, **49**, 394-398.
45. Cariou B (2008) The farnesoid X receptor (FXR) as a new target in non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab*, **34**, 685-691.
46. Cariou B, Bouchaert E, Abdelkarim M, Dumont J, Caron S, Fruchart JC, Burcelin R, Kuipers F, and Staels B (2007a) FXR-deficiency confers increased susceptibility to torpor. *FEBS Lett*, **581**, 5191-5198.
47. Cariou B and Staels B (2007b) FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 236-243.
48. Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, and Staels B (2006a) The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, **281**, 11039-11049.
49. Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, and Staels B (2006b) The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, **281**, 11039-11049.
50. Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, and Staels B (2006c) The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, **281**, 11039-11049.

51. Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, and Staels B (2006d) The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, **281**, 11039-11049.
52. Cariou B, van HK, Duran-Sandoval D, van DT, Grefhorst A, Bouchaert E, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, and Staels B (2005) Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett*, **579**, 4076-4080.
53. Carlson TL and Kottke BA (1989) Effect of 25-hydroxycholesterol and bile acids on the regulation of cholesterol metabolism in Hep G2 cells. *Biochem J*, **264**, 241-247.
54. Carulli N, Ponz de LM, Podda M, Zuin M, Strata A, Frigerio G, and Digrisolo A (1981) Chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid effects in endogenous hypertriglyceridemias. A controlled double-blind trial. *J Clin Pharmacol*, **21**, 436-442.
55. Cavaghan MK, Ehrmann DA, Byrne MM, and Polonsky KS (1997) Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. *J Clin Invest*, **100**, 530-537.
56. Chan DC, Barrett PH, and Watts GF (2006) Recent studies of lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome and related disorders. *Curr Opin Lipidol*, **17**, 28-36.
57. Chan JC, Piper DE, Cao Q, Liu D, King C, Wang W, Tang J, Liu Q, Higbee J, Xia Z, Di Y, Shetterly S, Arimura Z, Salomonis H, Romanow WG, Thibault ST, Zhang R, Cao P, Yang XP, Yu T, Lu M, Retter MW, Kwon G, Henne K, Pan O, Tsai MM, Fuchslocher B, Yang E, Zhou L, Lee KJ, Daris M, Sheng J, Wang Y, Shen WD, Yeh WC, Emery M, Walker NP, Shan B, Schwarz M, and Jackson SM (2009) A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 9820-9825.
58. Chan L, Chang BH, Nakamuta M, Li WH, and Smith LC (1997) Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing. *Biochim Biophys Acta*, **1345**, 11-26.
59. Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM, Jr., Tan Y, Willerson JT, and Marian AJ (2005) A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, **45**, 1611-1619.
60. Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart JC, Gonzalez FJ, and Staels B (2003) Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology*, **125**, 544-555.
61. Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart JC, Dallongeville J, Hum DW, Kuipers F, and Staels B (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*, **109**, 961-971.
62. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, and Pipeleers DG (2002) Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology*, **143**, 3449-3453.

63. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, and Hobbs HH (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, **37**, 161-165.
64. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., and Hobbs HH (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, **354**, 1264-1272.
65. Constam DB, Calfon M, and Robertson EJ (1996) SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol*, **134**, 181-191.
66. Constam DB and Robertson EJ (2000) SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev*, **14**, 1146-1155.
67. Costantini C, Ko MH, Jonas MC, and Puglielli L (2007) A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J*, **407**, 383-395.
68. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, Staels B, and Krempf M (2006) Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*, **281**, 6211-6218.
69. Costet P, Krempf M, and Cariou B (2008) PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*, **33**, 426-434.
70. Costet P, Luo Y, Wang N, and Tall AR (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*, **275**, 28240-28245.
71. Cui J, Huang L, Zhao A, Lew JL, Yu J, Sahoo S, Meinke PT, Royo I, Pelaez F, and Wright SD (2003) Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J Biol Chem*, **278**, 10214-10220.
72. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, and Qiu X (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 413-419.
73. Das A, Fernandez-Zapico ME, Cao S, Yao J, Fiorucci S, Hebbel RP, Urrutia R, and Shah VH (2006) Disruption of an SP2/KLF6 repression complex by SHP is required for farnesoid X receptor-induced endothelial cell migration. *J Biol Chem*, **281**, 39105-39113.
74. Das A, Yaqoob U, Mehta D, and Shah VH (2009) FXR promotes endothelial cell motility through coordinated regulation of FAK and MMP-9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 562-570.

75. De FE, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, and Crestani M (2003) Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem*, **278**, 39124-39132.
76. De SA, Attili AF, Ginanni CS, Scafato E, Cantagalli A, De LC, Pinto G, Lisi D, and Capocaccia L (1997) Gallstones and diabetes: a case-control study in a free-living population sample. *Hepatology*, **25**, 787-790.
77. Deeney JT, Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, Berggren PO, and Corkey BE (2000) Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem*, **275**, 9363-9368.
78. Del Bas JM, Ricketts ML, Vaque M, Sala E, Quesada H, Ardevol A, Salvado MJ, Blay M, Arola L, Moore DD, Pujadas G, Fernandez-Larrea J, and Blade C (2009) Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol Nutr Food Res*.
79. Dent P, Fang Y, Gupta S, Studer E, Mitchell C, Spiegel S, and Hylemon PB (2005) Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology*, **42**, 1291-1299.
80. Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, and Mayne J (2008) PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J*, **275**, 3480-3493.
81. Dobbins RL, Chester MW, Stevenson BE, Daniels MB, Stein DT, and McGarry JD (1998) A fatty acid- dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *J Clin Invest*, **101**, 2370-2376.
82. Duane WC (1995) Abnormal bile acid absorption in familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*, **36**, 96-107.
83. Duane WC, Hartich LA, Bartman AE, and Ho SB (2000) Diminished gene expression of ileal apical sodium bile acid transporter explains impaired absorption of bile acid in patients with hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*, **41**, 1384-1389.
84. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, and Prat A (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1454-1459.
85. Dubuc G, Tremblay M, Pare G, Jacques H, Hamelin J, Benjannet S, Boulet L, Genest J, Bernier L, Seidah NG, and Davignon J (2009) A new method for measurement of total plasma PSCK9 - clinical applications. *J Lipid Res*.
86. Duez H, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, and Lewis GF (2006) Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1357-1363.

87. Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F, Hennuyer N, Grefhorst A, van Dijk TH, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Kuipers F, and Staels B (2005) The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem*, **280**, 29971-29979.
88. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, Kuipers F, and Staels B (2004) Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*, **53**, 890-898.
89. Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao JH, Chandraratna R, and Forman BM (2003) Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*, **278**, 7027-7033.
90. Eckel RH, Grundy SM, and Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*, **365**, 1415-1428.
91. Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, and Gromada J (2004) Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **53 Suppl 3**:S75-8., S75-S78.
92. Eizirik DL, Cardozo AK, and Cnop M (2008a) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, **29**, 42-61.
93. Eizirik DL, Cardozo AK, and Cnop M (2008b) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*, **29**, 42-61.
94. ELRICK H, STIMMLER L, HLAD CJ, Jr., and RAI Y (1964) PLASMA INSULIN RESPONSE TO ORAL AND INTRAVENOUS GLUCOSE ADMINISTRATION. *J Clin Endocrinol Metab*, **24**:1076-82., 1076-1082.
95. Essalmani R, Hamelin J, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG, and Prat A (2006) Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol Cell Biol*, **26**, 354-361.
96. Evans D and Beil FU (2006) The E670G SNP in the PCSK9 gene is associated with polygenic hypercholesterolemia in men but not in women. *BMC Med Genet*, **7**:66., 66.
97. Evans MJ, Mahaney PE, Borges-Marcucci L, Lai K, Wang S, Krueger JA, Gardell SJ, Huard C, Martinez R, Vlasuk GP, and Harnish DC (2009) A synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist promotes cholesterol lowering in models of dyslipidemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G543-G552.
98. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, and Fazio S (2008) Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*, **47**, 1631-1639.
99. Fang Y, Studer E, Mitchell C, Grant S, Pandak WM, Hylemon PB, and Dent P (2007) Conjugated bile acids regulate hepatocyte glycogen synthase activity in vitro and in vivo via Galphai signaling. *Mol Pharmacol*, **71**, 1122-1128.
100. Fasano T, Cefalu AB, Di LE, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L, Valenti V, Bonardi R, Guardamagna O, Aversa M, and Tarugi P (2007) A novel loss of function mutation of

PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 677-681.

101. Federico LM, Naples M, Taylor D, and Adeli K (2006) Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes*, **55**, 1316-1326.
102. Feingold KR, Moser AH, Shigenaga JK, Patzek SM, and Grunfeld C (2008) Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochem Biophys Res Commun*, **374**, 341-344.
103. Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, and Chen C (2006) Reduction in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology*, **147**, 674-682.
104. Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Morelli A, Pruzanski M, and Pellicciari R (2005a) Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis. *J Pharmacol Exp Ther*, **315**, 58-68.
105. Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pruzanski M, Morelli A, and Pellicciari R (2005b) A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**, 584-595.
106. Fisher TS, Lo SP, Pandit S, Mattu M, Santoro JC, Wisniewski D, Cummings RT, Calzetta A, Cubbon RM, Fischer PA, Tarachandani A, De FR, Wright SD, Sparrow CP, Carfi A, and Sitlani A (2007) Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem*, **282**, 20502-20512.
107. Flatt B, Martin R, Wang TL, Mahaney P, Murphy B, Gu XH, Foster P, Li J, Pircher P, Petrowski M, Schulman I, Westin S, Wrobel J, Yan G, Bischoff E, Daige C, and Mohan R (2009) Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *J Med Chem*, **52**, 904-907.
108. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, and Weinberger C (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, **81**, 687-693.
109. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, Butler D, Charisse K, Dorkin R, Fan Y, Gamba-Vitalo C, Hadwiger P, Jayaraman M, John M, Jayaprakash KN, Maier M, Nechev L, Rajeev KG, Read T, Rohl I, Soutschek J, Tan P, Wong J, Wang G, Zimmermann T, de FA, Vornlocher HP, Langer R, Anderson DG, Manoharan M, Kotliansky V, Horton JD, and Fitzgerald K (2008) Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and

- LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **19;105**, 11915-11920.
110. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, and Gaw A (2001) Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*, **103**, 357-362.
 111. Fuchs M, Ivandic B, Muller O, Schalla C, Scheibner J, Bartsch P, and Stange EF (2001) Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Hepatology*, **33**, 1451-1459.
 112. Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, and Steiner DF (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6646-6651.
 113. Galman C, Matasconi M, Persson L, Parini P, Angelin B, and Rudling M (2007) Age-induced hypercholesterolemia in the rat relates to reduced elimination but not increased intestinal absorption of cholesterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293**, E737-E742.
 114. Garg A and Grundy SM (1994) Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial. *Ann Intern Med*, **121**, 416-422.
 115. Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH, Burant CF, Steffensen KR, Gustafsson JA, and MacDougald OA (2005) LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem*, **280**, 23024-23031.
 116. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, and Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 685-704.
 117. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, and Holman RR (2006) Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet*, **368**, 1096-1105.
 118. Ginsberg HN, Zhang YL, and Hernandez-Ono A (2005) Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*, **36**, 232-240.
 119. Girard J (1995) [Role of free fatty acids in the insulin resistance of non-insulin-dependent diabetes]. *Diabete Metab*, **21**, 79-88.
 120. Girard J (2003) [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 827-833.
 121. Goldstein JL, Basu SK, and Brown MS (1983) Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol*, **98:241-60.**, 241-260.

122. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, and Motulsky AG (1973) Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*, **52**, 1544-1568.
123. Goodge KA and Hutton JC (2000) Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 235-242.
124. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, and Kliewer SA (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*, **6**, 517-526.
125. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST, and Crooke RM (2007) Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res*, **48**, 763-767.
126. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, and Chambon P (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem*, **24**, 77-83.
127. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, and Horton JD (2008) Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*, **49**, 1303-1311.
128. Gregg RE and Wetterau JR (1994) The molecular basis of abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol*, **5**, 81-86.
129. Grundy SM, Ahrens EH, Jr., and Salen G (1971) Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in man: comparative effects of cholestyramine and ileal exclusion on cholesterol metabolism. *J Lab Clin Med*, **78**, 94-121.
130. Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk CF, Hannaert JC, Van Berkel TJ, and Pipeleers DG (1997) Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet beta cells. *Endocrinology*, **138**, 4064-4068.
131. Guo GL, Santamarina-Fojo S, Akiyama TE, Amar MJ, Paigen BJ, Brewer B, Jr., and Gonzalez FJ (2006) Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 1401-1409.
132. Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, and Adeli K (2002) Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem*, **277**, 31646-31655.
133. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, and Spraggon G (2007) The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14604-14609.

134. Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, and Sinal CJ (2005) Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, **46**, 2595-2604.
135. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, and Piston DW (2007) Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes*, **56**, 2328-2338.
136. Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, Wang S, Krueger JA, and Evans MJ (2009) Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice. *J Lipid Res*, **50**, 1090-1100.
137. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, and Jones PM (2009) Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*, **58**, 403-411.
138. Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, and Nicolls MR (2005) Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *JOP*, **6**, 287-302.
139. He F, Li J, Mu Y, Kuruba R, Ma Z, Wilson A, Alber S, Jiang Y, Stevens T, Watkins S, Pitt B, Xie W, and Li S (2006) Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res*, **98**, 192-199.
140. He F, Zhang Q, Kuruba R, Gao X, Li J, Li Y, Gong W, Jiang Y, Xie W, and Li S (2008) Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**, 746-751.
141. Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, and Unger RH (1999) Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11513-11518.
142. Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, and Sato R (2004) Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem*, **279**, 45685-45692.
143. Holla OL, Cameron J, Berge KE, Ranheim T, and Leren TP (2007) Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol*, **8:9**, 9.
144. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, and Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **319**, 635-641.
145. Homer VM, Marais AD, Charlton F, Laurie AD, Hurndell N, Scott R, Mangili F, Sullivan DR, Barter PJ, Rye KA, George PM, and Lambert G (2008) Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis*, **196**, 659-666.

146. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, and Burnett JR (2007) The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*, **193**, 445-448.
147. Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2009) PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res*, **50 Suppl:S172-7**. Epub; %2008 Nov; %19., S172-S177.
148. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, and Goldstein JL (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12027-12032.
149. Hu T, Chouinard M, Cox AL, Sipes P, Marcelo M, Ficorilli J, Li S, Gao H, Ryan TP, Michael MD, and Michael LF (2006) Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *J Biol Chem*, **281**, 39831-39838.
150. Huang J, Iqbal J, Saha PK, Liu J, Chan L, Hussain MM, Moore DD, and Wang L (2007) Molecular characterization of the role of orphan receptor small heterodimer partner in development of fatty liver. *Hepatology*, **46**, 147-157.
151. Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, and Moore DD (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*, **312**, 233-236.
152. Hubbert ML, Zhang Y, Lee FY, and Edwards PA (2007) Regulation of hepatic Insig-2 by the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol*, **21**, 1359-1369.
153. Hull RL, Westermarck GT, Westermarck P, and Kahn SE (2004) Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 3629-3643.
154. Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, Bowen BR, Ballinger DG, Skolnick MH, and Samuels ME (2000) Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1089-1093.
155. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, and Dent P (2009) Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res*.
156. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, and Kliewer SA (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*, **2**, 217-225.
157. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, and Tall AR (1990) Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med*, **323**, 1234-1238.
158. Ishikawa M, Iwasaki Y, Yatoh S, Kato T, Kumadaki S, Inoue N, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Kobayashi K, Takahashi A, Yamada N, and

- Shimano H (2008) Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. *J Lipid Res*, **49**, 2524-2534.
159. Ishikawa M, Okajima F, Inoue N, Motomura K, Kato T, Takahashi A, Oikawa S, Yamada N, and Shimano H (2006) Distinct effects of pravastatin, atorvastatin, and simvastatin on insulin secretion from a beta-cell line, MIN6 cells. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 329-335.
 160. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, and Fujino M (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, **422**, 173-176.
 161. Javitt NB (1990) Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J*, **4**, 161-168.
 162. JENSEN EV (1962) On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med*, **6:47-59.**, 47-59.
 163. Jeon H and Blacklow SC (2005) Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*, **74:535-62.**, 535-562.
 164. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, and Park SW (2008) Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res*, **49**, 399-409.
 165. Jhala US, Canettieri G, Screaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, and Montminy M (2003) cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*, **17**, 1575-1580.
 166. Jin W, Fuki IV, Seidah NG, Benjannet S, Glick JM, and Rader DJ (2005) Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem*, **280**, 36551-36559.
 167. Jin W, Wang X, Millar JS, Quertermous T, Rothblat GH, Glick JM, and Rader DJ (2007) Hepatic proprotein convertases modulate HDL metabolism. *Cell Metab*, **6**, 129-136.
 168. Jonas MC, Costantini C, and Puglielli L (2008) PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep*, **9**, 916-922.
 169. Jones PH (2003) Atherosclerosis target of lipid-lowering therapy: is lower LDL cholesterol better? *Am J Manag Care*, **Suppl:1, 4-5.**, 1, 4-1, 5.
 170. Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, Gonzalez FJ, Willson TM, and Edwards PA (2001a) Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol*, **15**, 1720-1728.

171. Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K, Gonzalez FJ, Willson TM, and Edwards PA (2001b) Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol*, **15**, 1720-1728.
172. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, and Fujino M (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*, **278**, 9435-9440.
173. Kida T, Murata T, Hori M, and Ozaki H (2009) Chronic stimulation of farnesoid X receptor impairs nitric oxide sensitivity of vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H195-H201.
174. Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, and Gonzalez FJ (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis*, **28**, 940-946.
175. Kim JY, Kim HJ, Kim KT, Park YY, Seong HA, Park KC, Lee IK, Ha H, Shong M, Park SC, and Choi HS (2004) Orphan nuclear receptor small heterodimer partner represses hepatocyte nuclear factor 3/Foxa transactivation via inhibition of its DNA binding. *Mol Endocrinol*, **18**, 2880-2894.
176. Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, and Grunfeld C (2003) Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem*, **278**, 8988-8995.
177. Kinoshita M, Kawamura M, Fujita M, Hirota D, Suda T, Taki M, Kusano J, Takao K, Takenaka H, Kubota S, and Teramoto T (2004) Enhanced susceptibility of LDL to oxidative modification in a CTX patient:- role of chenodeoxycholic acid in xanthoma formation. *J Atheroscler Thromb*, **11**, 167-172.
178. Knowles NG, Landchild MA, Fujimoto WY, and Kahn SE (2002) Insulin and amylin release are both diminished in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **25**, 292-297.
179. Kok T, Hulzebos CV, Wolters H, Havinga R, Agellon LB, Stellaard F, Shan B, Schwarz M, and Kuipers F (2003) Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem*, **278**, 41930-41937.
180. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, and Cokkinos DV (2005) Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. *Postgrad Med J*, **81**, 358-366.
181. Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O, and Guo GL (2009) Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**, 116-122.
182. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, and Hobbs HH (2006) A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*, **78**, 410-422.
183. Kourimate S, Chetiveaux M, Jarnoux AL, Lalanne F, and Costet P (2009) Cellular and secreted pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 catalytic activity in hepatocytes. *Atherosclerosis*, **20**.

184. Kourimate S, Le MC, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, Nguyen P, Krempf M, Cariou B, and Costet P (2008) Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem*, **283**, 9666-9673.
185. Kovacs P and Stumvoll M (2005) Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **19**, 625-635.
186. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, and Lowell BB (2003) Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*, **112**, 1831-1842.
187. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, and Deisenhofer J (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1820-1825.
188. Labonte P, Begley S, Guevin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, Prat A, and Seidah NG (2009) PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology*, **50**, 17-24.
189. Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, and Edwards PA (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem*, **275**, 10638-10647.
190. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, and Horton JD (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*, **116**, 2995-3005.
191. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, and Hobbs HH (2009) Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**, 2537-2543.
192. Lalanne F, Lambert G, Amar MJ, Chetiveaux M, Zair Y, Jarnoux AL, Ouguerram K, Friburg J, Seidah NG, Brewer HB, Jr., Krempf M, and Costet P (2005) Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res*, **46**, 1312-1319.
193. Lambert G, Amar MJ, Guo G, Brewer HB, Jr., Gonzalez FJ, and Sinal CJ (2003) The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, **278**, 2563-2570.
194. Lambert G, Ancellin N, Charlton F, Comas D, Pilot J, Keech A, Patel S, Sullivan DR, Cohn JS, Rye KA, and Barter PJ (2008) Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment. *Clin Chem*, **54**, 1038-1045.
195. Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, Krempf M, and Costet P (2006) Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology*, **147**, 4985-4995.

196. Lang T (2007) SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol*, **585**, 693-698.
197. Le May C., Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, Jarry A, Comera C, Collet X, Kuipers F, Krempf M, Cariou B, and Costet P (2009) Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 684-690.
198. Leblond F, Seidah NG, Precourt LP, Delvin E, Dominguez M, and Levy E (2009) Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G805-G815.
199. Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, and Zhang Y (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*, **31**, 572-580.
200. Lee YS, Kim DK, Kim YD, Park KC, Shong M, Seong HA, Ha HJ, and Choi HS (2008) Orphan nuclear receptor SHP interacts with and represses hepatocyte nuclear factor-6 (HNF-6) transactivation. *Biochem J*, **413**, 559-569.
201. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, and Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*, **89**, 147-191.
202. Leiss O and von BK (1982) Different effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on serum lipoprotein concentrations in patients with radiolucent gallstones. *Scand J Gastroenterol*, **17**, 587-592.
203. Leren TP (2004) Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*, **65**, 419-422.
204. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, Suen KF, Trauger JW, Spraggon G, Lesley SA, Liao G, Yowe D, and Harris JL (2007a) Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J*, **406**, 203-207.
205. Li J, Wilson A, Gao X, Kuruba R, Liu Y, Poloyac S, Pitt B, Xie W, and Li S (2009) Coordinated Regulation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase-1 and Cationic Amino Acid Transporter-1 by Farnesoid X Receptor in Mouse Liver and Kidney and Its Implication in the Control of Blood Levels of Asymmetric Dimethylarginine. *J Pharmacol Exp Ther*.
206. Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X, He F, Zhang LM, Pitt BR, Xie W, and Li S (2008) FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*, **77**, 169-177.
207. Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, and Drucker DJ (2005) beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes*, **54**, 482-491.
208. Li YT, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD, and Bishop-Bailey D (2007b) Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 2606-2611.

209. Lin Y, Havinga R, Schippers IJ, Verkade HJ, Vonk RJ, and Kuipers F (1996a) Characterization of the inhibitory effects of bile acids on very-low-density lipoprotein secretion by rat hepatocytes in primary culture. *Biochem J*, **316**, 531-538.
210. Lin Y, Havinga R, Verkade HJ, Moshage H, Slooff MJ, Vonk RJ, and Kuipers F (1996b) Bile acids suppress the secretion of very-low-density lipoprotein by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, **23**, 218-228.
211. Lowell BB and Shulman GI (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, **307**, 384-387.
212. Luo Y, Warren L, Xia D, Jensen H, Sand T, Petras S, Qin W, Miller KS, and Hawkins J (2008) Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. *J Lipid Res*.
213. Ma K, Saha PK, Chan L, and Moore DD (2006) Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*, **116**, 1102-1109.
214. MacDonald MJ, McKenzie DI, Walker TM, and Kaysen JH (1992) Lack of glyconeogenesis in pancreatic islets: expression of gluconeogenic enzyme genes in islets. *Horm Metab Res*, **24**, 158-160.
215. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, and Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, **284**, 1362-1365.
216. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, and Hellerstrom C (1985) Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J*, **227**, 995-1002.
217. Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi SA, Gjoen T, Berg T, Roos N, and Eskild W (2005) Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 1096-1105.
218. Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA, and Willson TM (2000a) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, **43**, 2971-2974.
219. Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA, and Willson TM (2000b) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, **43**, 2971-2974.
220. Maran RR, Thomas A, Roth M, Sheng Z, Esterly N, Pinson D, Gao X, Zhang Y, Ganapathy V, Gonzalez FJ, and Guo GL (2009) Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther*, **328**, 469-477.
221. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, and Kahn CR (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*, **340**, 925-929.

222. Martins IJ and Redgrave TG (2004) Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine? *J Nutr Biochem*, **15**, 130-141.
223. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, and Tanaka K (2002) Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 714-719.
224. Matsukuma KE, Bennett MK, Huang J, Wang L, Gil G, and Osborne TF (2006) Coordinated control of bile acids and lipogenesis through FXR-dependent regulation of fatty acid synthase. *J Lipid Res*, **47**, 2754-2761.
225. Maxwell KN and Breslow JL (2004) Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7100-7105.
226. Maxwell KN, Fisher EA, and Breslow JL (2005) Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2069-2074.
227. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, and Breslow JL (2003) Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*, **44**, 2109-2119.
228. Mayer G, Poirier S, and Seidah NG (2008) Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem*, **283**, 31791-31801.
229. Mayne J, Dewpura T, Raymond A, Cousins M, Chaplin A, Lahey KA, Lahaye SA, Mbikay M, Ooi TC, and Chretien M (2008) Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids Health Dis*, **7**:22., 22.
230. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kaefer N, Gyamera-Acheampong C, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, and Ooi TC (2007) Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun*, **361**, 451-456.
231. Mbikay M, Mayne J, Seidah NG, and Chretien M (2007) Of PCSK9, cholesterol homeostasis and parasitic infections: possible survival benefits of loss-of-function PCSK9 genetic polymorphisms. *Med Hypotheses*, **69**, 1010-1017.
232. Mbikay M, Tadros H, Ishida N, Lerner CP, De Lamirande E, Chen A, El-Alfy M, Clermont Y, Seidah NG, Chretien M, Gagnon C, and Simpson EM (1997) Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6842-6846.
233. McGarry JD (1992) What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science*, **258**, 766-770.
234. McGarry JD (2002) Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*, **51**, 7-18.

235. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de WJ, Broccardo C, Chimini G, and Francone OL (2000) High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4245-4250.
236. McNutt MC, Kwon HJ, Chen C, Chen JR, Horton JD, and Lagace TA (2009) Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem*, **284**, 10561-10570.
237. McNutt MC, Lagace TA, and Horton JD (2007) Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*, **282**, 20799-20803.
238. Melloul D, Marshak S, and Cerasi E (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, **45**, 309-326.
239. Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, and Fiorucci S (2009) Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H272-H281.
240. Metz SA, Rabaglia ME, Stock JB, and Kowluru A (1993) Modulation of insulin secretion from normal rat islets by inhibitors of the post-translational modifications of GTP-binding proteins. *Biochem J*, **295**, 31-40.
241. Miller NE and Nestel PJ (1975) Differences among hyperlipoproteinaemic subjects in the response of lipoprotein lipids to resin therapy. *Eur J Clin Invest*, **5**, 241-247.
242. Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M, and Skarnes WC (2001) Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet*, **28**, 241-249.
243. Miyake Y, Kimura R, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Yamamura T, and Miyata T (2008) Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis*, **196**, 29-36.
244. Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, and Moschetta A (2008) Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*, **68**, 9589-9594.
245. Moore JT, Collins JL, and Pearce KH (2006) The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem*, **1**, 504-523.
246. Moschetta A, Bookout AL, and Mangelsdorf DJ (2004) Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med*, **10**, 1352-1358.
247. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*, **28**, 463-491.
248. Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M, and Sato R (2002) Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, **277**, 37229-37234.

249. Naoumova RP, Tosi I, Patel D, Neuwirth C, Horswell SD, Marais AD, van HC, and Soutar AK (2005) Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2654-2660.
250. Nassoury N, Blasirole DA, Tebon OA, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, McPherson PS, Attie AD, Prat A, and Seidah NG (2007) The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic*, **8**, 718-732.
251. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, Purandare U, Lo CF, Huang Y, Chiang LW, Grenier JM, Ozenberger BA, Jacobsen JS, Kennedy JD, DiStefano PS, Wood A, and Bingham B (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*, **420**, 55-67.
252. Niesen M, Bedi M, and Lopez D (2008) Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, **470**, 111-115.
253. Nilsson LM, Abrahamsson A, Sahlin S, Gustafsson U, Angelin B, Parini P, and Einarsson C (2007) Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 707-711.
254. Nolan CJ, Leahy JL, ghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, Fortier M, Guay C, Lamontagne J, Barbeau A, Przybytkowski E, Joly E, Masiello P, Wang S, Mitchell GA, and Prentki M (2006) Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia*, **49**, 2120-2130.
255. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raselli S, Tramontana S, Meneghetti F, Artali R, Noto D, Cefalu AB, Buccianti G, Averna M, and Catapano AL (2009) Effects of PCSK9 variants on common carotid artery intima media thickness and relation to ApoE alleles. *Atherosclerosis*.
256. Nozawa H (2005) Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 754-761.
257. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Kumakura K, Nakamichi Y, and Nagamatsu S (2004) Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem*, **279**, 8403-8408.
258. Okajima F, Kurihara M, Ono C, Nakajima Y, Tanimura K, Sugihara H, Tatsuguchi A, Nakagawa K, Miyazawa T, and Oikawa S (2005) Oxidized but not acetylated low-density lipoprotein reduces preproinsulin mRNA expression and secretion of insulin from HIT-T15 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1687**, 173-180.
259. Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, and Krempf M (2004) Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1448-1453.

260. Owens D (2003) The extended postprandial phase in diabetes. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1085-1089.
261. Pandit S, Wisniewski D, Santoro JC, Ha S, Ramakrishnan V, Cubbon RM, Cummings RT, Wright SD, Sparrow CP, Sitlani A, and Fisher TS (2008) Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, **49**, 1333-1343.
262. Park MJ, Kong HJ, Kim HY, Kim HH, Kim JH, and Cheong JH (2007) Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBPalpha. *Biochem J*, **402**, 567-574.
263. Park SW, Moon YA, and Horton JD (2004) Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*, **279**, 50630-50638.
264. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, and Lehmann JM (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, **284**, 1365-1368.
265. Persson L, Galman C, Angelin B, and Rudling M (2009) Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology*, **150**, 1140-1146.
266. Pineda T, I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, and Staels B (2003) Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol*, **17**, 259-272.
267. Piper DE, Jackson S, Liu Q, Romanow WG, Shetterly S, Thibault ST, Shan B, and Walker NP (2007) The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure*, **15**, 545-552.
268. Pisciotta L, Priore OC, Cefalu AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Patel D, Averna M, Tarugi P, Calandra S, and Bertolini S (2006) Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **186**, 433-440.
269. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, and Seidah NG (2008) The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*, **283**, 2363-2372.
270. Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Desjardins R, Ly K, Asselin MC, Day R, Duclos FJ, Witmer M, Parker R, Prat A, and Seidah NG (2009) Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation: Evidence for an intracellular route. *J Biol Chem*.
271. Portela-Gomes GM, Grimelius L, and Stridsberg M (2008) Prohormone convertases 1/3, 2, furin and protein 7B2 (Secretogranin V) in endocrine cells of the human pancreas. *Regul Pept*, **146**, 117-124.

272. Postic C and Girard J (2008) Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, **118**, 829-838.
273. Prentki M and Corkey BE (1996) Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*, **45**, 273-283.
274. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, and Roduit R (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, **51 Suppl 3:S405-13.**, S405-S413.
275. Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, and Corkey BE (1992) Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*, **267**, 5802-5810.
276. Prieur X, Coste H, and Rodriguez JC (2003) The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem*, **278**, 25468-25480.
277. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, and Kane JP (2002) Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*, **110**, 109-117.
278. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, Wang X, Beyer TP, Bensch WR, Li W, Ehsani ME, Lu D, Konrad RJ, Eacho PI, Moller DE, Karathanasis SK, and Cao G (2007) Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*, **48**, 1488-1498.
279. Qiao L, Studer E, Leach K, McKinsty R, Gupta S, Decker R, Kukreja R, Valerie K, Nagarkatti P, El DW, Molkentin J, Schmidt-Ullrich R, Fisher PB, Grant S, Hylemon PB, and Dent P (2001) Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*, **12**, 2629-2645.
280. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, and Dent P (2002) Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology*, **35**, 779-789.
281. Qin P, Borges-Marcucci LA, Evans MJ, and Harnish DC (2005) Bile acid signaling through FXR induces intracellular adhesion molecule-1 expression in mouse liver and human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **289**, G267-G273.
282. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, and Horton JD (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5374-5379.
283. Repa JJ, Lund EG, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM, and Turley SD (2000) Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in

- hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem*, **275**, 39685-39692.
284. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, and Glynn RJ (2008a) Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*, **20;359**, 2195-2207.
 285. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, and Glynn RJ (2008b) Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*, **20;359**, 2195-2207.
 286. Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, and Fiorucci S (2006a) The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol*, **70**, 1164-1173.
 287. Rizzo G, Disante M, Mencarelli A, Renga B, Gioiello A, Pellicciari R, and Fiorucci S (2006b) The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function in vivo. *Mol Pharmacol*, **70**, 1164-1173.
 288. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, ghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, and Prentki M (2004) A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*, **53**, 1007-1019.
 289. Roebroek AJ, Umans L, Pauli IG, Robertson EJ, van LF, Van d, V, and Constam DB (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development*, **125**, 4863-4876.
 290. Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, Bideau M, Capponi A, Nicod P, Haefliger JA, and Waeber G (2003) Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem*, **278**, 18368-18375.
 291. Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, **138**, S419-S420.
 292. Rouille Y, Martin S, and Steiner DF (1995) Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem*, **270**, 26488-26496.
 293. Ruhl CE and Everhart JE (2000) Association of diabetes, serum insulin, and C-peptide with gallbladder disease. *Hepatology*, **31**, 299-303.
 294. Rutti S, Ehses JA, Sibling RA, Prazak R, Rohrer L, Georgopoulos S, Meier DT, Niclauss N, Berney T, Donath MY, and von EA (2009) Low and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis and proliferation of primary human and murine pancreatic beta cells. *Endocrinology*.
 295. Salaun C, James DJ, and Chamberlain LH (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, **5**, 255-264.

296. Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF, and Burris TP (2005) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 391-396.
297. Scamuffa N, Calvo F, Chretien M, Seidah NG, and Khatib AM (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J*, **20**, 1954-1963.
298. Schaefer EJ, Brousseau ME, Diffenderfer MR, Cohn JS, Welty FK, O'Connor J, Jr., Dolnikowski GG, Wang J, Hegele RA, and Jones PJ (2001) Cholesterol and apolipoprotein B metabolism in Tangier disease. *Atherosclerosis*, **159**, 231-236.
299. Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H, Muller M, Heymans HS, Ruiters M, and Kuipers F (1997) Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol*, **13**, 375-386.
300. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, and Cao G (2008a) Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **370**, 634-640.
301. Schmidt RJ, Zhang Y, Zhao Y, Qian YW, Wang H, Lin A, Ehsani ME, Yu X, Wang G, Singh J, Su EW, Li S, Konrad RJ, and Cao G (2008b) A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *DNA Cell Biol*, **27**, 183-189.
302. Schoenfield LJ and Lachin JM (1981) Chenodiol (chenodeoxycholic acid) for dissolution of gallstones: the National Cooperative Gallstone Study. A controlled trial of efficacy and safety. *Ann Intern Med*, **95**, 257-282.
303. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, and Chretien M (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 928-933.
304. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, and Prat A (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 1111-1125.
305. Seidah NG and Prat A (2007) The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*, **85**, 685-696.
306. Seol W, Choi HS, and Moore DD (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol*, **9**, 72-85.
307. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, and Hedrick JA (2008) PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **375**, 69-73.
308. Shen H, Zhang Y, Ding H, Wang X, Chen L, Jiang H, and Shen X (2008) Farnesoid X receptor induces GLUT4 expression through FXR response element in the GLUT4 promoter. *Cell Physiol Biochem*, **22**, 1-14.

309. Shepherd J, Packard CJ, Morgan HG, Third JL, Stewart JM, and Lawrie TD (1979) The effects of cholestyramine on high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*, **33**, 433-444.
310. Shih DM, Kast-Woelbern HR, Wong J, Xia YR, Edwards PA, and Lusis AJ (2006) A role for FXR and human FGF-19 in the repression of paraoxonase-1 gene expression by bile acids. *J Lipid Res*, **47**, 384-392.
311. Shimamoto Y, Ishida J, Yamagata K, Saito T, Kato H, Matsuoka T, Hirota K, Daitoku H, Nangaku M, Yamagata K, Fujii H, Takeda J, and Fukamizu A (2004) Inhibitory effect of the small heterodimer partner on hepatocyte nuclear factor-4 mediates bile acid-induced repression of the human angiotensinogen gene. *J Biol Chem*, **279**, 7770-7776.
312. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**, 171-176.
313. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, and Gonzalez FJ (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, **102**, 731-744.
314. Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, Hum DW, Fruchart JC, and Staels B (2004a) The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett*, **566**, 173-177.
315. Sirvent A, Verhoeven AJ, Jansen H, Kosykh V, Darteil RJ, Hum DW, Fruchart JC, and Staels B (2004b) Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res*, **45**, 2110-2115.
316. Sonoda J, Pei L, and Evans RM (2008) Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett*, **582**, 2-9.
317. Srivastava RA, Srivastava N, and Aversa M (2000) Dietary cholic acid lowers plasma levels of mouse and human apolipoprotein A-I primarily via a transcriptional mechanism. *Eur J Biochem*, **267**, 4272-4280.
318. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christie ME, Michael LF, and Burris TP (2005) Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology*, **146**, 984-991.
319. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, and Edlund H (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*, **1**, 245-258.
320. Steppan CM and Lazar MA (2004) The current biology of resistin. *J Intern Med*, **255**, 439-447.
321. Stockley JH and O'Neill C (2008) Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3265-3289.
322. Stumvoll M, Goldstein BJ, and van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, **365**, 1333-1346.

323. Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, and Soutar AK (2005) Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*, **14**, 1161-1169.
324. Szapary PO, Wolfe ML, Bloedon LT, Cucchiara AJ, DerMarderosian AH, Cirigliano MD, and Rader DJ (2003) Guggulipid for the treatment of hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA*, **290**, 765-772.
325. Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Miwa A, Kishimoto T, Kojima T, Abe T, and Kasai H (2004) Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J Cell Biol*, **165**, 255-262.
326. Tang C and Oram JF (2009) The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 563-572.
327. Taniguchi T, Chen J, and Cooper AD (1994) Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene expression in Hep-G2 cells. Effect of serum, bile salts, and coordinate and noncoordinate regulation with other sterol-responsive genes. *J Biol Chem*, **269**, 10071-10078.
328. Taskinen MR (2003) Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*, **46**, 733-749.
329. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, Skolnick MH, Hopkins PN, Hunt SC, and Shattuck DM (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*, **114**, 349-353.
330. Toussaint JF, Jacob MP, Lagrost L, and Chapman J (2003) L'athérosclérose, physiologie, diagnostics, thérapeutiques. *Masson Edition, Paris*.
331. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, and Attie AD (2000) The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest*, **105**, 521-532.
332. Uchida K, Makino S, and Akiyoshi T (1985) Altered bile acid metabolism in nonobese, spontaneously diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, **34**, 79-83.
333. Urizar NL, Dowhan DH, and Moore DD (2000) The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem*, **275**, 39313-39317.
334. van Citters GW, Kabir M, Kim SP, Mittelman SD, Dea MK, Brubaker PL, and Bergman RN (2002) Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 5191-5198.
335. van Dijk TH, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud DJ, and Kuipers F (2009) An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr^{-/-} mice. *J Biol Chem*, **284**, 10315-10323.

336. Vara E and Tamarit-Rodriguez J (1986) Glucose stimulation of insulin secretion in islets of fed and starved rats and its dependence on lipid metabolism. *Metabolism*, **35**, 266-271.
337. Varret M, Abifadel M, Rabes JP, and Boileau C (2008) Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*, **73**, 1-13.
338. Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, Devillers M, Krempf M, Coulon M, Thiart R, Kotze MJ, Schmidt H, Buzzzi JC, Kostner GM, Bertolini S, Pocovi M, Rosa A, Farnier M, Martinez M, Junien C, and Boileau C (1999) A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*, **64**, 1378-1387.
339. Vikman J, Jimenez-Feltstrom J, Nyman P, Thelin J, and Eliasson L (2009) Insulin secretion is highly sensitive to desorption of plasma membrane cholesterol. *FASEB J*, **23**, 58-67.
340. Villanueva GR, Herreros M, Perez-Barriocanal F, Bolanos JP, Bravo P, and Marin JJ (1990) Enhancement of bile acid-induced biliary lipid secretion by streptozotocin in rats: role of insulin deficiency. *J Lab Clin Med*, **115**, 441-448.
341. Villarreal-Molina MT, guilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, Riano D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Konigsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, and Canizales-Quinteros S (2007) The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes*, **56**, 1881-1887.
342. Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **21**, 697-738.
343. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, and Forman BM (1999) Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, **3**, 543-553.
344. Wang Y, Jones PJ, Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Granholm NA, Tolley EA, and Heubi JE (2006) Effects of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *Transl Res*, **148**, 37-45.
345. Wang YD, Chen WD, Moore DD, and Huang W (2008a) FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res*, **18**, 1087-1095.
346. Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, and Huang W (2008b) Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*, **48**, 1632-1643.
347. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, and Henquin JC (1994) Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*, **43**, 703-711.
348. Warnotte C, Nenquin M, and Henquin JC (1999) Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol*, **153**, 147-153.

349. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, and Auwerx J (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, **439**, 484-489.
350. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, and Auwerx J (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*, **113**, 1408-1418.
351. Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, and Gores GJ (2003) Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, G31-G36.
352. Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, **26**, 19-39.
353. Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PP, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, and Tsushima RG (2004) Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem*, **279**, 24685-24691.
354. Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, Gaisano HY, and Tsushima RG (2008) Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, **149**, 5136-5145.
355. Yada T, Nakata M, Shiraishi T, and Kakei M (1999) Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca²⁺ signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca²⁺ channels in rat islet beta-cells. *Br J Pharmacol*, **126**, 1205-1213.
356. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, and Fukamizu A (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem*, **279**, 23158-23165.
357. Yaney GC, Korchak HM, and Corkey BE (2000) Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells. *Endocrinology*, **141**, 1989-1998.
358. Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, and Huang W (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res*, **67**, 863-867.
359. Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, and Horton JD (2001) Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13607-13612.
360. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, Jacques H, Jin W, Davignon J, Seidah NG, and Prat A (2008) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*, **48**, 646-654.

361. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, and Hobbs HH (2008a) Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13045-13050.
362. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*, **282**, 18602-18612.
363. Zhang Q, He F, Kuruba R, Gao X, Wilson A, Li J, Billiar TR, Pitt BR, Xie W, and Li S (2008b) FXR-mediated regulation of angiotensin type 2 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, **77**, 560-569.
364. Zhang S, Wang J, Liu Q, and Harnish DC (2009) Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, **51**, 380-388.
365. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, and Edwards PA (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev*, **18**, 157-169.
366. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, and Edwards PA (2006a) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1006-1011.
367. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, and Edwards PA (2006b) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1006-1011.
368. Zhang Y, Wang X, Vales C, Lee FY, Lee H, Lusis AJ, and Edwards PA (2006c) FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2316-2321.
369. Zhao A, Lew JL, Huang L, Yu J, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de PN, Blevins RA, Pelaez F, Wright SD, and Cui J (2003) Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. *J Biol Chem*, **278**, 28765-28770.
370. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2006) Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*, **79**, 514-523.
371. Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, Zhang C, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst JJ, and Steiner DF (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10293-10298.
372. Zieve FJ, Kalin MF, Schwartz SL, Jones MR, and Bailey WL (2007) Results of the glucose-lowering effect of WelChol study (GLOWS): a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study evaluating the effect of colesevelam hydrochloride on glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Clin Ther*, **29**, 74-83.

373. Zollner G, Marschall HU, Wagner M, and Trauner M (2006) Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm*, **3**, 231-251.

Implication de PCSK9 dans les maladies métaboliques : régulation par les acides biliaires et rôle fonctionnel dans le pancréas

PCSK9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9) est le 3^{ème} gène impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale dominante, après les mutations des gènes codant pour le récepteur aux LDL (LDLR) et pour son ligand l'apo-B. PCSK9 agit comme un inhibiteur de l'expression hépatique du LDLR par un mécanisme post-traductionnel. En se liant au domaine extracellulaire du LDLR à la surface des membranes plasmiques, PCSK9 induit l'internalisation du LDLR et sa dégradation dans les lysosomes. Ainsi les mutations de PCSK9 associées à l'hypercholestérolémie sont des mutations gain de fonction. A l'inverse, les mutations perte de fonction de PCSK9 induisent une hypocholestérolémie et une protection contre les maladies cardiovasculaires. Le développement d'inhibiteurs de PCSK9 est donc un enjeu thérapeutique majeur dans la prise en charge des hypercholestérolémies.

Dans ce contexte, la 1^{ère} partie de ma thèse a consisté à étudier la régulation transcriptionnelle de PCSK9 par les acides biliaires et le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor). De nombreux gènes du métabolisme lipidique sont régulés par FXR et l'activation de FXR a des effets bénéfiques dans les troubles métaboliques. Les résultats obtenus dans des lignées d'hépatocytes humains montrent que l'activation de FXR réprime l'expression de PCSK9, ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité du LDLR mesurée *in vitro*. Ceci suggère que l'utilisation d'agoniste de FXR pour réprimer PCSK9 et ainsi potentialiser l'action des statines pourrait être utile dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

On sait à présent que le métabolisme du cholestérol intervient dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas et pourrait ainsi jouer un rôle dans la physiopathologie du diabète de type 2. La 2^{nde} partie de ma thèse s'est intéressée au rôle de PCSK9 dans la fonction insulino-sécrétrice des cellules β . A partir d'ilots isolés du pancréas humains et de souris, je démontre que PCSK9 est exprimée dans les cellules δ . Par ailleurs, PCSK9 diminue l'expression du LDLR au sein des ilots de Langerhans, probablement *via* une action endocrine. En revanche, l'invalidation de PCSK9 chez la souris ne semble pas perturber l'homéostasie du glucose *ex vivo* et *in vivo*, ni la survie des cellules β en réponse à un traitement par la streptozotocine.

Mots clés : PCSK9, LDLR, cholestérol, hépatocytes, acides biliaires, pancréas, insuline, diabète.

Implication of PCSK9 in metabolic diseases : regulation by bile acids and functional role in the pancreas

PCSK9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9) is the 3rd gene implicated in autosomic familial hypercholesterolemia with the LDL Receptor (LDLR) gene and its ligand apo-B. PCSK9 acts as a post-transcriptional inhibitor of hepatic LDLR expression. Gain of function mutations of PCSK9 are associated with hypercholesterolemia. By contrast, loss of function mutations of PCSK9 induce hypocholesterolemia and a protection against cardiovascular diseases. Therefore, development of PCSK9 inhibitors is a promising therapeutical approach to treat hypercholesterolemia.

In this context, the 1st part of my thesis consisted of studying transcriptional regulation of PCSK9 by bile acids and the nuclear receptor FXR (Farnesoid X Receptor). FXR regulates many genes involved in lipid metabolism, and FXR activation may have beneficial effects in metabolic diseases. My results in human hepatocytes cell lines show that FXR activation represses PCSK9 expression. Such PCSK9 repression is correlated with the induction of LDLR activity *in vitro*. These findings suggest that FXR agonists may be used in combination with statins to amplify their hypocholesterolemic action in hyperlipidemic patients .

It is now admitted that cholesterol metabolism modulates insulin secretion by pancreatic β cells and might interfere with the development of type 2 diabetes. The 2nd part of my thesis focussed on the role of PCSK9 in the β cells function. Using isolated pancreatic islets from humans and mice, I show that PCSK9 is expressed in δ cells of islets of Langerhans. PCSK9 is able to downregulate LDLR expression in the whole islet, probably acting in an endocrine manner. However, PCSK9-deficiency does not alter glucose homeostasis *ex vivo* and *in vivo* in mice, as well as β cell survival upon streptozotocin treatment.

Key words : PCSK9, LDLR, cholesterol, hepatocytes, bile acids, pancreas, insulin, diabetes.

LANGHI Cédric

L'Institut du Thorax, INSERM UMR 915, IRT UN, 8 quai Moncousu
44007 NANTES