



Université de Montréal

**Étude du polymorphisme rs3846662 de l'HMGCR dans le  
cerveau et le système périphérique**

par

Valérie Leduc, M.Sc.

Département de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en sciences biomédicales, option générale

Mai 2015

© Valérie Leduc, 2015



## Résumé

---

Dans cette thèse, l'impact du polymorphisme rs3846662 sur l'épissage alternatif de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (*HMGCR*) a été investigué *in vivo*, chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (HF) ou de maladie d'Alzheimer (MA). Le premier manuscrit adresse la problématique de la normalisation de la quantification relative des ARNm par PCR quantitative. Les découvertes présentées dans ce manuscrit nous ont permis de déterminer avec un haut niveau de confiance les gènes de référence à utiliser pour la quantification relative des niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* dans des échantillons de sang (troisième manuscrit) et de tissus cérébraux post-mortem (quatrième manuscrit).

Dans le deuxième manuscrit, nous démontrons grâce à l'emploi de trois cohortes de patients distinctes, soit la population canadienne française du Québec et les deux populations nord américaines « Alzheimer's Disease Cooperative Study (ADCS) » et « Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) », que le génotype AA au locus rs3846662 confère à ces porteurs une protection considérable contre la MA. Les femmes porteuses de ce génotype voient leur risque de MA diminuer de près de 50% et l'âge d'apparition de leurs premiers symptômes retarder de 3.6 ans. Les porteurs de l'allèle à risque *APOE4* voient pour leur part leurs niveaux de plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires diminuer significativement en présence du génotype AA. Enfin, les individus atteints de déficit cognitif léger et porteurs à la fois de l'allèle *APOE4* et du génotype protecteur AA voient leur risque de convertir vers la MA chuter de 76 à 27%.

Dans le troisième manuscrit, nous constatons que les individus atteints d'HF et porteurs du génotype AA ont, contrairement au modèle établi chez les gens normaux, des niveaux plus élevés de cholestérol total et de LDL-C avant traitement comparativement aux porteurs de l'allèle G. Le fait que cette association n'est observée que chez les non porteurs de l'*APOE4* et que les femmes porteuses du génotype AA présentent à la fois une augmentation des niveaux d'ARNm totaux et une résistance aux traitements par statines, nous indique que ce

génotype influencerait non seulement l'épissage alternatif, mais également la transcription de l'*HMGCR*. Comme une revue exhaustive de la littérature ne révèle aucune étude abondant dans ce sens, nos résultats suggèrent l'existence de joueurs encore inconnus qui viennent influencer la relation entre le génotype AA, l'épissage alternatif et les niveaux d'ARNm de l'*HMGCR*.

Dans le quatrième manuscrit, l'absence d'associations entre le génotype AA et les niveaux d'ARNm  $\Delta 13$  ou de protéines HMGCR nous suggère fortement que ce polymorphisme est non fonctionnel dans le SNC affecté par la MA. Une étude approfondie de la littérature nous a permis d'étayer cette hypothèse puisque les niveaux de HNRNPA1, la ribonucléoprotéine influencée par l'allèle au locus rs3846662, sont considérablement réduits dans la MA et le vieillissement. Il est donc proposé que les effets protecteurs contre la MA associés au génotype AA soient le résultat d'une action indirecte sur le processus physiopathologique.

**Mots-clés** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, rs3846662, épissage alternatif, ARNm, maladie d'Alzheimer, statine, hypercholestérolémie familiale, normalisation, quantification relative d'ARNm.

# Abstract

---

In this thesis, the impact of rs3846662 polymorphism on the alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*HMGCR*) was investigated *in vivo*, in patients with familial hypercholesterolemia (FH) or Alzheimer disease (AD). The first manuscript addresses the issue of normalization in relative quantification of mRNA by quantitative PCR. The findings presented in this manuscript have allowed us to determine with a high level of certainty the appropriate reference genes to use for the relative quantification of *HMGCR* mRNA levels in blood samples (third manuscript) and postmortem brain tissues (fourth manuscript).

In the second manuscript, we demonstrate through the use of three independent cohorts, namely the French Canadian population of Quebec and the two North American populations named "Alzheimer's Disease Cooperative Study (ADCS)" and "Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)", that the AA genotype at locus rs3846662 confers significant protection against AD. Women carrying this genotype decrease their risk of AD by about 50%, and delay their age of onset of 3.6 years. For their part, individuals carrying both the *APOE4* risk allele and the AA genotype have decreased levels of senile plaques and neurofibrillary tangles compared to individuals carrying both the *APOE4* and *HMGCR* G alleles. Finally, individuals suffering from mild cognitive impairment and carrying both the *APOE4* risk allele and the protective AA genotype see their risk of converting to AD drop from 76% to 27%.

In the third manuscript, contrary to the model described in normal subjects, we discovered that individuals with FH carrying the AA genotype have higher levels of total cholesterol and LDL-C before treatment compared to the carriers of the G allele. This latter association is observed only in non-carriers of the *APOE4* risk allele. Furthermore, women carrying the AA genotype have both an increase in total *HMGCR* mRNA levels and a decrease response to statin treatment. These results suggest the AA genotype has an impact not only on the alternative splicing, but also on the transcription of *HMGCR*. Since an exhaustive review

of the literature has reveal no studies corroborating this hypothesis, our results suggest the existence of yet unknown players influencing the relationships between the AA genotype, alternative splicing and the mRNA levels of *HMGCR*.

In the fourth manuscript, we uncovered no association between the AA genotype and  $\Delta 13$  mRNA or HMGCR protein levels. This strongly suggests that the rs3846662 polymorphism is not functional in the CNS affected by AD. A thorough study of the literature enabled us to support this hypothesis since the levels of HNRNPA1, the ribonucleoprotein influenced by the allele status at rs3846662 locus, are significantly reduced in AD and aging. Accordingly, we propose that the protective effects of the AA genotype against AD may be mediated through indirect effects on the physiopathology of the disease.

**Keywords:** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, rs3846662, alternative splicing, mRNA, Alzheimer's disease, statin, familial hypercholesterolemia, normalization, relative quantification of mRNA.

## Résumé de vulgarisation

---

Tout comme la brique est un constituant essentiel des murs d'une maison, les gras comme le cholestérol sont des constituants essentiels des cellules de notre corps. Ce projet de recherche se penche donc sur l'une des ouvrières (ou protéines) les plus importantes du corps humain : celle qui s'affère à construire le cholestérol. C'est précisément cette protéine que l'on rend partiellement inefficace lorsqu'on prend des médicaments de la classe des statines (ou Lipitor®, Crestor®, Mevacor®, Pravachol®, Zocor®, Lescol®) qui réduisent le cholestérol sanguin. On sait que cette protéine, qui porte un nom bien exotique (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, ou HMGCR), peut être produite à partir de deux canevas (ou ARNm) distincts. Alors que le premier ARNm est complet et permet la création d'une protéine efficace, le deuxième est incomplet et génère une protéine inefficace. Cette dualité au niveau des ARNm serait attribuable, en partie, à une petite lettre variable positionnée à un endroit bien particulier (ou polymorphisme localisé au locus rs3846662) du livre d'instructions (ou ADN) duquel découle les ARNm : lorsqu'un A plutôt qu'un G se retrouve à cette position, notre corps produit une plus grande quantité d'ARNm incomplets. C'est comme si les gens qui portent cette lettre A au niveau de leur ADN sur leur deux chromosomes (ou génotype AA) étaient, depuis leur naissance, sous l'action d'une statine. Or, certaines études de grands bassins de population ont démontré que la prise de statines pouvait retarder l'apparition de la maladie d'Alzheimer. De plus, on constate que la réduction du cholestérol sanguin chez les gens qui prennent des statines est variable entre les individus. Nous avons donc cherché à savoir si cette fameuse petite lettre pouvait avoir un rôle à jouer dans ces deux situations. D'une part, nous avons découvert qu'effectivement, les gens, particulièrement les femmes, qui sont porteurs du génotype AA diminuent de près de 50% leur risque de développer la maladie d'Alzheimer. De plus, pour ceux ayant développé un déficit cognitif léger (pré-Alzheimer), la conversion de leur état vers la maladie d'Alzheimer est considérablement réduite et s'ils en viennent à développer la maladie, celle-ci apparaîtra à un âge plus avancé. Toutefois, des études plus poussées d'individus décédés de la maladie d'Alzheimer ne nous ont pas permis de confirmer que les porteurs du génotype AA produisaient effectivement plus d'ARNm incomplets. D'autre part, contrairement à nos



attentes, nous avons découvert que les gens atteints d'hypercholestérolémie familiale qui portent le génotype AA mais qui ne reçoivent pas de médicaments ont des niveaux de cholestérol sanguins plus élevés. Lorsqu'on administre une statine à ces individus, on constate que les femmes répondent moins bien à leur traitement (réduisent moins leur cholestérol sanguin) et qu'elles ont plus d'ARNm complets. Bref, l'ensemble de nos études ont mis en lumière le fait que chez les gens atteints d'une maladie comme l'Alzheimer ou l'hypercholestérolémie familiale, le lien entre le génotype AA et la quantité d'ARNm incomplets n'est pas aussi simple et direct que chez les sujets sains.

# Table des matières

---

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Résumé de vulgarisation.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des encadrés.....	xiii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 - Introduction.....	1
Chapitre 2 - Recension de la littérature.....	8
Chapitre 3 - Méthodologie.....	29
Chapitre 4 - Résultats.....	30
4.1 Normalization of gene expression using SYBR Green qPCR: A Case for Paraoxonase 1 and 2.....	30
4.1.1 Avant-propos.....	30
4.1.2 Authors, Abstract, keywords and abbreviations.....	30
4.1.3 Introduction.....	31
4.1.4 Materials and methods.....	33
4.1.5 Results.....	36
4.1.6 Discussion.....	41
4.1.7 Conclusions.....	42
4.1.8 Acknowledgements.....	42
4.2 <i>HMGCR</i> is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to Alzheimer's disease in a three cohorts study.....	43
4.2.1 Avant-propos.....	43

4.2.2 Authors, abstract, keywords and conflict of interest.....	43
4.2.3 Introduction.....	45
4.2.4 Material and method .....	48
4.2.5 Results.....	51
4.2.6 Discussion.....	58
4.2.7 Acknowledgements.....	60
4.3 Role of rs3846662 and <i>HMGCR</i> alternative splicing in statin efficacy and baseline lipid levels in familial hypercholesterolemia .....	62
4.3.1 Avant-propos.....	62
4.3.2 Authors, abstract, keywords, conflict of interest and source of funding .....	62
4.3.3 Introduction.....	63
4.3.4 Methods.....	66
4.3.5 Results.....	71
4.3.6 Discussion and conclusion.....	75
4.3.7 Acknowledgments.....	80
4.4 Effects of rs3846662 variants on <i>HMGCR</i> mRNA and protein levels and on markers of Alzheimer’s disease pathology .....	81
4.4.1 Avant-propos.....	81
4.4.2 Authors, abstract, keywords and conflict of interest.....	81
4.4.3 Introduction.....	82
4.4.4 Material and Methods .....	84
4.4.5 Results.....	89
4.4.6 Discussion .....	95
4.4.7 Funding .....	100
Chapitre 5 – Discussion générale.....	101
5.1 Sommaire et originalité de la thèse.....	101
5.2 Contributions spécifiques à l’avancement des connaissances .....	103
5.2.1 Détermination des niveaux d’ARNm par quantification relative .....	103
5.2.2 Étude de l’ <i>HMGCR</i> dans le système vasculaire et l’HF.....	105
5.2.3 Étude de l’ <i>HMGCR</i> dans le SNC et la MA .....	106
Chapitre 6 – Conclusions et projets futurs.....	110

Bibliographie.....	112
Annexe 1 – Curriculum vitae abrégé .....	xx

# Liste des tableaux

---

## Chapitre 2

- Table 2.1 : Caractéristiques distinctives entre les trois principales isoformes de l'APOE chez l'humain.

## Chapitre 4

- Table 4.1.1: Demographic characteristics.
- Table 4.1.2: Target and reference genes description.
- Table 4.1.3: Rank order of the ten candidate ERGs (from best to worst, top to bottom) according to BestKeeper, geNorm and NormFinder software applications.
- Table 4.1.4: Factor of upregulation of PON1 and PON2 in the human post-mortem frontal cortex afflicted by AD in comparison to non-demented controls.
- Table 4.2.1: QFP, ADCS and ADNI Demographics.
- Table 4.2.2: Binary logistic regression between *HMGCR* rs3846662 and the AD status (QFP cohort).
- Table 4.2.3: Binary logistic regression between *HMGCR* rs3846662 and the AD status (ADCS cohort).
- Table 4.3.1: Characteristics of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia due to the >15kb deletion of the *LDLR*.
- Table 4.4.1: Demographic characteristics of the studied cohort.
- Table 4.4.2: Spearman correlations between key *HMGCR* parameters and markers of AD pathology in the frontal cortex.
- Table 4.4.3: Spearman correlations between key *HMGCR* parameters and markers of AD pathology in the cerebellum.

# Liste des figures

---

## Chapitre 1

- Figure 1.1 : Le gène et la protéine HMGCR.
- Figure 1.2 : Tétramérisation des domaines catalytiques de l'HMGCR.

## Chapitre 2

- Figure 2.1 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du cholestérol.
- Figure 2.2 : Régulation de la transcription de l'*HMGCR* par SREBP.
- Figure 2.3 : Régulation de la dégradation de l'HMGCR par Insig.
- Figure 2.4 : Impact du polymorphisme rs3846662 sur l'épissage alternatif de l'*HMGCR*.
- Figure 2.5 : Formation et internalisation des lipoprotéines au SNC.
- Figure 2.6 : Illustration des deux marqueurs pathologiques de la MA.
- Figure 2.7 : Les cinq phases d'accumulation de l'A $\beta$  dans la MA.
- Figure 2.8 : L'accumulation des DNF dans la MA.
- Figure 2.9 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du cholestérol et des isoprénoïdes conduisant à la phosphorylation des protéines Tau.
- Figure 2.10 : Homéostasie du cholestérol dans le système périphérique.

## Chapitre 4

- Figure 4.2.1: Age of onset in *HMGCR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.
- Supplementary material 4.2.1: Age of onset in *HMGCR* rs3846662 intron 13 genotype carriers.
- Figure 4.2.2: Kaplan–Meier Estimates of the Rate of Progression from Normal to Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD).
- Supplementary material 4.2.2: Effect of *APOE* genotype on senile plaques densities in AD stratified by *HMGCR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.

- Supplementary material 4.2.3: Effect of *APOE* genotype on tangles pathology in AD stratified by *HMGCR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.
- Figure 4.3.1: Baseline lipid levels of  $\Delta$  TC (A) and  $\Delta$  LDL-C (B) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) according to rs3846662 genotype and the presence of the *APOE4* allele.
- Figure 4.3.2: LDL-C reduction relative to baseline upon statin treatment (A) and efficacy of statin treatment at reducing LDL-C (B) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) according to rs3846662 genotype and gender status.
- Figure 4.3.3: Ratios of full length *HMGCR* mRNA (A, left) and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA (A, right) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) treated with statin according to rs3846662 genotype. mRNA levels of total *HMGCR* (B), full-length *HMGCR* variant (C) and  $\Delta$ 13 *HMGCR* variant (D) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) treated with statin according to rs3846662 genotype and gender status
- Figure 4.3.4: Associations of full length *HMGCR* mRNA ratio (panel A) and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA ratio (panel B) with LDL-C reduction relative to baseline (upper graphs) and efficacy of statin treatment at reducing LDL-C (lower graphs) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) treated with statin.
- Figure 4.3.5: Expected impact of A or G allele at locus rs3846662 of *HMGCR* gene on baseline lipid levels in normal individuals.
- Figure 4.4.1: FL *HMGCR* mRNA ratio in the frontal cortex (A, B) and the cerebellum (C, D) according to rs3846662 genotype in the whole studied cohort (A, C) and sex subgroups (B, D).
- Figure 4.4.2: Scatter plot between the FL and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA ratios (A), and scatter plots between *HMGCR* protein levels and FL (B) or  $\Delta$ 13 (C) *HMGCR* mRNA ratios.
- Figure 4.4.3: Scatter plot between FL and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA ratios in the cerebellum.

## Chapitre 5

- Figure 5.1: Impact respectif des allèles A ou G au locus rs3846662 de l'*HMGCR* sur la proportion d'ARNm  $\Delta$ 13, l'activité enzymatique, les niveaux de LDL-C circulants et le risque de MA.

# Liste des encadrés

---

## Chapitre 1

- Encadré 1 – De l'ADN à la protéine : les étapes.

## Chapitre 2

- Encadré 2 – SREBPs et SRE.
- Encadré 3 – Mécanisme général de l'épissage alternatif.
- Encadré 4 – Les marqueurs pathologiques de la MA : causes ou conséquences ?
- Encadré 5 – Réponse moléculaire de l'HMGCR à l'inhibition par une statine.
- Encadré 6 – Le diagnostic de l'HF.



## Liste des sigles et abréviations

---

$\Delta$ , délétion

A $\beta$ , amyloïde beta ou « beta amyloid »

ACTB, actine bêta ou « beta actin »

AD, maladie d'Alzheimer ou « Alzheimer's disease »

ADCS, « Alzheimer's disease Cooperative study »

ADN, acide désoxyribonucléique

ADNI, « Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative »

AMP, adénosine monophosphate

AMPK, kinase dépendante de l'AMP

APO, apolipoprotéine ou « apolipoprotein »

APP, précurseur de la protéine amyloïde

ARN, acide ribonucléique

ARNm, ARN messenger

ARNt, ARN de transfert

ATP, adénosine triphosphate

BMI, indice de masse corporel ou « body mass index »

CDKN1B, « cyclin-dependent kinase inhibitor 1B »

CNS, système nerveux central ou « central nervous system »

DCL, déficit cognitif léger

DNF, dégénérescence neurofibrillaire

ELISA, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ERG, gène de référence endogène ou « endogenous reference gene »

ESE, séquences régulatrices activatrices ou « exon splicing enhancer »

ESS, séquences régulatrices inhibitrices ou « exon splicing silencers »

FH, hypercholestérolémie familiale ou « familial hypercholesterolemia »

FL, pleine longueur ou « full-length »

GAPDH, « glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase »

GUSB, « beta glucuronidase »

HDL, lipoprotéine de haute densité  
HDL-C, cholestérol lié aux HDL  
HF, hypercholestérolémie familiale  
HKG, gène constitutif ou « housekeeping gene »  
HMG CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A  
HMGCR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase  
HNRNP, ribonucléoprotéine hétérogène  
HPRT1, « hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 »  
LDL, lipoprotéine de faible densité  
LDL-C, cholestérol lié aux LDL  
LDLR, récepteur à LDL  
MA, maladie d'Alzheimer  
MCI, déficit cognitif léger ou « mild cognitively impaired »  
MPRIIP, « myosin phosphatase Rho interacting protein »  
NFT, dégénérescence neurofibrillaire ou « neurofibrillary tangles »  
PCR, réaction en chaîne par polymérase ou « polymerase chain reaction »  
PGK1, « Phosphoglycerate kinase 1 »  
POL2RF, « Polymerase II polypeptide F »  
PON, paraoxonase  
PPIA, « peptidylprolyl isomerase A »  
PS, préséniline  
P-Tau, Tau phosphorylée  
QFP, population québécoise fondatrice ou « Quebec founder population »  
qPCR, PCR quantitative  
RE, réticulum endoplasmique  
RIN, « RNA integrity number »  
RQI, « RNA Quality Indicator »  
SNC, système nerveux central  
SNP, polymorphisme d'un seul nucléotide ou « single nucleotide polymorphism »  
SP, plaque sénile ou « senile plaque »  
SRE, « Sterol Regulatory Element »

SREBP, « Sterol Regulatory Element Binding Protein »

TC, cholestérol total

TG, triglycéride

T-Tau, Tau totale

UBE2D2, « ubiquitin-conjugating enzyme E2D2 »

VLDL, lipoprotéines de très faible densité

YES1, « v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 (c-yes) »

*À tous ceux qui ont généreusement fait don de  
leurs organes et tissus pour la science et la  
recherche*

# Remerciements

---

La citation veut que derrière chaque grand homme, se cache une femme. Et bien ici, derrière la femme qui complète son doctorat, se cache une foule de gens exceptionnels sur lesquels j'aimerais braquer l'attention.

**M**ais par qui commencer? Sans nul doute, par le superviseur qui m'a accompagnée depuis le tout début de mes études supérieures, le Dr Judes Poirier. Connaissez-vous beaucoup de chercheurs qui accepteraient de mettre l'un de ses projets coup-de-cœur sur la glace pour deux ans afin de permettre à son étudiante de débiter des études de médecine? Je crois qu'ils sont bien peu nombreux. Judes, merci du fond du cœur pour ta générosité, pour tout le temps que tu as investi dans ma formation, pour m'avoir offert autant d'opportunités et pour tes innombrables conseils et encouragements. Tu es incontestablement un modèle à suivre.

**E**nsuite, je remercie mon directeur de recherche, le Dr Robert Dufour, pour son ouverture et son soutien inconditionnel. L'intelligence et la force tranquille que vous dégagez inspirent confiance et poussent à donner le meilleur de nous-mêmes.

**R**étrospectivement, je constate que la qualité des gens qui m'ont entourée durant tout mon parcours d'études a grandement contribué à rehausser la qualité de ce projet. Louise, Doris, Louis et Stéphanie, la passion et le talent qui vous habitent m'ont poussé à me dépasser.

**C'**est sans l'ombre d'un doute grâce à ma famille, particulièrement ma mère Pierrette et mon père Alain, que j'ai pu réaliser de telles études mais aussi, surmonter les épreuves et accomplir les beaux projets que la vie a mis sur ma route. Comme il est doux, rassurant et apaisant de pouvoir sans cesse compter sur vous. Chaque succès, je vous le dois. Je ne serais pas la personne que je suis devenue sans vous deux : je vous aime.

**I**mmanquablement, je terminerai par toi, mon amour. Toi qui s'amuse à dire que je serai encore aux études à 40 ans, il n'en reste pas moins que tu as accepté d'embarquer dans cette aventure avec moi puisque tu portes une bien grande partie du fardeau financier et émotif de mes études. Martin, les mots me manquent pour te dire à quel point je me sens privilégiée de pouvoir cheminer à tes côtés : je t'aime.

# Chapitre 1 - Introduction

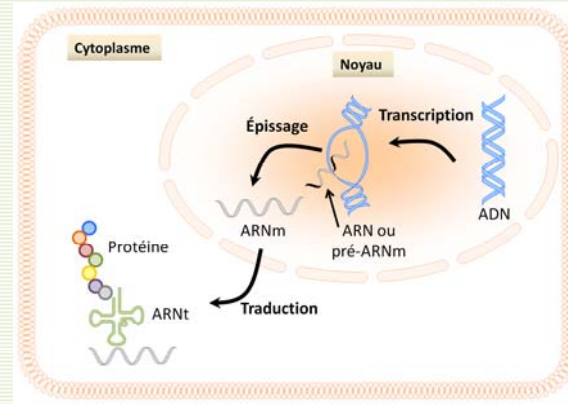
---

Selon l'organisation mondiale de la santé, les maladies cardiovasculaires dominent le palmarès des causes de décès dans le monde <sup>20</sup>. Pourtant, près de 80% des décès et incapacités résultant de ces maladies pourraient être évité par des mesures simples de réduction de l'hypertension, de l'hypercholestérolémie, de l'obésité, du diabète et du tabagisme, ainsi que par une alimentation saine et de l'exercice physique <sup>21</sup>. Dans un même ordre d'idée, selon la Société Alzheimer Canada, un canadien sur cinq développait en 2008 un trouble de la mémoire et de ce nombre, près de 50% sont des cas de maladie d'Alzheimer <sup>22</sup>. D'ici 2038, on diagnostiquera un nouveau cas de maladie associée à un trouble de la mémoire à toutes les deux minutes, augmentant d'un facteur de 10 autant la demande de soins de longue durée que le fardeau économique associé à ces maladies <sup>22</sup>. Or, « on estime que près de la moitié des cas d'Alzheimer à travers le monde serait le résultat de sept principaux facteurs de risque modifiables: le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité, le tabagisme, la dépression, l'inactivité cognitive ou le faible niveau d'instruction, et l'inactivité physique » <sup>23</sup>. Ainsi, le proverbe qui veut que « prévenir vaut mieux que guérir » prend ici tout son sens.

Les maladies cardiovasculaires et la maladie d'Alzheimer partagent donc les mêmes principaux facteurs de risque liés aux habitudes de vie. Le métabolisme des lipides ayant un impact considérable sur l'intégrité des vaisseaux sanguins, il joue assurément un rôle central pour l'intégrité à la fois du système vasculaire et du système nerveux central. Notamment, six des dix principaux facteurs de risque génétique identifiés par études pangénomiques pour la forme commune de la maladie d'Alzheimer impliquent des gènes (et protéines) jouant un rôle dans le transport du cholestérol (APOE, APOJ), son internalisation par les cellules cérébrales (PCALM, BIN1), son transport intracellulaire (ABCA7) et le remodelage lipidique (BUCHE) de son principal véhicule de transport: le HDL <sup>24-27</sup>. La 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR), l'enzyme clé régulant la synthèse intracellulaire de cholestérol et la cible thérapeutique des médicaments de type statine, est au cœur du métabolisme lipidique et représente donc une molécule de choix pour l'étude sur la prévention des maladies cardiovasculaires ainsi que de la maladie d'Alzheimer. Mais par où commencer?

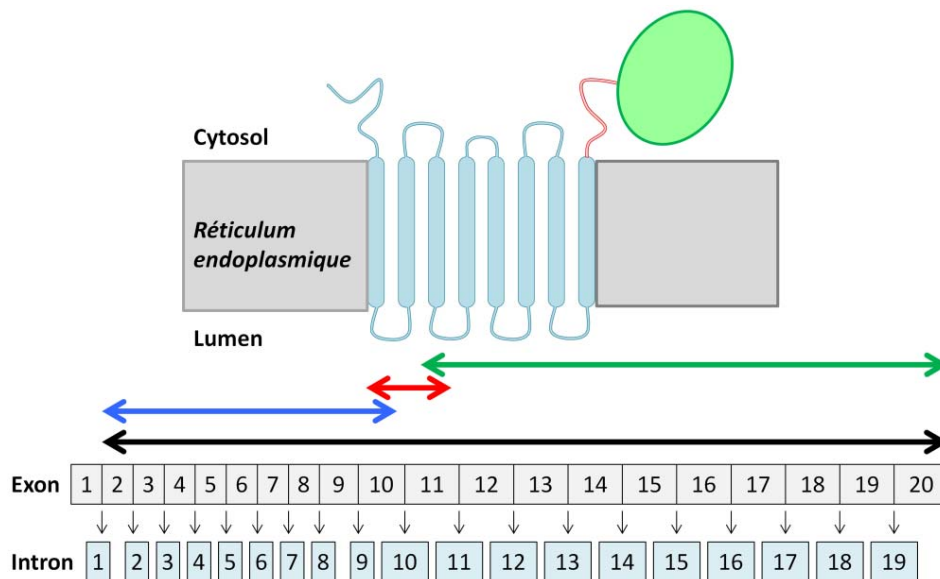
Le gène de l'*HMGCR* situé sur le bras long du chromosome cinq est composé de 20 exons et 19 introns, et est transcrit en deux formes majeures d'ARNm<sup>28</sup> (consultez l'encadré 1 pour un rappel sur les étapes conduisant à la production d'une protéine). Le premier transcrit, l'ARNm pleine longueur, contient tous les exons 2 à 20 et est traduit en une protéine de 888 acides aminés<sup>29</sup>. Le deuxième transcrit a pour sa part la particularité de ne pas contenir d'exon 13, et porte ainsi le nom d'ARNm Δ13. Bien qu'aucune étude n'ait encore démontré qu'une protéine est bel et bien produite *in vivo* à partir de cet ARNm modifié, notons que cette protéine serait fort probablement caractérisée par l'amputation de sa capacité enzymatique puisque l'exon 13 code pour une partie du site catalytique<sup>29</sup> (Figure 1.1). L'étude de la portion catalytique de l'*HMGCR* par l'équipe de Breslow au « Rockefeller University » suggère d'ailleurs que l'absence de l'exon 13 résulte en la production d'une protéine d'activité nulle<sup>30</sup>. Toutefois, la portion catalytique de l'*HMGCR* s'assemble et agit sous forme de tétramère<sup>31</sup>. Tel que suggéré par les équipes de Medina et Krauss du « Children's Hospital Oakland Research Institute », l'existence de ces deux

Encadré 1 – De l'ADN à la protéine : les étapes.



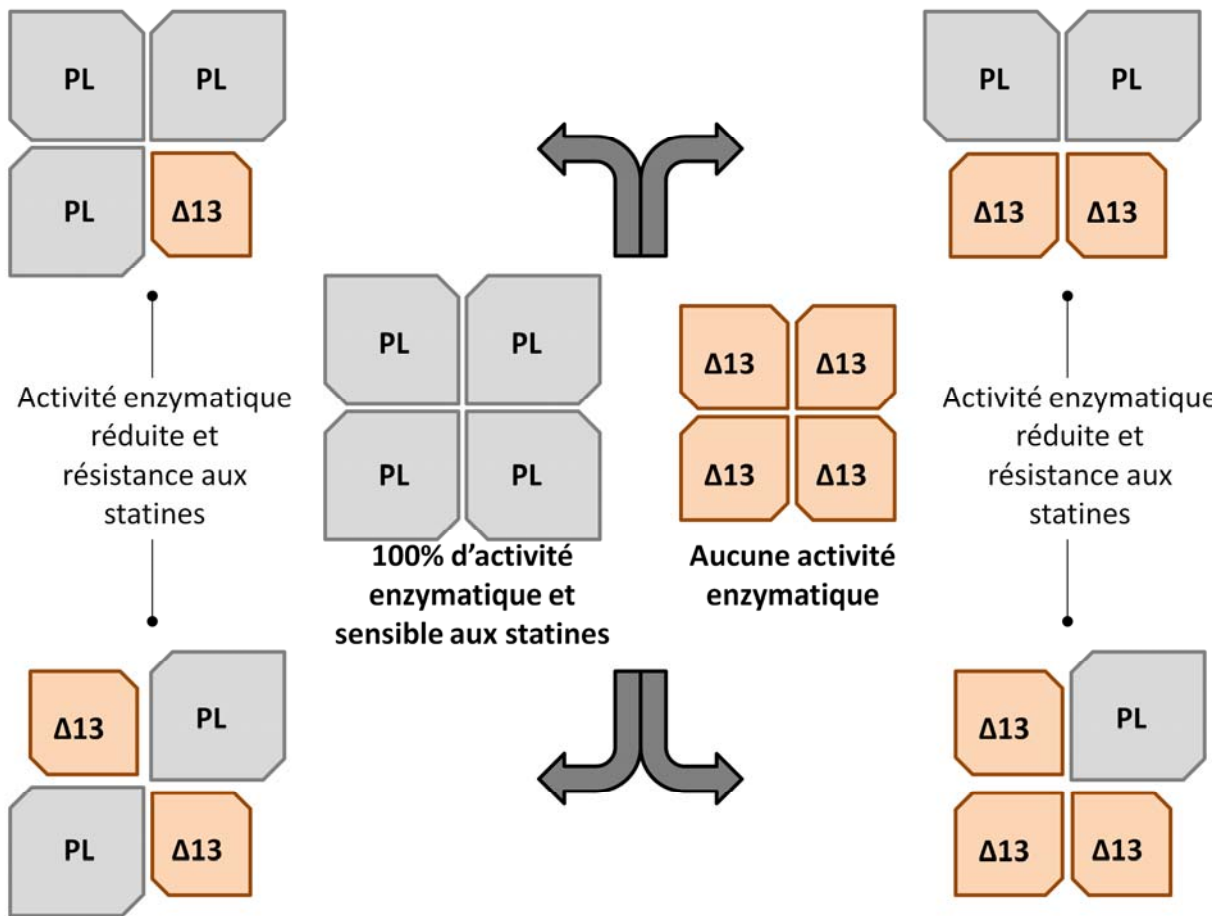
Toutes les instructions permettant la construction des composantes de l'être humain sont encodées sous forme d'acide désoxyribonucléiques (ADN) et enfouies dans le noyau de chacune de nos cellules. Cette information étant précieuse, elle ne quittera jamais la protection que lui offre le noyau. Lorsque la cellule désire produire une protéine ou enzyme quelconque, elle copie le segment d'ADN (ou gène) qui contient cette information en une chaîne d'acides ribonucléiques (ARN). Cette chaîne, une fois épurée de l'information moins essentielle (ou des introns) par un processus nommé « épissage », porte le nom d'ARN messenger (ARNm). Véritable explorateur, cet ARNm quitte la protection du noyau et s'aventure dans le cytoplasme de la cellule, lieu de production par excellence des protéines. L'ARNm y est traduit par les ARN de transfert (ARNt) en une chaîne d'acides aminés nommée protéine, et c'est cette dernière qui exercera une action concrète sur le corps (image créée grâce aux outils montifolio.com).

transcrits d'ARNm (i.e. pleine longueur et  $\Delta 13$ ) et des protéines qui en découleraient pourrait conduire à la formation de tétramères d'HMGCR d'activité variée<sup>32</sup> (Figure 1.2). Puisque les statines, les médicaments les plus prescrits pour réduire les niveaux de cholestérol circulant, agissent en se liant de façon compétitive aux sites catalytiques de l'HMGCR, la présence de monomères modifiés ( $\Delta 13$ ) pourrait également conduire à la formation de tétramères plus résistants à l'action des statines<sup>32</sup> (Figure 1.2). Cette fascinante hypothèse pourrait influencer le métabolisme du cholestérol des individus et contribuer à expliquer une partie de la variabilité observée quant aux niveaux de base de cholestérol circulants ainsi qu'à la réduction du cholestérol chez les patients traités par statines<sup>32,33</sup>. Étant donné l'importance que revêt le métabolisme lipidique pour le système vasculaire et le système nerveux central, la présence d'ARNm  $\Delta 13$  pourrait jouer un rôle primordial dans les maladies cardiovasculaires et la maladie d'Alzheimer.



**Figure 1.1 : Le gène et la protéine HMGCR.** La portion codante du gène de l'*HMGCR* s'étend de l'exon 2 à l'exon 20 (flèche noire). La protéine HMGCR se caractérise par 3 domaines majeurs : une portion transmembranaire représentée en bleu (exons 2 à 10), une portion liante représentée en rouge (exons 10 à 11) et une portion catalytique soluble représentée en vert (exons 11 à 20). Image créée grâce aux outils montifolio.com.





**Figure 1.2 : Tétramérisation des domaines catalytiques de l'HMGCRCR.** L'HMGCRCR s'assemble en tétramère composé de deux dimères<sup>29</sup>. Bien que la protéine découlant de la traduction de l'ARNm Δ13 n'aurait vraisemblablement aucune activité catalytique<sup>30</sup>, cette dernière pourrait fort bien s'assembler à des monomères pleines longueurs (PL) et ainsi, former des tétramères d'activité enzymatique et de sensibilité aux statines variées. Image inspirée de<sup>32</sup>.

Mise à part le polymorphisme génétique localisé au locus rs3846662 de l'intron 13 de l'*HMGCRCR* qui semble impliqué dans l'épissage alternatif du pré-ARNm<sup>7, 30, 33</sup>, on connaît peu les facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la génération des différents transcrits d'ARNm de l'*HMGCRCR*. De telles découvertes nécessitent la réalisation d'études génétiques et de méthylation de grande envergure. Étant donné le coût et le temps considérable associés à ce type d'analyse, nous nous proposons d'abord d'évaluer si la présence des variants d'ARNm de l'*HMGCRCR* a un impact clinique suffisamment intéressant pour justifier la réalisation de telles analyses. Les maladies cardiovasculaires survenant à un âge très précoce chez les gens atteints

d'hypercholestérolémie familiale, nous évaluerons l'impact clinique de l'HMGCR dans cette condition. De plus, afin d'explorer l'impact de l'HMGCR dans le système nerveux central, nous évaluerons également l'impact clinique de l'HMGCR dans la maladie d'Alzheimer.

Bref, la présente thèse se penche sur l'impact du polymorphisme rs3846662 et des deux principaux transcrits d'ARNm de l'*HMGCR* dans la maladie d'Alzheimer et l'hypercholestérolémie familiale. Nous débuterons notre aventure par le chapitre 2 où nous réviserons en détails les particularités de la protéine HMGCR, les caractéristiques du métabolisme du cholestérol dans le système nerveux central et le système périphérique ainsi que les caractéristiques des maladies d'Alzheimer et d'hypercholestérolémie familiale. Nous poursuivrons ensuite par le chapitre 3 où les principes des méthodes expérimentales employées dans cette thèse sont décrits. Nous nous attarderons par la suite au chapitre 4 où l'ensemble des résultats générés au cours de nos études sont présentés. Ces résultats sont présentés sous la forme de quatre articles scientifiques. Ces derniers sont tous publiés et ont été soumis à un processus rigoureux de révision par les pairs. Nous enchaînerons avec le chapitre 5 où une discussion générale des quatre articles est présentée. Nous concluons cette aventure par le chapitre 6 où nous résumerons les grandes lignes de ce travail de doctorat.

Enfin, puisque les travaux présentés dans cette thèse de doctorat sont le fruit non seulement de mon travail acharné mais également, de la contribution de plusieurs personnes, j'aimerais conclure ce chapitre d'introduction en énumérant l'implication de chacun des coauteurs pour chacun des articles produits et présentés dans cette thèse.

**#1** Leduc, V., Legault, V., Dea, D. & Poirier, J. (2011) Normalization of gene expression using SYBR green qPCR: a case for paraoxonase 1 and 2 in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Methods*, 200, 14-19.

Planification de l'étude : Leduc et Poirier

Collecte des tissus et extraction d'ARN : Leduc, Legault, Dea

Évaluation de la qualité de l'ARN et quantification : Leduc

Analyses et statistiques : Leduc

Rédaction, révision et publication du manuscrit : Leduc et Poirier

**#2** Leduc, V., De Beaumont, L., Theroux, L., Dea, D., Aisen, P., Petersen, R.C., ADNI, Dufour, R. & Poirier, J. (2015) HMGCR is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to Alzheimer's disease in a three cohorts study. Mol Psychiatry, Jul; 20 (7) : 867-73.

Planification de l'étude : Leduc, De Beaumont, Poirier

Collecte des données démographiques : Leduc, De Beaumont, Theroux, Dea, Aisen, Petersen, ADNI, Poirier

Extraction d'ADN, séquençage et géotypage: Leduc, Theroux, Dea, ADNI

Analyses et statistiques : Leduc, De Beaumont, Poirier

Rédaction, révision et publication du manuscrit : Leduc, De Beaumont, Dufour, Poirier

**#3** Leduc, V., Bourque, L., Poirier, J. & Dufour, R. (2016) Role of rs3846662 and HMGCR alternative splicing in statin efficacy and baseline lipid levels in familial hypercholesterolemia. Pharmacogenet Genomics, Jan; 26 (1) :1-11.

Planification de l'étude : Leduc, Dufour

Collecte des données démographiques : Leduc

Collecte des consentements et échantillons de sang : Bourque

Quantification des niveaux lipidiques dans le sang : laboratoire de l'Hôtel-Dieu

Extraction d'ADN et géotypage : Leduc

Extraction d'ARN et quantification : Leduc

Analyses et statistiques : Leduc

Rédaction et révision du manuscrit : Leduc, Poirier, Dufour

**#4** Leduc, V., Theroux, L., Dea, D., Dufour, R. & Poirier, J. (2015) Effects of rs3846662 variants on HMGCR mRNA and protein levels and on markers of Alzheimer's disease pathology. J Mol Neurosci., Nov 5 (Epub ahead of print).

Planification de l'étude : Leduc, Poirier

Collecte des données démographiques : Leduc, Theroux

Extraction d'ADN et géotypage : Leduc, Theroux, Dea

Collecte des tissus et extraction d'ARN : Leduc, Dea

Évaluation de la qualité de l'ARN et quantification : Leduc

Extraction de protéines et quantification des niveaux d'HMGCR : Dea

Détermination des niveaux d'amyloïde et Tau : Theroux

Détermination des DNF/plaques séniles : Pathologistes variés

Analyses et statistiques : Leduc, Poirier

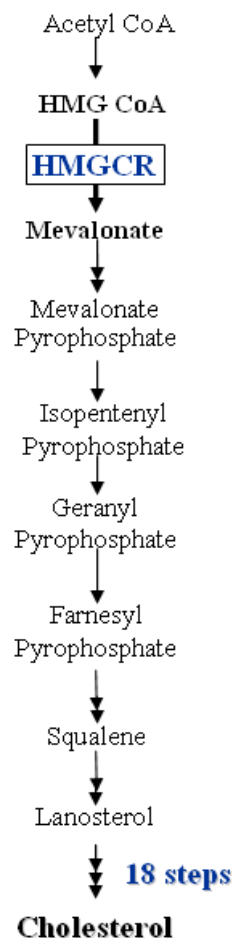
Rédaction du manuscrit : Leduc, Dufour, Poirier

## Chapitre 2 - Recension de la littérature

### 2.1 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR)

#### 2.1.1 Fonction et importance vitale

La 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR) est une enzyme essentielle à la vie puisque son absence provoque un arrêt du développement au stade embryonnaire <sup>34</sup>. L'importance de cette enzyme exprimée de façon ubiquitaire découle du fait qu'elle catalyse l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol et des isoprénoïdes, soit la conversion d'une molécule de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) en mévalonate (Figure 2.1) <sup>4, 9</sup>. D'abord, le cholestérol est une molécule vitale puisqu'il joue plusieurs rôles structuraux et métaboliques. Le cholestérol fait partie intégrante des membranes plasmiques où sa présence permet de réguler la fluidité de ces dernières, et il est une composante clé des radeaux lipidiques, soit des domaines spécialisés de la membrane nécessaires à l'activité de certaines protéines spécifiques telles les SNARE (qui permettent la fusion entre les cellules) <sup>9, 35, 36</sup>. De plus, le cholestérol constitue le substrat pour la synthèse de toutes les hormones stéroïdiennes, de plusieurs vitamines et des acides biliaires <sup>4, 9</sup>. Ensuite, les protéines dérivées des isoprénoïdes sont toutes aussi essentielles à la vie. Parmi ces dernières, mentionnons notamment certains ARNt, qui permettent à l'ARNm d'être traduit en protéines; l'ubiquinone, qui est essentielle au fonctionnement de la chaîne de transport mitochondriale des électrons; les protéines prénylées telles Ras et Rab, qui permettent la signalisation intracellulaire; et les cytokines, qui permettent la communication entre cellules <sup>4, 9</sup>.



**Figure 2.1 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du cholestérol.**

## 2.1.2 Régulation

Du fait de son importance, l'HMGCR est également l'une des enzymes les plus régulées du corps humain. La cellule utilise tous les moyens possibles afin de contrôler la vitesse de cette voie métabolique qui, d'une part, génère des molécules cruciales mais, d'autre part, est fort coûteuse énergétiquement. La régulation de l'HMGCR s'effectue essentiellement à trois niveaux :

1) Les molécules SREBPs assurent un contrôle au niveau de la **transcription** (voir encadré 2). Grâce à ce système, la transcription de l'*HMGCR* ne s'enclenche que lorsque les niveaux de stérols de la cellule sont bas (Figure 2.2) <sup>4,9</sup>.

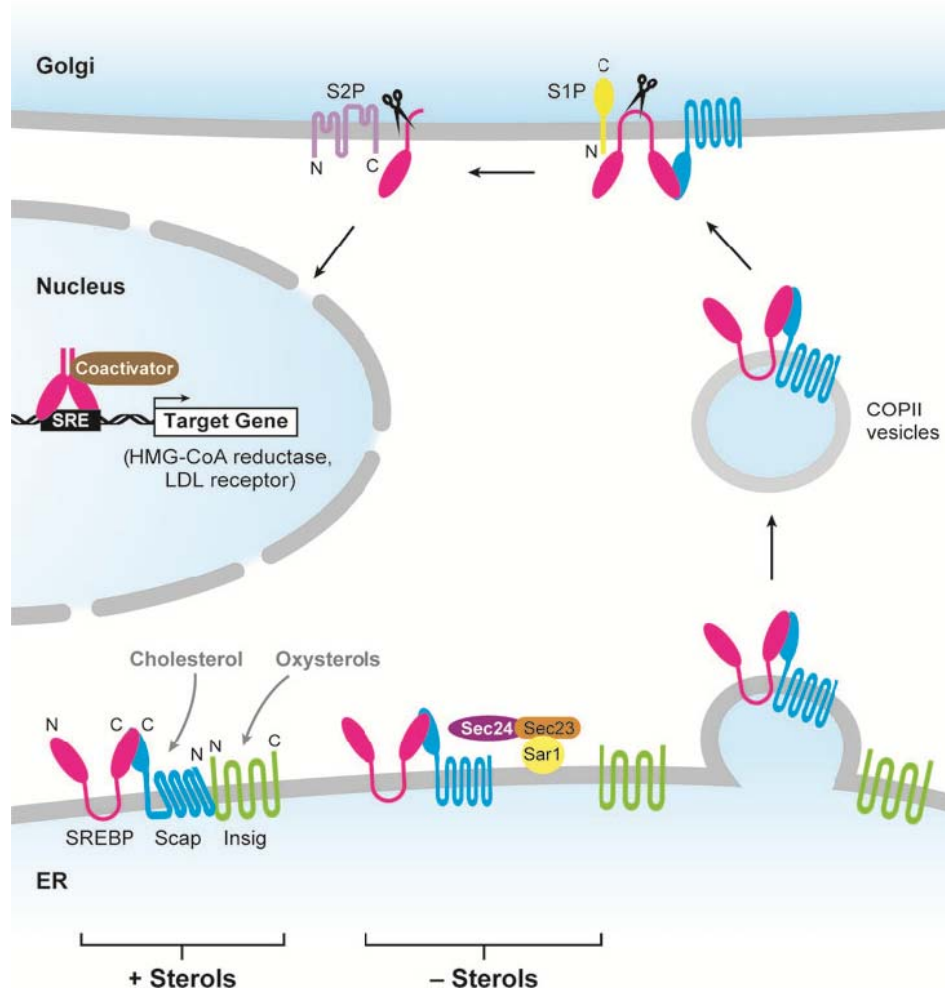
2) Les molécules Insig assurent quant à elles un contrôle au niveau de la **dégradation**. Grâce à ce système, la dégradation de la protéine HMGCR est stimulée lorsque les niveaux de lanostérol ou d'oxystérols augmentent, permettant d'empêcher la surproduction de cholestérol et de ces intermédiaires toxiques (lanostérol) (Figure 2.3) <sup>4,9,37,38</sup>.

---

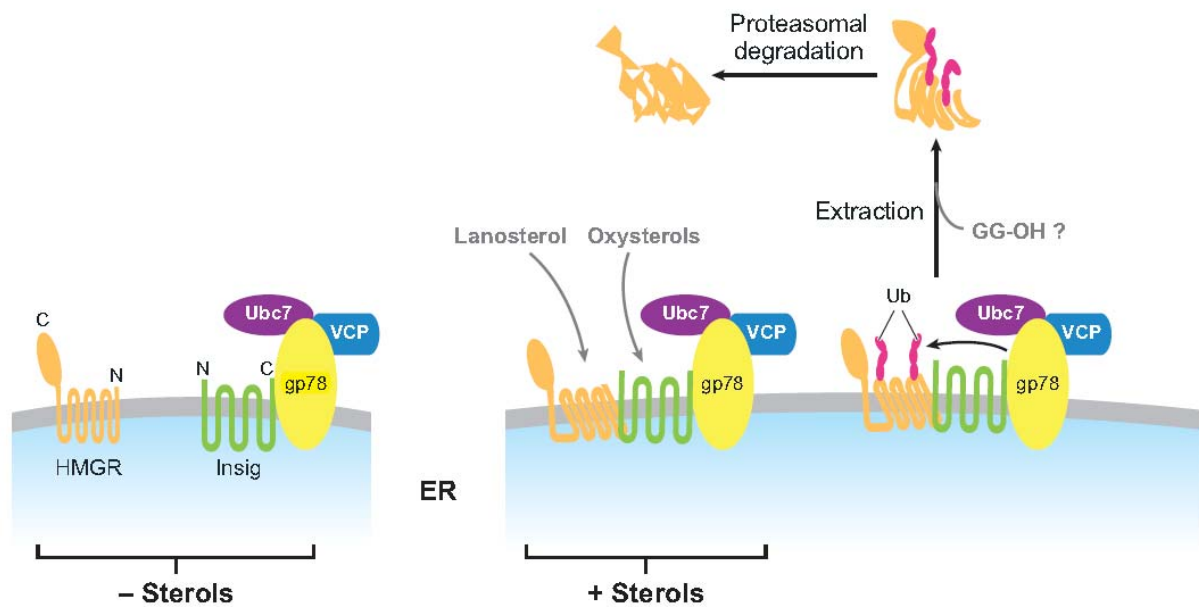
### *Encadré 2 – SREBPs et SRE.*

Les SREBPs, ou « Sterol Regulatory Element Binding Proteins », sont des facteurs de transcription membranaires qui reconnaissent spécifiquement les séquences SRE, ou « Sterol Regulatory Elements », localisées dans la région promotrice des gènes dont la transcription dépend des niveaux de stérols cellulaires. Lorsque ces niveaux sont bas, les SREBPs enclenchent la transcription des gènes possédant une séquence SRE et deviennent inactifs lorsque les niveaux de stérols retournent à la normal. Il existe trois isoformes de SREBP, soit SREBP-1a, SREBP-1c/ADD1 et SREBP-2. Alors que SREBP-1a enclenche la transcription de l'ensemble des gènes possédant une séquence SRE, SREBP-1c/ADD1 et SREBP-2 régule préférentiellement ceux impliqués dans la synthèse d'acides gras et dans l'homéostasie du cholestérol, respectivement. Bien que leurs cibles de transcription varient, ces trois isoformes sont régulées par les stérols via un mécanisme commun (Figure 2.2). Dans cette thèse, nous référerons donc à ces protéines collectivement, sous le nom de SREBPs <sup>9</sup>.

---



**Figure 2.2 : Régulation de la transcription de l'*HMGCR* par SREBP.** En présence de stérols (cholestérol ou oxystérols), le complexe SREBP-SCAP est retenu dans le réticulum endoplasmique (RE ou ER) par la protéine Insig. En absence de stérols, le complexe SREBP-SCAP est libéré d'Insig et est dirigé, par le complexe Sec23/24, vers la vésicule COPII qui le transporte vers l'appareil de golgi. Le domaine de transcription de SREBP y est libéré suite au clivage successif par les protéases S1P et S2P. Ce domaine de transcription se rend alors au noyau de la cellule où il active la transcription des gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, tels l'*HMGCR* et le récepteur de lipoprotéine de faible densité (*LDLR*), en se fixant à leur séquence promotrice SRE. SCAP : « SREBP cleavage activating protein »; Insig, « insulin induced gene »; S1P, protéase Site-1; S2P, protéase Site-2. Image tirée de <sup>9</sup>.



**Figure 2.3 : Régulation de la dégradation de l’HMGR par Insig.** En absence de stérols, l’HMGR est présente en grande quantité et ne se lie pas à Insig. En présence de lanostérol ou d’oxystérols, Insig entraîne l’ubiquitination et la dégradation subséquente de l’HMGR par le protéasome grâce à des interactions avec plusieurs autres protéines, soit « E2 conjugating enzyme Ubc7 », « E3 ubiquitine ligase gp78 » et l’ATPase VCP/p97. Le géranylgeraniol (GG-OH) augmente, par un mécanisme encore inconnu, la dégradation de l’HMGR ubiquitinée. Image tirée de <sup>9</sup>.

3) Enfin, les kinases dépendantes de l’adénosine monophosphate (AMPK) assurent un contrôle au niveau de l’**activité**. Grâce à ce système, l’activité de l’HMGR est inhibée par phosphorylation lorsque les niveaux d’adénosine monophosphate (AMP) augmentent, soit lorsque les réserves d’énergie (ou d’adénosine triphosphate, ATP) sont réduites <sup>39</sup>.

Existe-t-il d’autres mécanismes directs de régulation de l’HMGR? Tel que mentionné au chapitre 1, le gène de l’*HMGR* est transcrit en deux formes majeures d’ARNm : l’ARNm pleine longueur (PL) et l’ARNm ne contenant pas la partie encodée par l’exon 13 (ARNm  $\Delta 13$ ) <sup>28</sup>. Étant donné l’impact que pourrait avoir ces deux transcrits d’ARNm sur les niveaux d’activité des protéines HMGR tétramériques (voir Figure 1.2 pour un rappel), l’épissage alternatif de l’*HMGR* pourrait représenter un autre mécanisme intrinsèque de contrôle de



l'activité de l'HMGCR. Les mécanismes régulant l'épissage alternatif de l'*HMGCR* sont encore peu connus, mais de nombreuses études supportent le rôle du polymorphisme localisé au locus rs3846662 de l'*HMGCR* dans ce processus <sup>7,30,33,40</sup>.

### **2.1.3 Épissage alternatif et rs3846662**

Bien que le polymorphisme rs3846662 localisé dans l'intron 13 du gène de l'*HMGCR* ne puisse expliquer à lui seul l'épissage alternatif de ce dernier, plusieurs études démontrent que la présence de l'allèle A (plutôt que de l'allèle G) à cette position est associée à une excision accrue de l'exon 13 <sup>30, 33, 40</sup>. Le mécanisme à l'origine de ce phénomène a été découvert l'année dernière par l'équipe de Medina au « Children's Hospital Oakland Research Institute » <sup>7</sup>. Le polymorphisme rs3846662 est localisé en plein cœur d'un motif d'ADN permettant la liaison des ribonucléoprotéines hétérogènes A1 (hnRNPA1 ou HNRNPA1) et SRSF1 qui favorisent respectivement l'excision et la rétention des exons (voir encadré 3). Alors

---

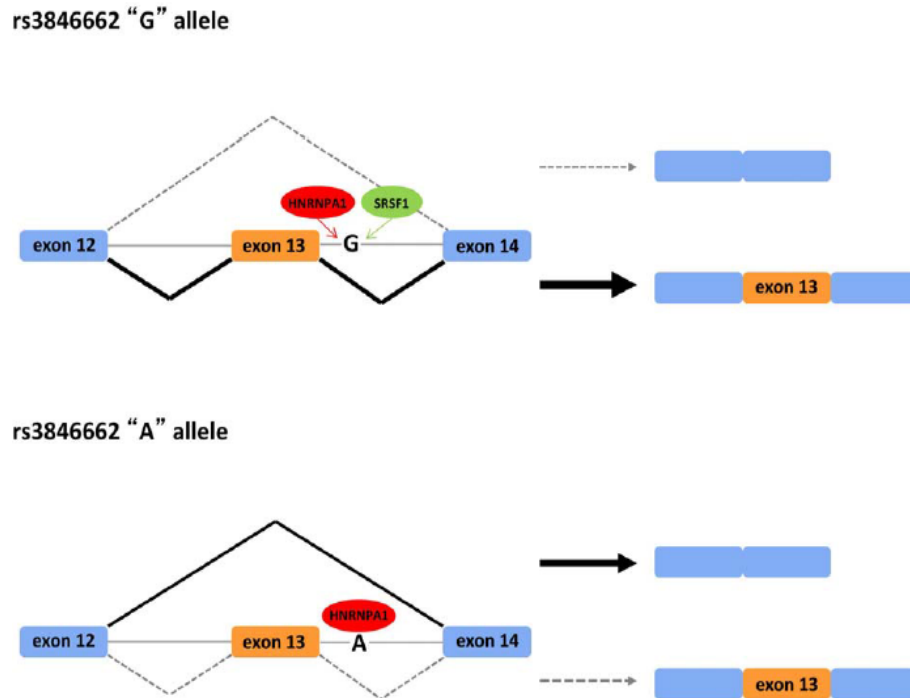
#### *Encadré 3 – Mécanisme général de l'épissage alternatif.*

À partir d'un ARN pré-messager qui représente la copie conforme de l'ADN génomique, l'épissage consiste à retirer les blocs non codants (introns) pour ne conserver que les codants (exons). Dans l'épissage constitutif, les séquences d'ARN aux jonctions intron-exon sont hautement conservées et suffisantes pour permettre une sélection non ambiguë des exons à conserver. Or, particulièrement chez les mammifères, les séquences d'ARN aux jonctions intro-exon peuvent être dégénérées et nécessiter le concours d'autres éléments afin de sélectionner les exons à conserver : c'est l'épissage alternatif. Ces éléments additionnels comprennent des séquences régulatrices activatrices ESE (« exon splicing enhancer ») reconnues par des protéines spécifiques nommées SR qui favorisent l'inclusion des exons, et des séquences régulatrices inhibitrices ESS (« exon splicing silencers ») reconnues par des ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP) favorisant plutôt l'excision des exons dans l'ARNm. Ainsi, un polymorphisme génétique intronique localisé dans une région ESE/ESS peut avoir une conséquence considérable sur la structure des protéines par le biais d'altérations de l'épissage <sup>6,7</sup>.

---

que la présence de l'allèle G est compatible avec la fixation de ces deux protéines, l'allèle A

détruit le motif de liaison de SRSF1, entraînant la fixation préférentielle de HNRNPA1 qui favorise l'excision de l'exon 13 (Figure 2.4) <sup>7</sup>.



**Figure 2.4 : Impact du polymorphisme rs3846662 sur l'épissage alternatif de l'HMGCR.** La présence de l'allèle A détruit le motif de liaison de la ribonucléoprotéine SRSF1, entraînant la fixation préférentielle de HNRNPA1 qui favorise l'excision de l'exon 13.

Figure tirée de <sup>7</sup>.

Ainsi, il a été démontré dans des lignées cellulaires périphériques que les porteurs du génotype AA (i.e. porteurs de l'allèle A sur chacun de leurs chromosomes 5) ont des niveaux d'ARNm  $\Delta 13$  plus élevés que les porteurs de l'allèle G <sup>30, 33, 40</sup>. Étant donné l'implication que ces niveaux augmentés d'ARNm  $\Delta 13$  pourrait avoir au niveau de l'activité de l'HMGCR (voir chapitre 1 pour un rappel), ce polymorphisme représente une cible génétique des plus intéressantes pour l'étude des maladies où l'HMGCR revêt un rôle important.

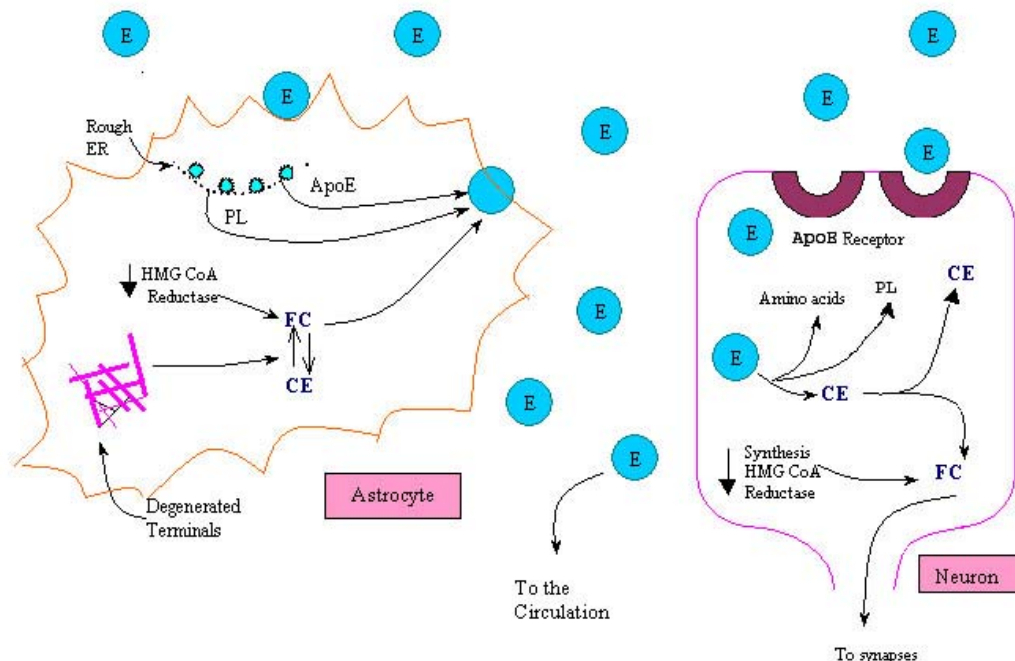
## **2.2 Système nerveux central, métabolisme du cholestérol et maladie d'Alzheimer**

### **2.2.1 Métabolisme du cholestérol et son importance dans le système nerveux central**

L'HMGCR revêt une importance primordiale pour le système nerveux central (SNC) puisque le cholestérol qu'elle produit y est requis en très grande quantité. En effet, le SNC est l'organe du corps humain le plus riche en cholestérol : il contient jusqu'à 25% du cholestérol total, alors qu'il ne représente que 2% de la masse corporelle <sup>41</sup>. En plus de constituer une composante essentielle des membranes cellulaires et des gaines de myéline, le cholestérol constitue le facteur limitant de la synaptogénèse *in vivo*, un processus requis pour toutes les activités de remodelage, croissance et plasticité neuronale qui se produisent en tout temps dans le cerveau <sup>42, 43</sup>. Dans le SNC, on constate que le taux de renouvellement du cholestérol varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre et qu'il atteint des valeurs extrêmes dans certains types de neurones larges et métaboliquement actifs <sup>41</sup>. Un bri de l'homéostasie du cholestérol aura donc des conséquences néfastes avant tout pour les neurones.

Or, la biosynthèse du cholestérol implique plus d'une vingtaine de réactions enzymatiques et est donc très coûteuse énergétiquement (Figure 2.1). De plus, la machinerie enzymatique nécessaire à la biosynthèse du cholestérol est localisée dans le corps cellulaire, très loin des synapses et des dendrites dans lesquels se produisent ces phénomènes de remodelage <sup>41</sup>. C'est pourquoi le neurone s'approvisionne en cholestérol préférentiellement par la voie de l'internalisation de lipoprotéines via les LDLR : la biosynthèse de cholestérol via l'HMGCR ne s'enclenche que lorsque l'apport de cholestérol par la voie d'internalisation des lipoprotéines est insuffisant <sup>44</sup>. Ce constat a été clairement démontré dans des modèles cellulaires *in vitro* où on peut observer une inhibition de l'activité intracellulaire de l'HMGCR chez les cellules cultivées dans un milieu contenant un excès de lipoprotéines riches en cholestérol <sup>45</sup>. Cette constatation a également été établie *in vivo* dans le système nerveux périphérique et SNC durant la phase aiguë de régénération suivant une lésion expérimentale du système nerveux <sup>46-49</sup>.

Malgré le caractère essentiel que revêt les lipoprotéines pour le SNC, de nombreuses études ont démontré que celles produites massivement par le foie n'atteignent pas le SNC<sup>50-52</sup>. Par exemple, une greffe hépatique en provenance d'un donneur dont le phénotype d'apolipoprotéine E (APOE) est différent de celui du receveur engendrera la présence de lipoprotéines avec le nouveau phénotype partout dans le corps sauf au SNC<sup>52</sup>. Les lipoprotéines présentes dans le SNC sont donc produites localement et principalement par les astrocytes et la microglie<sup>44</sup>. Mentionnons que l'homéostasie du cholestérol cérébral diffère considérablement de celle observée en périphérie. D'abord, les lipoprotéines présentes au SNC sont toutes semblables aux lipoprotéines de haute densité (HDL) : les APO de type B (APOB) que l'on retrouve sur les particules LDL ne sont ni exprimées, ni retrouvées dans le SNC<sup>53</sup>. De plus, l'APOA1 qui est présente sur les particules HDL retrouvées en périphérie n'est pas exprimée au SNC<sup>53</sup>. En fait, la seule APO fonctionnelle du SNC est l'APOE<sup>44</sup>. En effet, bien que d'autres APO comme l'APOJ (ou clusterine) soit exprimée par les cellules gliales et les neurones, elles ne jouent aucun rôle dans le transport extracellulaire de cholestérol et ne permettent pas la production d'une lipoprotéine<sup>54</sup>. Bien que chacune des étapes conduisant à la formation d'une lipoprotéine mature suivie de son internalisation demeure nébuleuse, le modèle actuellement reconnu d'homéostasie du cholestérol au SNC est le suivant (Figure 2.5)<sup>44, 55, 56</sup>.



**Figure 2.5 : Formation et internalisation des lipoprotéines au SNC.**

Les différents constituants de la lipoprotéine sont assemblés dans les cellules gliales (ici un astrocyte).

L'incorporation de cholestérol (provenant du recyclage de cellules dégénérées) à la lipoprotéine naissante est effectuée par les transporteurs ABCA1/ABCG1 (non dépeint sur le schéma). La particule est ensuite relâchée dans le milieu interstitiel. Ces lipoprotéines sont ensuite internalisées grâce à la liaison entre l'APOE et le LDLR présent à la surface du neurone. L'approvisionnement en cholestérol via la voie des LDLR entraîne une augmentation des niveaux intracellulaires de cholestérol, d'où une inhibition de la voie de biosynthèse du cholestérol par l'HMGCR. Rough ER = réticulum endoplasmique rugueux; PL = phospholipide; FC = cholestérol libre; CE = cholestérol estérifié; E = APOE. Image inspirée de <sup>55</sup>.

Bref, l'internalisation de lipoprotéines via la voie APOE-LDLR joue un rôle clé dans les processus de régénération et de synaptogénèse qui se produisent en tout temps au SNC. L'homéostasie du cholestérol cérébrale, qui se caractérise par un équilibre entre les processus de production, de recyclage, de mise en réserve et de dégradation du cholestérol, est essentielle pour préserver l'intégrité et l'activité des neurones. Sans surprise, l'altération de cette homéostasie est connue pour engendrer des maladies neurodégénératives sévères telles la maladie de Faber, Gaucher ou Niemann-Pick C <sup>57</sup>.

**2.2.2 Métabolisme du cholestérol et Maladie d'Alzheimer**

Abondant dans le même sens, plusieurs études suggèrent une dérégulation du métabolisme du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer (MA), l'une des formes de démences les plus prévalentes se caractérisant par la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) au cerveau (voir encadré 4 et Figures 2.6, 2.7 et 2.8).

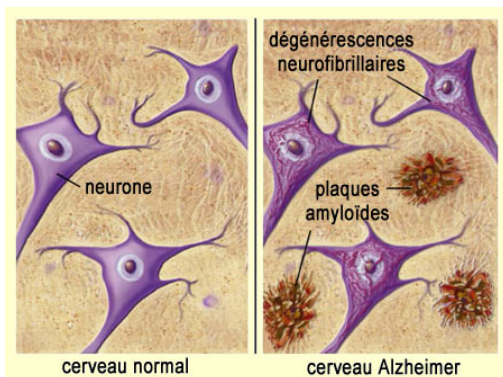


Figure 2.6 : Illustration des deux marqueurs pathologiques de la MA, les plaques séniles et les DNF. Image tirée de <sup>58</sup>.

Avant d'aborder ce sujet, mentionnons que deux formes de MA sont reconnues : la forme familiale et la forme sporadique responsable de respectivement 2 et 98% des cas à travers le monde <sup>59</sup>. La forme familiale peut être engendrée par une mutation dominante dans les gènes du précurseur de la protéine amyloïde (APP), de la préséniline 1 (PS1) ou de la préséniline 2 (PS2) situés respectivement sur les chromosomes 21, 14 et 1 <sup>60</sup>. Ces trois gènes sont impliqués dans la genèse des protéines bêta-amyloïde (A $\beta$ ), la composante principale des plaques séniles. En effet, alors que la protéine APP peut être clivée par l' $\alpha$ -sécrétase et ne générer aucun A $\beta$ , elle génère plusieurs types A $\beta$  lorsqu'elle est clivée par les sécrétases  $\beta$  et  $\gamma$  dont les sites actifs sont composés principalement de PS <sup>60, 61</sup>. Une mutation dominante au niveau de l'un de ses trois gènes est suffisante pour augmenter la production d'A $\beta$  de 50% et engendrer la MA <sup>62, 63</sup>. Plusieurs études tendent à démontrer que

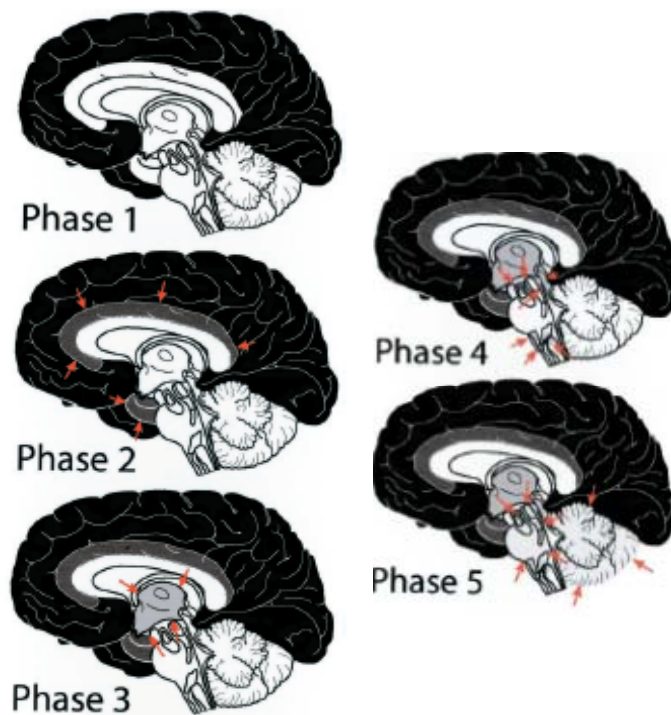
---

*Encadré 4 – Les marqueurs pathologiques de la MA : causes ou conséquences ?*

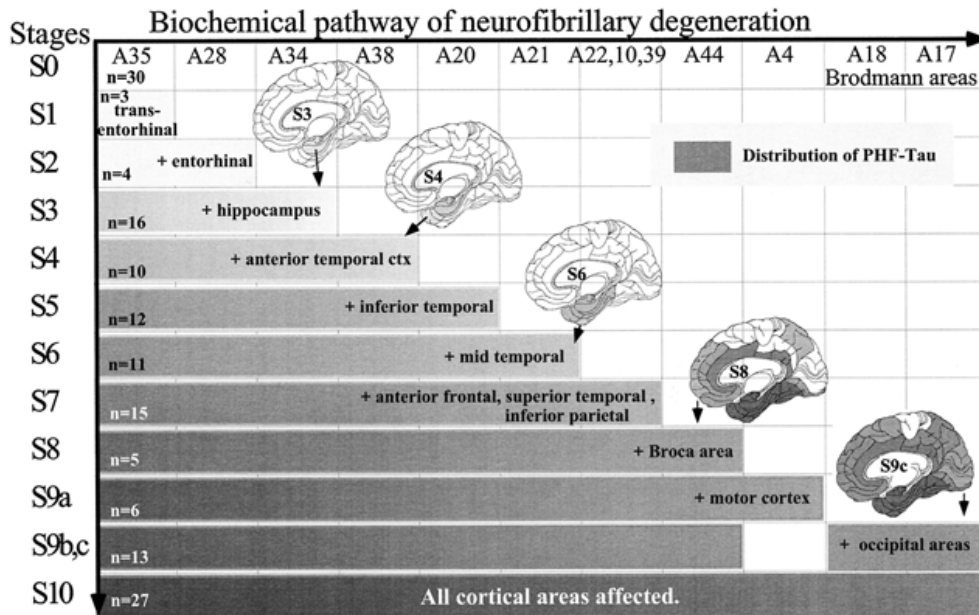
Le diagnostic définitif de MA requiert l'observation, à l'autopsie du cerveau, de deux marqueurs pathologiques bien précis : des plaques séniles, composées principalement de protéines de type A $\beta$ , et des DNF, résultant principalement de l'hyperphosphorylation et/ou de la troncature des protéines Tau qui stabilisent les microtubules. Bien que ces deux marqueurs pathologiques ne soient pas unique à la MA, leur densité et leur patron d'accumulation dans le cerveau permettent de caractériser la MA et le degré de sévérité de cette dernière <sup>1, 2</sup> (Figures 2.7 et 2.8). Alors que les DNF sont responsables de près de 85% de la perte neuronale observée dans les cerveaux atteints de MA <sup>8</sup>, la neurotoxicité associée aux plaques séniles et à l'A $\beta$  n'a toujours pas été clairement démontrée, surtout pour la forme A $\beta$ 40 qui semble essentielle à la viabilité neuronale et au fonctionnement synaptique <sup>10-13</sup>. Quoi qu'il en soit, la présence de plaques séniles dans tous les cerveaux de gens décédés de la MA a conduit à l'hypothèse de la cascade amyloïde <sup>14</sup> qui stipule que ces dépôts seraient responsables du développement des DNF <sup>15, 16</sup> et de la mort neuronale qui s'en suit. Le fait que ces deux marqueurs pathologiques peuvent exister indépendamment l'un de l'autre <sup>17</sup> et que leur distribution spatiotemporelle ne corrèle pas <sup>18</sup> explique pourquoi de nombreux scientifiques n'adhèrent pas à cette théorie. Bien que le rôle des plaques séniles ou de l'A $\beta$  dans le développement des DNF demeure obscure, ces deux entités pourraient agir de façon synergique dans la MA puisque les DNF requiert la présence de plaques séniles pour passer du stade S3 à S10 <sup>19</sup> (figure 2.8).

---

l'A $\beta$  est l'agent responsable du développement de la MA, notamment le fait que pratiquement tous les patients atteints du syndrome de Down, donc possédant une 3<sup>e</sup> copie du chromosome 21, développent la MA <sup>64</sup>. Toutefois, plusieurs autres études tendent à démontrer que l'A $\beta$  serait la conséquence d'une dysfonction cellulaire plutôt qu'une cause, notamment le fait que les niveaux d'A $\beta$  augmentent suite à un stress tel un trauma crânien <sup>65</sup> et que des gens cognitivement normaux ont des niveaux très élevés d'A $\beta$  et de plaques séniles <sup>66</sup> (voir encadré 4). Quoi qu'il en soit, le métabolisme de l'A $\beta$  demeure central dans l'étude de la MA de forme familiale.



**Figure 2.7 : Les cinq phases d'accumulation de l'A $\beta$  dans la MA.** Dans l'ordre, les régions affectées du cerveau sont : **phase 1**, les hémisphères cérébraux (dépeints en noir); **phase 2**, les régions allocorticales telles le cortex entorhinal, la région Cornus Ammonis 1 (CA1) de l'hippocampe, le cortex insulaire, l'amygdale, le gyrus cingulaire et les régions pré-subiculaires; **phase 3**, le striatum (non dépeint, comprenant le noyau caudé et putamen) et les noyaux diencéphaliques tels les noyaux du prosencéphale basal, le thalamus et l'hypothalamus; **phase 4**, certains noyaux du tronc cérébral tels la substance noire, le noyau rouge et la substance grise périaqueducale; et **phase 5**, le cervelet et d'autres noyaux du tronc cérébral tels les noyaux pontiques, le locus coeruleus et les noyaux du raphé <sup>67</sup>.



**Figure 2.8 : L'accumulation des DNF dans la MA.** Les régions du cerveau affectées à chaque étape d'accumulation des DNF sont dépeintes. Stade 0 (S0), aucune; S1, cortex transentorhinal (aire de Brodmann (BA) 35); S2, cortex entorhinal (BA 28); S3, hippocampe; S4, cortex temporal antérieur (BA 38); S5, cortex temporal inférieur (BA 20); S6, cortex temporal moyen (BA 21); S7, aires associatives polymodales, soit le cortex frontal antérieur (BA 10), le cortex temporal supérieur (BA 22) et le cortex pariétal inférieur (BA 39); S8, aires associatives unimodales telles l'aire de Broca (BA 40); S9, régions primaires telles les aires occipitales (BA 18 to 17) et le cortex moteur (BA 4) ou sensitif (BA 2, 3); et S10, toutes les aires corticales et plusieurs aires sous-corticales. Image tirée de <sup>68</sup>.

Pour sa part, aucune mutation dominante n'a, à ce jour, été identifiée pour expliquer le développement de la MA sporadique, la forme de MA étudiée dans cette thèse. De plus, le développement de la MA sporadique ne semble pas résulter d'une augmentation de la production d'A $\beta$ . Pour être compatible avec la théorie de l'A $\beta$  en tant qu'agent causatif, la MA de type sporadique serait plutôt associé à une diminution de la capacité du cerveau à l'éliminer <sup>69</sup>. Le patrimoine génétique associé à la MA de forme sporadique est donc beaucoup plus complexe que celui associé à la forme familiale et semble influencé par des facteurs environnementaux <sup>70</sup>.



L'homéostasie du cholestérol est fortement susceptible de jouer un rôle clé dans le développement de la MA, autant dans la forme familiale que sporadique. Dans un premier temps, plusieurs études ont démontrées la diminution des niveaux de cholestérol dans plusieurs régions du cerveau <sup>1, 71-73</sup>, une augmentation des évènements de démyélinisation qui résultent d'une altération lipidique plutôt que d'une anomalie au niveau de la structure de la myéline <sup>74</sup> et une diminution de l'épaisseur et du contenu en cholestérol des membranes dans plusieurs régions du cerveau <sup>75</sup>. Dans un deuxième temps, le cholestérol pourrait jouer un rôle clé dans le développement de la MA puisqu'il est susceptible, entre autre chose, de moduler la formation de plaques séniles et d'A $\beta$ . D'abord, des fortes concentrations intracellulaires de cholestérol sont associées à une augmentation de la production d'A $\beta$  <sup>76, 77</sup> alors que de faibles concentrations intracellulaires de cholestérol favorisent plutôt le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase <sup>78, 79</sup>. Ensuite, le clivage de l'APP par les  $\beta$ -sécrétases est dépendante des radeaux lipidiques <sup>61, 80</sup> et l'action des  $\gamma$ -sécrétases se déroule dans les membranes cellulaires <sup>81</sup>. De plus, tous les constituants des sécrétases sont des protéines intégrales membranaires et un transport anormal de cholestérol affecte leurs distributions sub-cellulaires <sup>82</sup>. Enfin, les lipoprotéines pourraient agir à titre d'éboueurs d'A $\beta$  solubles <sup>83, 84</sup> puisqu'elles les lient avidement *in vitro* <sup>85, 86</sup>. Les lipoprotéines contenant des A $\beta$  pourraient ensuite être internalisées et dégradées dans les lysosomes <sup>87, 88</sup>, empêchant ainsi l'agrégation et le dépôt d'A $\beta$  sous forme de plaques séniles.

À cet effet, mentionnons que l'APOE, la seule APO fonctionnelle du SNC et donc la pierre angulaire du métabolisme des lipoprotéines au SNC, est encodée sur le chromosome 19 et existe chez l'humain sous trois isoformes, soit  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ , qui varient selon les acides aminés localisés aux positions 112 et 158 de la protéine (Table 2.1) <sup>56</sup>. L'APOE3 est l'isoforme la plus communément répandue puisque 77% de la population en sont porteur, comparativement à seulement 15% et 8% pour les isoformes APOE4 et APOE2, respectivement <sup>89, 90</sup>. Ces trois isoformes diffèrent également à plusieurs autres niveaux (Table 2.1) (pour un résumé, consulter <sup>56</sup>). D'abord, alors que l'APOE3 et l'APOE4 se lient efficacement au LDLR, il en va tout autrement de l'APOE2 (Table 2.1) <sup>91, 92</sup>. Par conséquent, la présence d'une double dose d'APOE2 (i.e. présence sur les deux chromosomes 19) est

associée à la dyslipidémie de type III, une maladie se caractérisant par des niveaux plasmatiques élevés de cholestérol et de triglycérides<sup>93, 94</sup>. Ensuite, l'APOE2 et l'APOE3 se lient préférentiellement aux lipoprotéines de type HDL, alors que l'APOE4 préfère les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les LDL (Table 2.1)<sup>95-98</sup>. De plus, la stabilité<sup>99-101</sup> et les niveaux<sup>102-105</sup> de la protéine APOE décroissent en fonction du type d'isoforme présent : E2>E3>>E4. Enfin, mentionnons que la capacité à lier l'Aβ décroît en fonction du type d'isoforme présent : E2>E3>E4<sup>106</sup>.

**Table 2.1 : Caractéristiques distinctives entre les trois principales isoformes de l'APOE chez l'humain.**

Description	E2	E3	E4
Séquence primaire	C112 / C158	C112 / R158	R112 / R158
Fixation au LDLR	< 2% de l'activité de E3	Élevée	Élevée
Liaison des lipoprotéines	HDL	HDL	VLDL/LDL
Stabilité protéique	+++	++	+
Niveaux dans le plasma et SNC	+++	++	+
Avidité à lier l'Aβ	+++	++	+

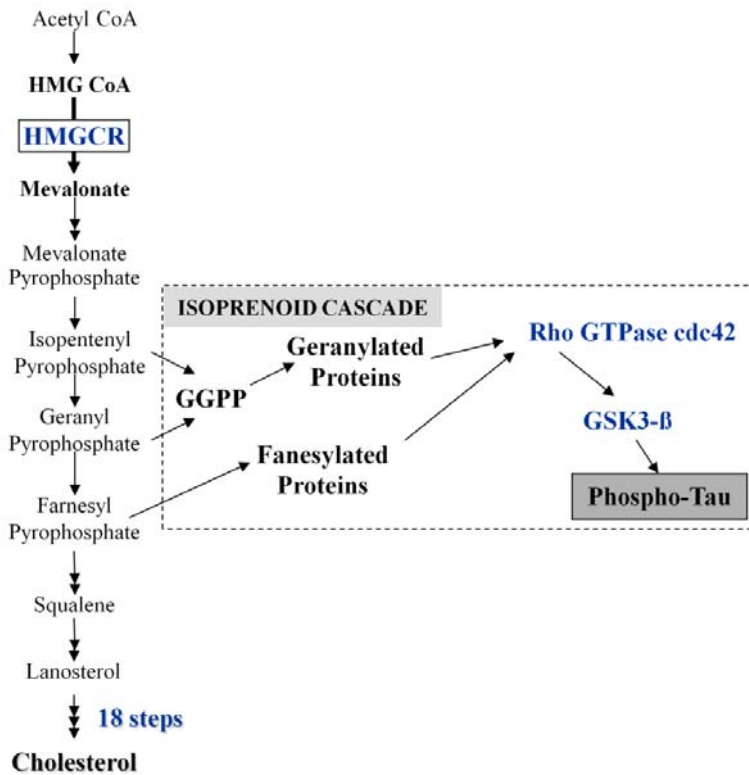
**Abréviations :** APOE = apolipoprotéine E; E2/E3/E4 = isoforme ε2/ε3/ε4; C = cystéine; R = arginine; LDLR = récepteur de lipoprotéines de faible densité; HDL = lipoprotéine de haute densité; VLDL = lipoprotéines de très faible densité.

Étant donné l'importance que revêt l'APOE dans l'homéostasie du cholestérol cérébral, il n'est donc pas surprenant de constater que l'*APOE4*, qui est associé aux niveaux les plus faibles de lipoprotéines et à la capacité la plus faible à lier l'Aβ, constitue le facteur de risque génétique le plus important jamais découvert pour la MA<sup>85, 89</sup>. L'*APOE4* augmente les risques de MA d'un facteur de 3 à 12<sup>107</sup>, précipite le début de la maladie de 10 à 20 ans<sup>108</sup>, augmente les niveaux pathologiques de Aβ, de plaques séniles et de DNF<sup>83, 109</sup> et précipite la conversion des déficits cognitifs légers (DCL) vers la MA<sup>110</sup>. Pour sa part, l'*APOE2* constitue

le facteur génétique de protection le plus important contre la MA, permettant de réduire de moitié le risque de développement de cette maladie <sup>111</sup>.

On s'est intéressé à l'HMGCR dans le contexte de la MA puisqu'il constitue l'autre joueur clé de l'homéostasie du cholestérol cérébral. De plus, plusieurs études suggèrent indirectement que l'HMGCR pourrait être dérégulée dans la MA. D'abord, des analyses génomiques de sujet affectés par la MA à début tardif ont révélé la présence de « points chauds » à travers le génome, dont l'un à proximité du chromosome 5 <sup>112, 113</sup>. D'autres études ont d'ailleurs démontré la présence d'associations génétiques entre certains polymorphismes de l'*HMGCR* et la MA <sup>114, 115</sup>. Ensuite, plusieurs études rétrospectives ont démontré que l'administration de statines, des inhibiteurs de l'HMGCR (voir section 2.3), permet de réduire de près de 70% le risque de MA <sup>116-119</sup>. Les études prospectives qui ont suivies ont cependant généré des résultats mitigés puisqu'elles ont démontré l'absence d'amélioration ou de stabilisation de la maladie chez des patients atteints de la MA au stade modéré-sévère et traités par statines depuis au moins 6 mois <sup>120, 121</sup>. Cet état de fait suggère que pour que la statine puisse exercer son rôle bénéfique, elle doit être prise durant une période critique et ce, probablement plusieurs années avant le développement de tous symptômes cognitifs.

Enfin, d'autres études ont démontré que la prise régulière de statines sur plusieurs années était associée à une réduction de la pathologie neurofibrillaire <sup>122, 123</sup>. Or, tel que mentionné précédemment à la section 2.1, la voie de biosynthèse du cholestérol commandée par l'HMGCR conduit également à la formation d'isoprénoïdes. Ces derniers sont essentiels à l'activité des protéines Rho et GSK3 qui phosphoryle plusieurs protéines, notamment la protéine Tau (Figure 2.9) <sup>124-127</sup>, la composante clé des DNF. De cette façon, un dérèglement de la voie du cholestérol pourrait engendrer une surproduction des protéines dérivées des isoprénoïdes et contribuer à l'hyperphosphorylation des protéines Tau. Appuyant cette notion, une étude d'hybridation *in situ* suggère une augmentation de l'activité de la GSK3 dans la MA puisque des particules actives de GSK3 s'accumulent dans le cytoplasme des neurones au stade pré-DNF <sup>128</sup>.



**Figure 2.9 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du cholestérol et des isoprénoïdes conduisant à la phosphorylation des protéines Tau.** GGPP, géranylgéranyl diphosphate. Schéma inspiré de <sup>129</sup>.

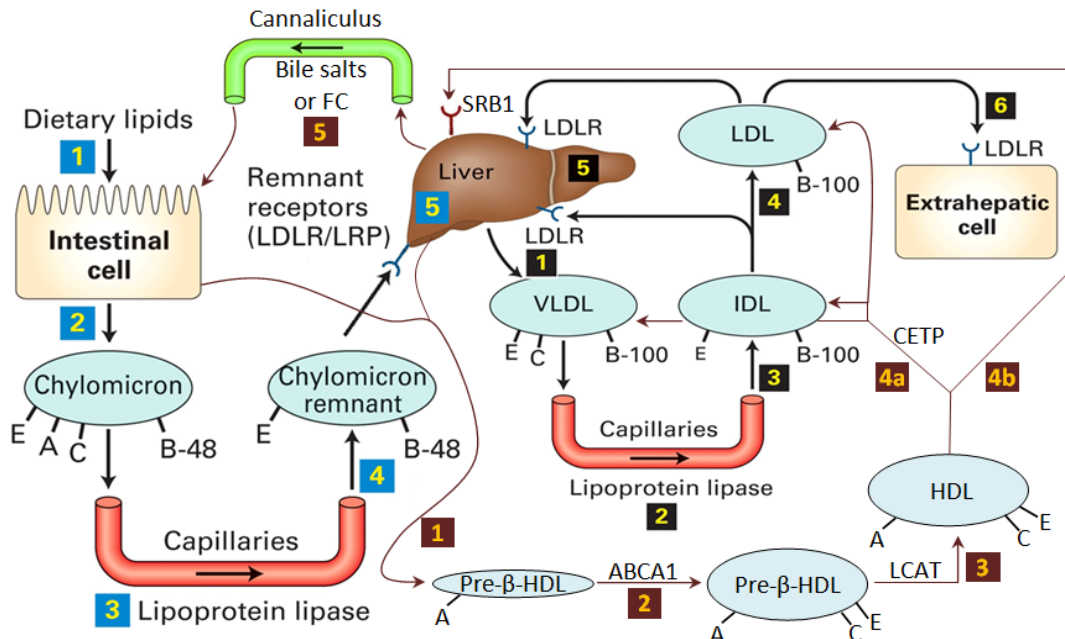
## 2.3 Système périphérique, métabolisme du cholestérol et hypercholestérolémie familiale

### 2.3.1 Métabolisme du cholestérol dans le système périphérique et son traitement par statines

L'HMGCR revêt également une importance primordiale pour le système périphérique (nous entendons ici toutes les cellules et organes hors du SNC). À la différence des neurones et des astrocytes du SNC mature, les cellules périphériques (particulièrement les hépatocytes) utilisent abondamment la voie de biosynthèse du cholestérol. En effet, chez les individus consommant un régime typiquement occidental, c'est-à-dire dont 70% de l'énergie consommée provient des produits laitiers, raffinés et des céréales <sup>130</sup>, on observe qu'approximativement 1200 mg de cholestérol sont excrétés quotidiennement dans les selles <sup>131</sup>. De ce nombre, environ le tiers provient des lipides alimentaires, alors que les deux tiers restant proviennent du surplus généré par la synthèse endogène <sup>131</sup>.

De façon similaire à l'astrocyte dans le cerveau, le foie représente le producteur par excellence des molécules de cholestérol du système périphérique. À la différence du SNC, l'homéostasie du cholestérol en périphérie est très bien connue et plusieurs joueurs sont impliqués (Figure 2.10). De ce schéma complexe, nous retiendrons que les lipides alimentaires sont absorbés par les entérocytes et acheminés au foie par le biais de lipoprotéines de type chylomicron, très riches en triglycérides (TG, 90%). Ensuite, le foie produit et achemine le cholestérol à toutes les cellules périphériques par le biais de lipoprotéines de type LDL, très riches en cholestérol (55%). Ces lipoprotéines sont internalisées par les cellules périphériques via la voie des LDLR par la liaison APOB/LDLR. Les cellules périphériques retournent enfin l'excédent de cholestérol au foie par le biais de lipoprotéines de type HDL, très riches en protéines (50%). Puisque ces particules transportent le cholestérol vers un site d'élimination en vue de prévenir son accumulation tissulaire, on dit des HDL qu'elles transportent le « bon cholestérol » (et inversement, des LDL qu'elles transportent le « mauvais »). Une fois au foie, le devenir de cet excédent de cholestérol varie : il peut être éliminé dans les selles ou dans la bile, mis en réserve sous forme d'esters de cholestérol ou réutilisé pour la synthèse de nouvelles lipoprotéines<sup>132-134</sup>. L'homéostasie du cholestérol dans le système périphérique est donc fort complexe et est sujette aux déséquilibres. La présence de concentrations anormales de l'une ou plusieurs des fractions lipidiques dans le sang ou, moins communément, d'une concentration faible d'une lipoprotéine (e.g. l'hypoalphalipoprotéïnémie), porte le nom général de dyslipidémies. La présence d'une dyslipidémie est évaluée par la détermination du bilan lipidique dans lequel les concentrations de cholestérol et de TG du sang sont mesurées : le cholestérol total (TC), les TG et le cholestérol lié aux HDL (HDL-C) sont mesurés directement par des méthodes enzymatiques alors que la concentration de cholestérol lié aux LDL (LDL-C) est calculée à l'aide de l'équation de Friedewald<sup>132, 135</sup> :

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \frac{[(\text{HDL-C} + \text{TG})]}{2,2}$$



**Figure 2.10 : Homéostasie du cholestérol dans le système périphérique.**

L'homéostasie s'articule autour de trois systèmes de transport. A) Voie exogène (carrés bleus): (1) Les lipides alimentaires sont absorbés par la muqueuse apicale des cellules intestinales et complexés en chylomicrons. (2) Ceux-ci sont relâchés dans le système lymphatique. (3) Ils entrent ensuite dans le système périphérique où ils interagissent avec la lipoprotéine lipase : cette protéine hydrolyse les TG en AGL qui sont absorbés par les tissus. (4) Au fur et à mesure que le chylomicron perd ses TG, il devient un chylomicron restant (chylomicron remnant). (5) Ces derniers sont absorbés par le foie via la liaison APOB/E et LDLR. B) Voie endogène (carrés noirs) : (1) Le foie synthétise des VLDL. (2) Dans le système périphérique, les VLDL sont soumises à l'action de la lipoprotéine lipase et de la LCAT qui transforme le cholestérol en esters de cholestérol. (3-4) Au cours de la digestion par ces deux enzymes, on obtient les IDL puis les LDL. Les LDL seront captées par (5) le foie ou (6) les cellules périphériques via la liaison APOB et LDLR. C) Voie de transport inverse (carrés bourgognes) : (1) Les cellules intestinales et hépatiques sécrètent des HDL de forme discoïdale contenant peu de lipides (pre-β-HDL). (2) Ceux-ci arrivent au niveau de la membrane cellulaire des cellules périphériques et y captent du cholestérol. (3) Sous l'action de la LCAT, le cholestérol se transfère peu à peu vers la partie centrale des HDL et acquiert une forme plus arrondie. Le cholestérol des HDL peut alors retourner au foie via 2 voies différentes. (4a) À l'aide de la CETP, les esters de cholestérol peuvent être transférés aux autres lipoprotéines et être retournés au foie via la liaison APOB/E et LDLR. (4b) Les HDL peuvent également être directement captés par le foie via les récepteurs SRB1. (5) Le cholestérol dans le foie peut alors être utilisé ou excrété hors du corps dans la bile sous forme inchangée ou sous forme de sels biliaires. AGL, acide gras libre; CETP = cholesteryl ester transfert protein; LCAT = lecithin:cholesterol acyltransferase; LRP, LDLR related protein 1 (membre de la famille des LDLR); TG, triglycérides.

Les médicaments les plus prescrits pour lutter contre l'hypercholestérolémie, une dyslipidémie où l'anomalie biochimique principale est une concentration anormalement élevée de cholestérol sanguin, sont les statines. Ces molécules bloquent efficacement l'activité de l'HMGCR (voir encadré 5) en se liant au site de fixation du substrat, l'HMG-Coa<sup>136</sup>. Le fait de bloquer la synthèse de cholestérol force la cellule à s'approvisionner via l'internalisation de lipoprotéines de type LDL, réduisant du même coup les niveaux circulants de TC et de LDL-C. Or, on observe une grande variabilité dans la réponse des patients à ce traitement : certains répondent bien alors que d'autres semblent résistants<sup>137</sup>.

Plusieurs paramètres ont été invoqués pour expliquer cette variabilité de réponse au traitement de statine, notamment l'âge, le fait d'être fumeur, la masse corporelle, la diète, le niveau d'activité physique et les variations génétiques individuelles<sup>137-142</sup>. Or, l'épissage alternatif de l'*HMGCR* pourrait également contribuer à expliquer une partie significative de cette variabilité de réponse. En effet, une étude a démontré que 6 à 15% de la variabilité de réponse au traitement de statine pourrait être due à l'épissage alternatif de l'*HMGCR*, contre seulement 2% pour le génotype<sup>32, 141</sup>. Cette étude fut réalisée chez des patients atteints d'hypercholestérolémie commune, c'est-à-dire où la concentration anormalement élevée en cholestérol est due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux indéfinis<sup>143</sup>. Une question s'est donc imposée : la variabilité de la réponse au traitement de statines est-elle expliquée dans les mêmes proportions par l'épissage alternatif et le génotype de

---

*Encadré 5 – Réponse moléculaire de l'HMGCR à l'inhibition par une statine.*

Les statines inhibent compétitivement l'activité de l'HMGCR à des concentrations aussi faibles que 10<sup>-8</sup>M. Dans des cellules en culture, il a été démontré que l'ajout de statines entraîne une augmentation des niveaux de la protéine HMGCR par un facteur de 200. Cette augmentation considérable des niveaux de protéines découle d'une stimulation des mécanismes de régulation de l'HMGCR à trois niveaux. Il y a d'abord une augmentation de la transcription du gène par un facteur de huit, suivie d'une augmentation de l'efficacité de translation des ARNm par un facteur de cinq et enfin, un ralentissement de la dégradation de la protéine d'un facteur de cinq. Cet état de fait a permis de mettre en lumière l'efficacité des mécanismes de régulation de l'HMGCR<sup>4,5</sup>.

---

l'*HMGCR* dans l'hypercholestérolémie familiale, une maladie autosomale dominante due à des mutations hétérogènes du gène du *LDLR* <sup>143</sup>?

### **2.3.2 L'hypercholestérolémie familiale et ses particularités**

Due à un effet fondateur, la prévalence de l'hypercholestérolémie familiale (HF) (voir encadré 6) au sein de la population de la province du Québec est le double de celle rencontrée dans le monde <sup>144</sup>. En effet, la population canadienne française du Québec est constituée des descendants des quelques milliers de colons qui ont émigré de la France au 17<sup>e</sup> siècle <sup>145</sup>. Cette population est donc caractérisée par une hétérogénéité génétique réduite pour les maladies à hérédité mendélienne <sup>146</sup>, ce qui facilite les études de nature génétique <sup>147</sup>. Dans cette population, six mutations expliquent près de 85% des cas d'HF <sup>146, 148</sup>. La plus fréquente d'entre elles, la délétion de >15kb du promoteur et du premier exon du gène *LDLR*, est responsable d'environ 60% des cas d'HF chez les canadiens français <sup>146, 149</sup>. La forme hétérozygote est la plus répandue : l'allèle affecté par la délétion n'étant pas transcrit, chez ces porteurs, l'activité du LDLR fonctionne à 50% de sa capacité nominale <sup>3</sup>. Chez ces individus, les niveaux de cholestérol plasmiqes sont élevés depuis la naissance (d'un

facteur de 2) et l'insuffisance coronarienne se développe prématurément, entre 30 et 60 ans <sup>150</sup>. Étant donné leur haut niveau de cholestérol avant traitement, leur utilisation accrue de la voie

---

#### *Encadré 6 – Le diagnostic de l'HF*

Contrairement à la MA, le diagnostic de l'HF est avant tout clinique. Ce diagnostic repose sur les critères suivants <sup>3</sup>:

- 1) LDL-C >95<sup>e</sup> centile
- 2) Xanthomes tendineux, soit un dépôt de cholestérol aux tendons achilléens
- 3) En l'absence de xanthomes tendineux, on observe : a) LDL-C élevé + xanthomes tendineux chez un parent au premier degré ; b) LDL-C > 95<sup>e</sup> centile chez un enfant de moins de 10 ans ; c) absence de causes secondaires expliquant l'hypercholestérolémie

OU

- 4) Présence de mutation dans un gène causant l'HF.
-



de biosynthèse du cholestérol et leur homogénéité génétique, on s'est demandé si l'épissage alternatif et le polymorphisme rs3846662 de l'*HMGCR* pouvaient jouer un rôle dans la variabilité de réponse au traitement de statines encore plus important chez les individus souffrant d'HF que chez les individus normaux souffrant d'hypercholestérolémie commune.

## **2.4 Hypothèse générale**

Ainsi, le but de cette thèse est de confirmer l'hypothèse générale suivante :

L'allèle A au locus rs3846662 favorise l'épissage alternatif de l'exon 13 et conduit à la formation de monomère d'HMGCR ne possédant pas d'activité catalytique, engendrant une protéine tétramérique d'HMGCR d'activité moindre. Puisque toute cellule s'approvisionne en cholestérol en utilisant la synthèse endogène et l'internalisation de lipoprotéines via les LDLR, les porteurs de l'allèle A, qui posséderont vraisemblablement une protéine HMGCR moins active, favoriseront l'internalisation des lipoprotéines comme source préférentielle de cholestérol. Dans le cerveau, ceci empêchera la suractivation de la voie de biosynthèse du cholestérol/isoprénoïde, réduisant le risque de développement de la MA/DCL et de sa pathologie (surtout neurofibrillaire). Dans le système périphérique, ceci favorisera une baisse des niveaux circulants basaux (i.e. avant traitement avec un hypolipidémiant) de LDL-C, mais une moins bonne réponse au traitement par statines.

## **Chapitre 3 - Méthodologie**

---

Puisque la méthodologie employée pour générer chacun des résultats mentionnés dans cette thèse est décrite dans les articles inclus au chapitre 4, veuillez vous référer à cette section pour de plus amples détails.

# Chapitre 4 - Résultats

---

## **4.1 Normalization of gene expression using SYBR Green qPCR: A Case for Paraoxonase 1 and 2**

### **4.1.1 Avant-propos**

L'un des paramètres clés mesurés à de nombreuses reprises durant ce projet doctoral concerne les niveaux d'ARNm. Or, l'ARNm mesuré représente la somme des variations dues à une maladie mais également, à des facteurs confondants, comme la qualité, la quantité, la pureté et l'intégrité de l'ARN utilisé<sup>151</sup>. Pour éliminer ces facteurs confondants du résultat, on peut normaliser les niveaux d'ARNm de notre gène d'intérêt par un gène de référence dont l'expression n'est pas influencée par la maladie. Il va sans dire que le gène de référence utilisé ne sera pas employable dans toutes les circonstances et dans toutes les maladies<sup>152, 153</sup>. Dans le cas particulier de la MA et des cerveaux humains utilisés dans nos études, il est important de mentionner que les dernières semaines de vie sont très variables d'un individu à l'autre (appelé communément l'état d'agonie). De plus, dépendamment de la région du Québec où décède le sujet, l'intervalle de temps post-mortem avant congélation du cerveau peu influencer grandement sur la stabilité et l'intégrité de l'ARN. On doit donc valider la stabilité du gène de référence choisi dans le contexte qui est étudié. Pour nous aider dans cette tâche, trois algorithmes mathématiques ont été créés : Normfinder<sup>154</sup>, Bestkeeper<sup>155</sup> et geNorm<sup>156</sup>. Or, en 2011, l'existence de gènes de référence robustement stables malgré la présence de la MA n'avait pas encore été décrite. De plus, aucune étude n'avait encore comparé la concordance des différents algorithmes mathématiques entre eux. C'est précisément ces lacunes que l'article suivant cherche à combler.

### **4.1.2 Authors, Abstract, keywords and abbreviations**

**Authors:** Valérie Leduc<sup>1,2</sup>, Véronique Legault<sup>1,2,3</sup>, Doris Dea<sup>1</sup>, Judes Poirier<sup>1,2,4§</sup>

<sup>1</sup> Douglas Mental Health University Institute, Verdun, QC H4H1R3, Canada

<sup>2</sup> McGill University, Montreal, QC H3A2B4, Canada

<sup>3</sup> CHUM Research Centre, Montreal, QC H2L2W5, Canada

<sup>4</sup> McGill Centre for Studies in Aging, Verdun, QC H4H1R3, Canada

**Abbreviations:** AD, Alzheimer's disease; Cq, quantification cycle; ERG, endogenous reference gene; HDL, high-density lipoprotein; HKG, housekeeping gene; LDL, low-density lipoprotein; PON, paraoxonase; qPCR, quantitative PCR; RIN, RNA integrity number; T<sub>m</sub>, melting temperature.

**Abstract:** Validating the expression stability of reference genes is crucial for reliable normalization of real-time quantitative PCR (qPCR) data, but relatively few studies have investigated this issue in brain human tissues. The present study thus aimed at identifying in human post-mortem brain tissues a set of suitable endogenous reference genes (ERG) for the expression analysis of potential candidate genes associated with Alzheimer's disease (AD). The mRNA levels of ten common ERGs (*ACTB*, *GAPDH*, *GPS1*, *GUSB*, *M-RIP*, *PGK1*, *POL2RF*, *PPIA*, *UBE2D2*, and *YES1*) were determined in the frontal cortex of autopsy-confirmed AD and non-demented control cases (n=20) using SYBR Green technology. Then, these levels were ranked according to their expression stability using three software applications: geNorm, NormFinder and BestKeeper. Whereas *PPIA* and *UBE2D2* were among the ERGs with the most reliable expression, *ACTB* was the worst. Subsequently, using *PPIA* and *UBE2D2* as ERGs for normalization, the mRNA levels of paraoxonase 1 (*PON1*) and paraoxonase 2 (*PON2*) were quantified in the frontal cortex of AD and control cases (n=80) and analyzed using the REST 2009 program. Our results indicate that both paraoxonases are expressed in the human frontal cortex and that *PON2* but not *PON1* mRNA levels are up-regulated in AD relative to non-demented controls. However, re-analysis of the results by ANCOVA indicated that the significance of the difference between AD and control groups depended upon the ERG used for normalization. The use of a computational method allowing the inclusion of possible confounding factors is thus recommended for the analysis of data.

**Key words:** qPCR; reference gene; normalization; paraoxonase 1; paraoxonase 2; Alzheimer's disease

### **4.1.3 Introduction**

Comparing the transcription profiles of Alzheimer's disease (AD) patients with those of non-demented controls constitutes one of several ways to identify new markers implicated in the

disease process. To this end, real-time quantitative PCR (qPCR) is one of the most sensible, accurate and reliable methods to quantify gene expressed within tissues affected by a disease. However, given the high sensitivity of the qPCR technique, the measured gene expression represents the sum of the disease-driven biological variation and several confounding factors<sup>151</sup>. Such factors include the quantity, quality, integrity and purity of the starting RNA material as well as the enzymatic efficiencies of the reverse transcriptase and polymerase that catalyzes the PCR<sup>151</sup>. To remove these non-specific variations, the measured mRNA levels can be normalized against an endogenous reference gene (ERG) whose expression is not affected by the disease. Housekeeping genes (HKGs) are the preferred ERGs because all cell and tissue types often express them. Yet, HKG do not necessarily have a constant expression under a given disease, pre-mortem status, treatment condition<sup>152, 153</sup> or post-mortem delays in the context of human studies. It is thus crucial to validate that the expression of the selected ERG/HKG is stably expressed in the experimental system under study, and several freely available software applications, such as geNorm<sup>156</sup>, BestKeeper<sup>155</sup>, and NormFinder<sup>154</sup>, have been developed to address this issue reviewed in<sup>151, 154-156</sup>.

Despite greater awareness regarding the importance of properly selecting the normalizing gene, most published expression studies do not provide the rationale or the criteria that guided their ERG selection. To our knowledge, only three published papers investigated the expression stability of common ERG to normalize the qPCR expression of genes involved in AD<sup>157-159</sup>. Among these reports, only one was performed with the SYBR Green chemistry<sup>157</sup>, and none compared the expression stability of their selected ERGs with different mathematical algorithms, as it has been performed in other biological contexts<sup>160</sup>. Therefore, the first purpose of the present work was to identify a robust set of ERGs for mRNA profiling in AD frontal cortex tissue. For this purpose, ten carefully selected HKG were quantified using SYBR Green real-time qPCR and their expression stabilities were evaluated using the three algorithms geNorm, BestKeeper and NormFinder.

Next, we used the most reliable ERGs for the expression analysis of two potential AD-related genes in human post-mortem brain tissues: paraoxonase 1 (*PONI*) and paraoxonase 2 (*PON2*). These two genes were selected because mounting evidence points to increased oxidative

stress<sup>161</sup> and disruption of cholesterol homeostasis<sup>129</sup> as being crucial events implicated in AD etiopathology. Notably, a genetic-driven amino acid substitution within PON1, a high-density lipoprotein (HDL)-associated antioxidant enzyme that functions to prevent the oxidation of lipoproteins and preserve their function<sup>162</sup>, was recently shown to highly correlate with AD pathological markers, including beta-amyloid levels, senile plaque accumulation and choline acetyltransferase activity<sup>163</sup>. Furthermore, PON2, its intracellular, membrane-bound counterpart, has been shown to reduce intracellular levels of oxidative stress and to prevent cell-mediated oxidation of low-density lipoproteins (LDLs)<sup>164</sup>, which may be favourable against AD. Indeed, HDLs and LDLs are the two major cholesterol transporters in humans, and preventing their oxidation is essential to maintain cholesterol homeostasis<sup>129</sup>. The Swedish Human Protein Atlas program has identified PON1 and PON2 protein expression in the human brain. In contrast, Mackness and colleagues recently reported that only *PON2* mRNA was expressed in the human brain<sup>165</sup>, a surprising finding suggesting that PON1 is delivered to the brain by peripheral HDLs. Using the most stably expressed ERGs identified in our study to normalize the real-time qPCR data, the second purpose of this work was to verify whether or not *PON1* mRNA is found in the human brain, and if *PON1* and *PON2* mRNA expression varies in AD relative to control subjects.

#### **4.1.4 Materials and methods**

##### **4.1.4.1 Subjects**

This gene expression study used a cohort of 48 autopsy-confirmed AD cases and 32 non-demented controls from the same homogenous population isolate (Douglas Hospital Brain Bank, Quebec, Canada) (Table 4.1.1). Cases were randomly selected from a pool of over 1000 donors to meet the following criteria: 1) availability of the tissue, 2) autopsy-confirmed diagnosis of either no discernable neuropathology (control) or AD and 3), approximately equal number of male and female. More specifically, AD cases had to fulfill the NINCDS-ADRDA criteria for definite AD<sup>166, 167</sup> and be representative of the population. Thus, AD cases with Lewy body inclusions and/or a vascular component were not excluded from the study. The level of pathology among our AD cases was as follow: pre-AD and mild, 9%; mild-to-moderate and moderate, 11%; moderate-to-severe and severe, 48%; end-stage, 32%. Controls case were derived from persons who, on medical record review and/or neuropsychological examination and caregiver interview, evidenced no memory problems, neurological or neuropsychiatric diseases, and did not show

evidence of any discernable neuropathology despite those related to normal aging (tangle and plaque indices reading  $<20/\text{mm}^3$  and  $<10/\text{mm}^2$ , respectively, in at least one hippocampal and isocortical section thoroughly screened for areas of maximal injuries). Most AD cases died of AD-related complications (i.e., bronchopneumonia, etc.), while most control cases died of cancer or cardiovascular problems. Stratifying according to disease status and gender, 20 randomly selected subjects from this cohort were used to determine the optimal ERGs for our assay (Table 4.1.1). This study is conformed to the Code of Ethics of the World Medical Association and was approved by the Ethics Board of the Douglas Hospital Research Center. All participants or his/her legal tutor signed an informed consent.

**Table 4.1.1: Demographic characteristics.**

	Validation ERG		Expression study	
	Control	AD	Control	AD
<b># subjects</b>	11	9	32	48
<b>Gender</b>				
<i>Male / Female</i>	6/5	6/3	19/13	23/25
<b>Age at death (y)</b>				
<i>Mean</i>	69.6	80.8	69.5	79.2
<i>Min-Max</i>	48 – 86	66 – 94	41 – 94	66 – 96
<b>PMD (h)</b>				
<i>Mean</i>	21.9	26.8	24.1	20.4
<i>Min-Max</i>	6 – 52	12 – 73	5 – 76	5 – 75

Abbreviations: AD, Alzheimer’s disease; ERG, endogenous reference gene; PMD, post-mortem delay; h, hour; y, year. Most AD cases died of AD-related complications (bronchopneumonia), and most control cases died of cancer or cardiovascular problems.

#### 4.1.4.2 RNA isolation and quality control

For each sample, total RNA was extracted from 100mg of frontal cortex using, as per manufacturer’s instructions, the QIAGEN RNeasy kit cat#74804 for lipid-rich tissue (homogenization by sonication). The purity and integrity of RNA was estimated using, respectively, the ratio of absorbance values at 260nm and 280nm and the RNA integrity number (RIN) recorded with an Agilent 2100 Bioanalyzer. While the  $A_{260}/A_{280}$  ratio was  $\geq 1.5$  for 96% of the samples, the RINs ranged from 3.3 to 8.5 and had the following distribution: 8% of samples had a RIN below 5; 41% between 5 and 6; 28% between 6 and 7; and 22% over 7. All Bioanalyzer electropherograms showed no DNA contamination and clear 28S and 18S peaks.

To generate cDNA, 2µg of total RNA was reverse-transcribed in the GeneAmp 5700 sequence detection system (PE Applied Biosystems) in the following 100µL reaction mixture: 1X RT buffer, 5.5mM MgCl<sub>2</sub>, 500µM dNTP, 2.5µM oligo dT, 0.4U/µL RNase inhibitor, 1.25U/µL Multiscribe reverse transcriptase. The reverse transcription programme included the following thermal conditions: 10min at 25°C, 30min at 48°C, followed by 5min at 95°C. “*No reverse transcriptase controls*”, in which no reverse transcriptase is added, were also performed on 10 randomly selected RNA samples (see section 2.3).

#### 4.1.4.3 Real-Time qPCR and quality control

Using sequences from GenBank database, specific primers for the two target genes (*PON1* and *PON2*) and the ten ERGs were designed over an exon-exon junction with Primer Express v2.0 (Applied Biosystems), except for *ACTB* and *GAPDH*, which were designed within the same exon (Table 4.1.2). These ten ERGs were selected from the literature based on at least one of the following criteria: *i*) prior use in AD-affected tissue or, cell line modelling AD (*GAPDH*, *POL2RF*, *M-RIP*)<sup>168</sup>; *ii*) extensive use in the literature (*ACTB*, *GAPDH*)<sup>169</sup>; *iii*) low to low-medium abundance levels of mRNA copies per cell (*UBE2D2*, *YES1*, *GUSB*)<sup>170</sup>; and *iv*) constant expression levels across normal human tissues (*YES1*, *GPS1*, *UBE2D2*, *POL2RF*, *PPIA*, *GUSB*, *PGK1*)<sup>170-172</sup> (Table 4.1.2). All primers were synthesized by Sheldon Biotechnologies (Montreal, Canada) and had a melting temperature (T<sub>m</sub>) around 64°C.

For each sample, SYBR Green real-time qPCR was conducted in triplicate in 96-well plates using a GeneAmp5700 sequence detection system (PE Applied Biosystems). The 35µL PCR reaction was prepared as follow: 17.5µL of 2X SYBR Green PCR master mix, 3.5µL of 10µM of appropriate forward and reverse primers, 7.5µL RNase-free water, and 3µL cDNA template. “*No template controls*”, in which no cDNA template is added, were also performed for each master mix prepared. The real-time qPCR programme was performed with melting curve dissociation protocol (from 60°C to 95°C) according to the following thermal conditions: 2min at 50°C, 10min at 95°C, followed by 40 cycles of 15sec at 95°C / 1min at 60°C.

Whereas no bands could be detected on agarose gels for the “*no template controls*” (indicating absence of master mix contamination) and the “*no reverse transcriptase controls*”



(indicating absence of DNA contamination), a single band of the expected molecular weight was observed for each of the twelve genes tested. Finally, the amplification efficiencies for each set of primers were evaluated by measuring the degree of amplification from a serially diluted cDNA template. The resulting standard curve contained five dilution points spanning three orders of magnitude. All PCR assays displayed efficiencies between 97 and 107% (Table 4.1.2).

#### **4.1.4.4 Programs used for gene expression analyses**

The expression stabilities of the ten ERGs were evaluated with the geNorm, BestKeeper and NormFinder programs<sup>154-156</sup>. The relative quantification of *PON1* and *PON2* was calculated using two strategies: 1) randomisation tests computed by the REST 2009 program<sup>173</sup> and 2), ANCOVAs using SPSS 16.0 and the logarithmic base 10-transformed relative ratios. Except for SPSS, all programs are freely available for academic use at (<http://www.gene-quantification.de/hkg.html>).

### **4.1.5 Results**

#### **4.1.5.1 Confirmation of primer sets specificity**

The specificities of each real-time qPCR assays were confirmed by gel electrophoresis and melting curve dissociation protocols since no nonspecific amplifications were detected in both procedures. Indeed, a single band of the expected molecular weight was observed on agarose gels (corresponding to the amplicon size, varying from 51pb to 295pb), and the dissociation curves showed a single peak (corresponding to the  $T_m$  of the amplicon, varying from 74 to 88°C).

**Table 4.1.2: Target and reference genes description.**

Official Symbol	Official full name (other name)	Gene ID	Abundance levels	Primers (5' → 3')	Efficacy	Correlation
PON1	Paraoxonase 1	5444	-	F-TTTCACCCGATGGCAAGTATG R-TCTTATGAGCCAGCAACTCAGC	100.61	0.9175
PON2	Paraoxonase 2	5445	LM	F-TGAGCTTCTTCCAAGTGTGAATG R-AAATGTGCCGGTCCAACAG	105.06	0.9992
UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D2	7322	L	F-CAAAAGTACTCTTGTCATCTGTTCTCT R-TCATCTGGATTGGGATCACACA	98.88	0.9918
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	5478	MH	F-TCCTGGCATCTTGTCATG R-CCATCCAACCACTCAGTCTTG	103.62	0.9942
YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 (c-yes)	7525	L	F-CCAGGTATGGTGAACCGTGAA R-CCTGTATCCTCGCTCCACTTGT	107.22	0.9984
POL2RF	Polymerase II polypeptide F (Polymerase II subunit 14.4kDa)	5435	M	F-GCCATGAAGGAACTCAAGGC R-AGGTAACGGCGAATGATGATG	102.89	0.9997
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	5230	M	F-TTTGGCACTGCTCACAGAGC R-TGGCAGATTGACTCCTACCATG	101.73	0.9990
MPRIP	Myosin phosphatase Rho interacting protein (Rho interacting protein 3)	23164	M	F-TTTACGAGCACGGCCTCTTG R-AGGGTCGTGGGCATCTCAT	104.22	0.9998
GUSB	Glucuronidase, beta	2990	LM	F-TCATTTGGAATTTTGCCGATT R-GCACTCTCGTCGGTACTGTT	105.11	0.9992
GPS1	G protein pathway suppressor 1	2873	M	F-CGTGCCCTCATCCAGTATTTTC R-TCCTATGCATGTCGGCTGAC	106.13	0.9969
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	H	F-CAAGGGCATCCTGGGCTAC R-TTGAAGTCAGAGGAGACCACCTG	106.56	1.000
ACTB	Actin, beta	60	H	F-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA R-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	96.55	0.9697

The abundance levels in copies per cell (L,  $\leq 5$ ; LM,  $> 5 \leq 10$ ; M,  $> 10 \leq 50$ ; MH,  $> 50 \leq 100$ ; H,  $> 100$ ) were extracted from <sup>170</sup> except for MPRIP, which is from <sup>168</sup>. Abbreviations: F, forward; R, reverse.

#### 4.1.5.2 Selection of the most appropriate ERG

An ideal ERG must have a constant expression across the sample set investigated<sup>154</sup>. To select the most appropriate ERG to normalize the transcription profiles of AD and control subjects, we compared the mRNA levels of ten candidate ERGs in 20 subjects from our cohort by using geNorm, BestKeeper and NormFinder software applications. While these three tools aim at identifying the optimal normalization gene among a set of candidates, they are based on different mathematical algorithms. Accordingly, the geNorm application ranks order the candidates according to their expression stability (noted M, Table 4.1.3), a measure which represents the average pairwise variation of a particular gene with all other candidates<sup>156</sup>. The BestKeeper application not only uses the pairwise comparison approach to evaluate the ERG expression stability (expressed as standard deviation SD, Table 4.1.3), but also combines the best suited ones into an index called the BestKeeper index<sup>155</sup>. Genes inter-related and similarly expressed across the sample set investigated will correlate highly with the BestKeeper index (see r values, Table 4.1.3)<sup>155</sup>. However, ranking genes according to the similarity of their expression profiles may be problematic if some of the candidates are co-regulated see reference<sup>154</sup> for details. Instead of selecting genes according to this criterion, the NormFinder application uses a model-based approach to top rank the candidates with minimal estimated intra- and intergroup variation (noted stability, Table 4.1.3)<sup>154</sup>.

As summarized in Table 4.1.3, all three tools ranked ACTB at the last position, suggesting it is an unsuitable reference gene in our cohort of human post-mortem brains. The best genes obtained from all software applications were *UBE2D2*, *PPIA* and *GPS1*. While we could have normalized the real-time qPCR data against the three most stable ERGs, the geNorm analysis showed that the inclusion of a third reference gene was not required ( $V_{2/3} = 0.080$ ; 0.15 being the cut-off value below which inclusion of an additional reference gene is not required)<sup>156</sup>. Consequently, we used *UBE2D2* and *PPIA* as the normalization genes for our expression study.

**Table 4.1.3: Rank order of the ten candidate ERGs (from best to worst, top to bottom) according to BestKeeper, geNorm and NormFinder software applications.**

<b>BestKeeper*</b>				<b>NormFinder</b>		<b>geNorm</b>	
Gene	Power	r	SD	Gene	Stability	Gene	M
<b>UBE2D2</b>	2.27	0.989	0.996	<b>UBE2D2</b>	0.100	<b>UBE2D2</b>	0.468
GPS1	2.18	0.972	0.966	<b>PPIA</b>	0.167	<b>PPIA</b>	0.482
<b>PPIA</b>	2.10	0.971	0.936	GPS1	0.180	GPS1	0.502
GUSB	2.09	0.906	1.009	POL2RF	0.190	GAPDH	0.509
MPRIIP	2.08	0.952	0.940	GAPDH	0.197	POL2RF	0.520
YES1	2.05	0.910	0.967	MPRIIP	0.239	MPRIIP	0.541
PGK1	2.00	0.954	0.885	PGK1	0.319	PGK1	0.597
GAPDH	1.93	0.976	0.802	YES1	0.390	YES1	0.667
POL2RF	1.90	0.981	0.805	GUSB	0.443	GUSB	0.720
ACTB	1.80	0.680	1.214	ACTB	0.589	ACTB	0.916
<b>Best 2 genes</b>							
				<b>PPIA / GAPDH</b>	0.241		
<b>Single gene with the lowest intra and intergroup variation</b>							
		Group	Gene	Stability			
		Disease	<b>UBE2D2</b>	0.088			
		Gender	<b>UBE2D2</b>	0.041			

Abbreviations: ERG, endogenous reference gene; r, coefficient of correlation; SD, standard deviation; M, average expression stability; Power, power of the HKG (x-fold). \* Rank order according to Power values.

#### **4.1.5.3 Relative quantification of *PON1* and *PON2* in AD relative to non-demented controls**

To compare the expression of *PON1* and *PON2* in AD relative to non-demented controls, the mRNA levels of *PON1*, *PON2*, *UBE2D2* and *PPIA* were determined in the frontal cortex of 80 subjects (AD:48 /Controls:32), and results were analyzed using the REST 2009 software application (Table 4.1.4). For each gene, the mean quantification cycle (Cq) value obtained for each sample was directly entered in the program. REST 2009 then computed the expression ratios of the target genes (*PON1* and *PON2*) versus a reference gene, and statistically significant differences between the groups (AD versus control) are evaluated by means of randomisation tests. This latter statistical method is more flexible than non-parametric tests and as powerful as traditional parametric tests, and has the advantage of making no distributional assumptions (such as normality) <sup>173</sup>. However, the REST 2009 software does not account for the possible effect of covariates. In the sample set investigated, the raw Ct values did not correlate with age at death, post-mortem delay or gender, but did

correlate with RIN numbers. As such, we reanalyzed the data using the delta-delta method<sup>174</sup>. Since they did not follow a normal distribution, a logarithmic base 10 (log<sub>10</sub>) transformation was performed on these relative ratios. The resulting data were analyzed by ANCOVAs, with gender and disease status included as cofactors, and age at death and RIN number as covariates. Finally, since evidences are suggesting that normalizing real-time qPCR data against a single reference gene may be suboptimal and lead to unreliable results<sup>156, 175</sup>, we normalized our target genes against *UBE2D2* and *PPIA*, separately and in combination (using the geometric mean of *UBE2D2* and *PPIA*).

Our results show that normalization against these carefully selected reference genes, alone or in combination, leads to similar expression levels of our target genes (Table 4.1.4, upper part). In contrast to the REST 2009 program, the ANCOVA computational method suggested that the significance of the differences between AD and control groups is dependent upon the ERG used for normalization (Table 4.1.4, lower part). Indeed, *PON2* is not upregulated significantly when data are normalized against *PPIA* alone, and this might be related to a gender effect on *PPIA* mRNA expression (sex effect, p = 0.009), which was not observed for *UBE2D2* (sex effect, p = 0.146). In contrast, *PON2* is significantly upregulated when normalized against *UBE2D2* alone or both ERGs (Table 4.1.4, lower part).

**Table 4.1.4: Factor of upregulation of PON1 and PON2 in the human post-mortem frontal cortex afflicted by AD in comparison to non-demented controls.**

Normalization against	PON1			PON2		
	UBE2D2	PPIA	Both	UBE2D2	PPIA	Both
Uncorrected Randomisation						
<i>Factor (Ct)</i>	1.263	1.238	1.251	<b>1.606***</b>	<b>1.573**</b>	<b>1.612***</b>
<i>P</i>	0.084	0.224	0.111	<0.001	0.008	<0.001
Corrected ANCOVA						
<i>Factor (log<sub>10</sub> Ct)</i>	<b>1.22*</b>	1.19	1.20	<b>1.29**</b>	1.26	<b>1.28*</b>
<i>P</i>	0.023	0.192	0.060	0.003	0.164	0.024

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; both, normalization against both *UBE2D2* and *PPIA*; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Randomisation test were performed by means of REST 2009 software application and are uncorrected for gender, age at death or RIN number. ANCOVA were performed by SPSS 16.0 and are corrected for gender (fixed factor), age at death and RIN number (covariates).

### **4.1.6 Discussion**

The three software applications identified *PPIA* and *UBE2D2* as being among the best normalization genes for comparing the transcription profiles of AD patients with those of non-demented controls (Table 4.1.3). Normalization of *PONI* and *PON2* expression against *UBE2D2* and *PPIA*, alone or in combination, gave similar results (Table 4.1.4). However, the significance of the differences between the groups (AD and control) varied depending on the ERG selected for normalization. Despite validation of the ERGs, *PPIA* revealed itself to be affected by gender in our expression study cohort, which may cloud the results regarding the expression of our target genes *PONI* and *PON2*. Analysis of the results using a computational method allowing the inclusion of covariates and cofactors is thus suggested. Normalization against *UBE2D2* ( $p = 0.003$ ) or the geometric mean of *PPIA* and *UBE2D2* ( $p = 0.024$ ) indicated that *PON2* expression is up-regulated by a factor of about 1.6 in the frontal cortex of AD relative to non-demented controls, whereas *PONI* mRNA levels are not significantly upregulated.

In accordance with their protein distribution in the brain, both *PONI* and *PON2* mRNAs were detected in homogenates of the frontal cortex of AD and non-demented controls. Indeed, the Swedish Human Protein Atlas program has identified moderate and weak *PON1* protein expression in the cerebellum and glial cells of the cerebral cortex, respectively, whereas *PON2* protein expression was strong in the cells of the molecular layer of the cerebellum and in the glial cells of the cerebral cortex (data are freely available at <http://prote atlas.org/index.php>). Our results contrast with those of Mackness and coworkers who detected only *PON2* mRNA in the human brain using gene expression panels<sup>165</sup>. This discrepancy may be explained by the higher sensitivity of the real-time qPCR technique we used. Accordingly, in their paper, Mackness and coworkers could not detect *PON2* mRNA expression in human plasma leukocytes using the panels, but succeeded in detecting it using real-time PCR<sup>165</sup>.

Overall, our results suggest that *PON2* but not *PONI* mRNA expression is modestly up-regulated in the frontal cortex of AD cases relative to controls, a finding that we recently

replicated in a second cohort of subjects by real-time qPCR using the Taqman chemistry (unpublished findings). While the reason for the up-regulation of the antioxidant *PON2* in AD is unknown at present, it is in agreement with the fact that oxidative stress is extensive in AD brain tissue reviewed in <sup>176</sup>. Studies should be undertaken to: i) corroborates our current findings and ii), investigate whether *PON1* and *PON2* mRNA levels are expressed similarly in other areas of the cortex or subcortical structures.

#### **4.1.7 Conclusions**

In sum, the stability of the ERG selected for normalization should always be carefully scrutinized before use since large variability within its expression will lead to erroneous expression profile of the gene of interest. *UBE2D2* is recommended as ERG for expression studies aiming at measuring the abundance levels of rarely-to-moderately expressed genes in human post-mortem brain tissues afflicted by AD. While *PON1* and *PON2* mRNA are detected in the human brain, additional studies should be undertaken to corroborate our finding of *PON2* but not *PON1* mRNA up-regulation in the frontal cortex of AD relative to non-demented controls.

#### **4.1.8 Acknowledgements**

This study was supported in part by the Canadian Institutes for Health Research (Va.L. and J.P.), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (J.P.), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Ve.L.) and Alcan Corporation (J.P.). The authors would like to thank Ms Danielle Cécyre at the Douglas Institute Brain Bank for providing human brain tissues, and Drs. Dorothee Domenger and Stéphanie Bélanger Jasmin for their comments on the manuscript.

## **4.2 HMGCR is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to Alzheimer's disease in a three cohorts study**

### **4.2.1 Avant-propos**

Trois études ont démontré la présence d'une association entre la MA et certains polymorphismes de l'*HMGCR*<sup>40, 114, 115</sup>. Toutefois, l'impact de ces découvertes est demeuré de faible importance puisque aucune des études d'association pangénomiques effectuées jusqu'à ce jour n'ont étayé ce lien. L'article qui suit vise à combler cette lacune en confirmant et en étayant le lien entre MA et *HMGCR*. Pour ce faire, nous avons exploité trois stratégies permettant d'asseoir notre confiance à l'égard des découvertes génétiques générées. D'abord, mentionnons que les études pangénomiques sont le « golden standard » des études d'associations car leur grande hétérogénéité génétique leur permet de détecter des gènes de risque qui ont de très faibles effets<sup>147</sup>. Le talon d'Achille des études pangénomiques vient justement de cette force, car leur grande hétérogénéité peut masquer les gènes à risque qui jouent un rôle clé dans des populations spécifiques<sup>147</sup>. Dans ce contexte, l'utilisation de population fondatrice comme celle des canadiens français du Québec peut s'avérer salvatrice puisqu'elle réduit le bruit de fond génétique, et facilite l'identification des gènes à risque<sup>147</sup>. Ensuite, on peut accroître le pouvoir d'une analyse en investiguant l'association entre une maladie et un polymorphisme fonctionnel du gène, par exemple un polymorphisme connu pour altérer les niveaux d'ARNm. Enfin, toute découverte devient d'autant plus convaincante lorsque les résultats obtenus sont répliqués par d'autres équipes et dans d'autres cohortes de patients. L'application de ces trois stratégies, soit l'utilisation d'une population fondatrice, l'étude d'un polymorphisme fonctionnel (rs3846662) et la réplication de nos résultats dans trois cohortes de patients différentes, nous a permis de démontrer avec force l'existence d'un lien certain entre la MA et l'effet protecteur de l'*HMGCR*.

### **4.2.2 Authors, abstract, keywords and conflict of interest**

**Authors:** Valerie Leduc, MSc<sup>1,3</sup>; Louis De Beaumont, PhD<sup>1</sup>; Louise Thérroux, BSc<sup>1</sup>; Doris Dea, MSc<sup>1</sup>; Paul Aisen, MD<sup>4</sup>; Ronald C. Petersen, MD/PhD<sup>5</sup>; the Alzheimer's Disease



Neuroimaging Initiative<sup>6</sup>; Robert Dufour, MD/MSc<sup>3</sup> and Judes Poirier, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Douglas Mental Health University Institute, McGill University

<sup>2</sup> Centre for Studies in Aging, McGill University

<sup>3</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal, Department of Nutrition, Université de Montréal

<sup>4</sup> Department of Neurosciences, University of California San Diego

<sup>5</sup> Alzheimer's Disease Research Center, Mayo Clinic College of Medicine

<sup>6</sup> Data used in preparation of this article were obtained from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) database ([adni.loni.ucla.edu](http://adni.loni.ucla.edu)). As such, the investigators within the ADNI contributed to the design and implementation of ADNI and/or provided data but did not participate in analysis or writing of this report. A complete listing of ADNI investigators can be found at:

[http://adni.loni.ucla.edu/wpcontent/uploads/how\\_to\\_apply/ADNI\\_Acknowledgement\\_List.pdf](http://adni.loni.ucla.edu/wpcontent/uploads/how_to_apply/ADNI_Acknowledgement_List.pdf)

**Abstract:** Several retrospective epidemiological studies report that utilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) inhibitors called statins at mid-life can reduce the risk of developing sporadic Alzheimer's disease (AD) by as much as 70%. Conversely, administration of these inhibitors in clinically diagnosed subjects with AD confers little or no benefits over time. Here, we investigated the association between AD and *HMGCR* rs3846662, a polymorphism known to be involved in regulation of *HMGCR* exon 13 skipping, in a founder population and in two distinct mixed North American populations of converting mild cognitively impaired (MCI) subjects [ADCS and ADNI cohorts]. Targeting more specifically women, the G allele negative (G-) AD subjects exhibit delayed age of onset of AD [ $P = 0.017$ ] and significantly reduced risk of AD [O.R.: 0.521;  $P = 0.0028$ ], matching the effect size reported by the *APOE2* variant. Stratification for *APOE4* in a large sample of MCI patients from the ADCS cohort revealed a significant protective effect of G negative carriers on AD conversion three years after MCI diagnosis [O.R.: 0.554;  $P = 0.041$ ]. Conversion rate among *APOE4* carriers with the *HMGCR*'s G negative allele was markedly reduced [from 76% to 26.97%] to levels similar to *APOE4* non-carriers [27.14%], which strongly indicate protection. Conversion data from the independent ADNI cohort also showed significantly reduced MCI or AD conversion among *APOE4* carriers with the protective A allele [ $P =$

0.005]. In conclusion, *HMGCR* rs3846662 act as potent genetic modifier for AD risk, age of onset and conversion.

**Keywords:** Alzheimer's disease, mild cognitively impaired, *HMGCR*, rs3846662, genetic association

**Conflict of interest:** the authors report no conflict of interest.

### **4.2.3 Introduction**

Alzheimer's disease (AD) is an adult-onset chronic neurodegenerative disorder that occurs predominantly later in life. It is the commonest cause of dementia and represents the fourth most common cause of death in the developed world <sup>177</sup>. The two most famous pathological features of AD are the extracellular senile plaques, primarily composed of A $\beta$  peptides, and the intracellular neurofibrillary tangles (NFT), resulting from the truncation and/or hyperphosphorylation of the microtubule-stabilizing Tau proteins (reviewed in <sup>2</sup>). In recent years, patients diagnosed with mild cognitive impairment (MCI), a transitional stage between normal ageing and AD <sup>178, 179</sup>, received overwhelming attention from the AD scientific community. It is estimated from previous research that nearly 80% of amnesic MCI patients, the dominant MCI subtype with a primary memory component <sup>110</sup>, will have converted to AD within the course of six years <sup>180</sup> at an annual conversion rate of 10-15% <sup>181</sup>. Given the absence of curative treatment, elucidation of factors affecting conversion of MCI to AD represents one of the most challenging and urgent medical mysteries affecting our ageing population.

About 5% of all AD cases show an autosomal dominant inheritance <sup>62</sup>, whereas a greater challenge lies in discovering the causes of the more common form of AD – dubbed sporadic AD. Indeed, the concordance rate of AD among identical twins was shown to vary from 60 to 72% <sup>182, 183</sup>, highlighting the existence of interplay between genetic, environmental and health factors <sup>70</sup>. Apolipoprotein E (*APOE*) encodes the main lipid carrier protein in the central nervous system (CNS) and is the most robustly and consistently associated gene with

AD risk, with the  $\epsilon 4$  (referred to here as *APOE4*) and  $\epsilon 2$  (referred to here as *APOE2*) alleles substantially increasing and decreasing the risk level, respectively<sup>85, 89, 111, 184-186</sup>. The *APOE4* allele is also known to increase the likelihood of cognitive impairments in clinically normal 50+ years old over time<sup>187</sup> and to precipitate conversion to AD among MCI patients<sup>110</sup>. Despite being present in about 50% of AD cases, the *APOE4* allele is neither necessary nor sufficient for the development of AD<sup>89, 184, 185</sup>. The search for the identification of additional genes contributing to AD led to the identification of 695 candidate genes<sup>113</sup> of which a surprising number are directly involved in lipid metabolism at the level of transport, synthesis, storage and internalization of lipoproteins<sup>24</sup>. These includes *BINI*<sup>25</sup>, *PICALM*<sup>26</sup>, *ABCA7*<sup>25</sup> and *CLU*<sup>26, 27</sup>. While the genetic heterogeneity of these large genome-wide association studies (GWAS) have an increase power to detect risk genes with smaller effect sizes, population-relevant signal will likely go undetected<sup>147</sup>. The use of isolated populations with a few founders, such as the French Canadians of Quebec<sup>145</sup>, reduces the genetic background noise and allows the detection of population-specific signals<sup>147</sup>. Moreover, targeted testing of polymorphisms known to strongly associate with altered transcript levels may be a powerful way to identify genetic associations with diseases that would otherwise be difficult to detect<sup>188</sup>. Here, we evaluate a functional polymorphism (rs3846662) in *HMGCR* for association with AD in an isolated population, the Quebec founder population (QFP)<sup>145</sup>, and corroborate our findings in two other well-characterized cohorts: the ADCS<sup>178</sup> and the ADNI cohorts<sup>189</sup>.

*HMGCR* is a strong functional AD candidate gene because it encodes the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase enzyme, which serves as the rate-limiting step in cholesterol synthesis in all mammalian cells. Cholesterol requirement of most brain cells are met by two separate yet interrelated processes: synthesis by *HMGCR* and internalization of lipoproteins via the APOE/LDL receptor cascade<sup>44, 104</sup>, which is compromise in AD. Alterations in lipid homeostasis are known to severely impair neuronal function and elicit neurodegenerative disorders such as Niemann-Pick type C disease, a fatal cholesterol storage disorder characterized by the presence of AD-like NFTs in the brain<sup>190</sup>. Elevated plasma cholesterol levels are known among vascular risk factors of AD<sup>191, 192</sup>. Although not a universal finding, treatment of hypercholesterolemia with *HMGCR* inhibitors (statins) in middle-aged individuals confers some level of neuroprotection against late-life development of AD<sup>116-119</sup>.

Additionally, statin treatment was shown to reduce the cerebrospinal fluid phospho-Tau content<sup>122</sup>. This finding is consistent with the quasi-absence of cortical NFTs in autopsy-confirmed cognitively intact subjects who have used statins for several years as opposed to non-users<sup>123</sup>. Furthermore, whole-genome scans of late-onset AD cases reported the presence of several linkage hot spots across the genome, including one in the vicinity of the *HMGCR* gene on chromosome 5<sup>112, 113</sup>. Accordingly, two recent studies found an association between *HMGCR* polymorphisms and AD<sup>114, 115</sup>. One of *HMGCR* most important co-regulator of cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase<sup>193</sup>, was also shown to be significantly associated with sporadic AD in stratified populations enriched in *APOE4*-negative subjects; pointing toward a possible cholesterol metabolism dysfunction in AD subjects born without the *APOE4* allele risk factor.

Overall, studies provide evidences of an association between *HMGCR* and AD, but this association is not compelling because none of the twenty-one GWAS performed to date substantiated *HMGCR* as a susceptibility gene for AD (current as of January 31, 2014: <http://www.alzgene.org/largescale.asp>). Interestingly, *HMGCR* undergoes alternative splicing of exon 13, which encodes part de the catalytic domain of the enzyme. Two independent group reported the involvement of the intron 13 single nucleotide polymorphism (SNP) rs3846662 in regulation of *HMGCR* exon 13 skipping<sup>30, 33</sup> by altering the binding motif of a molecule that regulate *HMGCR* alternative splicing: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1)<sup>7</sup>. As the  $\Delta 13$  transcript could not rescue *HMGCR* activity in UT2 *HMGCR*-deficient cells upon transfection<sup>30</sup>, it has been associated with lower levels of plasma LDL-cholesterol (LDL-C)<sup>194</sup> and is one of the single most informative molecular marker of LDL-C response to statins<sup>33, 137, 141</sup>. The rs3846662 represented the ideal functional polymorphism to study in our three cohorts study. The rs3846662 is even more important to study in the context of AD and MCI given our original preliminary report of the presence of multiple genetic risk factors in the *HMGCR* gene and their impacts on AD pathology in a small cohort of autopsy-confirmed cases<sup>195</sup>.

## **4.2.4 Material and method**

### **4.2.4.1 Quebec founder population (QFP, cohort 1): *HMGCR* gene in controls and AD cases**

***Human Subjects Demographics:*** Patients demographic characteristics are summarized in Table 4.2.1. Definite diagnosis of AD was based on histopathological confirmation of AD according to NINCDS-ADRDA criteria <sup>167</sup>, whereas controls had to be free of neurological or psychiatric diseases and, for autopsy-confirmed cases, of brain structural lesions (tangle and plaque indices reading  $< 20/\text{mm}^3$  and  $< 10/\text{mm}^2$ , respectively). All subjects are from the so-called QFP (French Canadians of Quebec). This population (age-matched controls: N= 250 / autopsy-confirmed AD cases: N= 324) descended in genetic isolation from several thousand founders who emigrated from France in the 17th century <sup>145</sup>. The demographic history of the QFP, which is characterized by population bottleneck, rapid population expansion, and little admixture, makes it a valuable resource for use in genetic studies <sup>196</sup>. The population has been well characterized as having reduced genetic heterogeneity for Mendelian diseases <sup>146</sup>. Age at death, age at recruitment and education are not significantly different between controls and autopsy-confirmed AD subjects. *APOE* genotypes distribution is similar to previously reported prevalence for Eastern Canadians <sup>89</sup>, with a strong and significant enrichment of the *APOE4* allele in autopsied AD cases (Table 4.2.1). All brain and blood tissues were obtained from the Douglas Hospital Brain Bank, Montreal, Canada. Post-mortem delays generally varied from 10 to 20 hrs and were matched for control and AD subjects.

***DNA Extraction:*** DNA was extracted from brain tissues (AD and control cases) or blood lymphocytes (control cases) using the DNeasy tissue kit (from Qiagen) and automated DNA extraction (NA-1000; AutoGen, Holliston, MA, USA), respectively.

***Sequencing of the *HMGCR* gene and mapping of rs3846662:*** Complete sequencing of the coding and non-coding regions of the *HMGCR* gene was performed in 30 autopsy-confirmed AD cases and 15 age-matched control subjects using the Applied Biosystem 3730xl DNA analyzer from the McGill Innovation Centre. Genotype profiling of intron 13 of *HMGCR* was performed with PCR followed by pyrosequencing <sup>197</sup>. The intron 13 SNP

(rs3846662) was amplified using a PCR approach, with the following primer pairs: forward biotin 5'-TTTGCCAGTTTAAAAATACATCAT -3' and reverse 5'-TTGACCCAAAAGGTA-TCACTAATT - 3'. Genomic DNA (250-500 ng) was amplified with 0.2 pM of each primer, 1X PCR buffer (Qiagen kit), 0.4 mM dNTP, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% DMSO and 0.01U of Qiagen Taq polymerase. Amplification was carried out on a Biometra T professional Basic thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) with the following conditions for 35 cycles: 30 sec. at 95°C, 30 sec. at 50.9°C and 1 min. at 72°C. These 35 amplification cycles were preceded by a 3-minute hot start at 95°C and followed by a final 4-minute extension at 62°C to the last cycle. PCR products were visualized on a 1.2% agarose gel. The intron 13 SNP was subsequently determined via an established pyrosequencing protocol<sup>197</sup> with oligo-sequencing 5'- ACTCTTCTCATTGCCTTAC - 3'. The sequence to analyze was: C/TTATGATGTAT.

#### **4.2.4.2 Alzheimer's disease Cooperative study (ADCS, cohort 2): HMGCR gene in MCI subjects**

**Human Subjects Demographics:** Patients demographic characteristics are summarized in Table 4.2.1. MCI patients recruited for the purpose of the present study took part in the three years follow up, double-blind ADCS<sup>178</sup> and provided written informed consent for AD-related genetic screening. Information about the study design, methods to determine MCI diagnosis as well as conversion to AD can be found in the published ADCS study<sup>178</sup>. Age at recruitment and education was equivalent between AD converters and non-converters. Consistent with previous findings<sup>180</sup>, *APOE* genotypes distribution was significantly different across groups, with a significant disproportion of *APOE4* allele found in AD converters (Table 4.2.1).

**DNA Extraction and mapping of rs3846662:** DNA extraction from blood samples was performed using Qiagen kits as described in the published ADCS study<sup>178</sup>. Mapping of rs3846662 in intron 13 was performed as described for the QFP cohort.

#### **4.2.4.3 Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative (ADNI, cohort 3): *HMGCR* gene in a mix population of AD, MCI and cognitively intact elderly**

##### ***Human Subjects Demographics, DNA Extraction and mapping of rs3846662:***

Patients demographic characteristics are summarized in Table 4.2.1. Genotyping information on elderly controls from the ADNI cohort was obtained via a genome-wide whole brain analysis including 620 901 SNPs using the Human 610-Quad Bead Chip (Illumina Inc., San Diego, CA). Genotype profiling of the intron 13 of the *HMGCR* gene was extracted from the open-access database and data from the 1233 individuals recruited during ADNI-I were compiled for further conversion-to-deteriorated cognitive level analyses. Information about the specific GWAS protocol used to obtain genotyping information can be found in a recent report by Shen and collaborators<sup>189</sup>, whereas the full clinical data set used in the preparation of this article were obtained from the ADNI database ([adni.loni.ucla.edu](http://adni.loni.ucla.edu)). ADNI is the result of efforts of many co-investigators from a broad range of academic institutions and private corporations, and subjects have been recruited from over 50 sites across the U.S. and Canada. The initial goal of ADNI was to recruit 800 subjects but ADNI has been followed by ADNI-GO and ADNI-2. To date these three protocols have recruited over 1500 adults, ages 55 to 90, to participate in the research, consisting of cognitively normal older individuals, people with early or late MCI, and people with early AD. The follow up duration of each group is specified in the protocols for ADNI-1, ADNI-2 and ADNI-GO. Subjects originally recruited for ADNI-1 and ADNI-GO had the option to be followed in ADNI-2. For up-to-date information, see [www.adni-info.org](http://www.adni-info.org).

#### **4.2.4.4 Statistical Analyses for the three cohorts**

Binary logistic regressions were computed between *HMGCR* polymorphism and disease status in the QFP and ADCS cohorts. Stratification by gender and *APOE* genotype was performed on these cohorts using Wald statistics. Odds ratios for *HMGCR* and *APOE* polymorphisms were also calculated across cohorts.

Wilcoxon chi-square rank tests derived from Kaplan-Meier survival curves were used to contrast the effects of the different genetic variants of the *HMGCR* and *APOE* polymorphisms on the age of onset of AD in autopsy-confirmed AD cases from the QFP

cohort. Finally, MCI-to-AD conversion rate during the three years ADCS study and conversion rate during the 48-months ADNI study was computed as a function of the *HMGCR*'s intron13 allele using Wilcoxon chi-square rank tests derived from Kaplan-Meier survival curves stratified by *APOE* genotype.

#### **4.2.5 Results**

In order to identify AD specific SNPs within the *HMGCR* gene, a complete sequencing of the coding and non-coding regions of the *HMGCR* gene was performed in 30 autopsy-confirmed AD cases and 15 age-matched control subjects of the QFP. The relatively homogeneous environmental exposures and reduce genetic heterogeneity associated with this population<sup>145, 146, 196</sup> were likely to be advantageous for the study of AD, a disease resulting from genetic and environmental interplay. The use of autopsy-confirmed cases allowed us to further reduce the false-positive background noise normally seen in clinical diagnosis. This preliminary study failed to reveal any disease-specific genetic mutations in all 20 exons. A rare polymorphism in exon 15 was detected but did not differ in terms of group incidence between AD and age-matched control subjects. Mapping of the introns, on the other hand, turned out to be more interesting as the rs3846662 SNP in intron 13 of the *HMGCR* gene (A or G allele) was found to significantly associate with sporadic AD.

Table 4.2.1 summarizes the frequency distribution obtained in our QFP cohort that included 250 controls and 324 AD cases. The association between *HMGCR*'s intron 13 G-negative polymorphism (*AA*) and sporadic AD was found to be significant [*O.R.* = 0.694; *P* = .024] (Table 4.2.2). Stratification by gender revealed that this association is significant only in women [**Women:** *O.R.* = 0.521; *P* = 0.0028; **Men:** *O.R.* = 0.890; *P* = .686] as is the case for the well-known *APOE2* allele benefit [**Women:** *O.R.* = 0.316, *P*<0.001; **Men:** *O.R.* = 0.679; *P* = .293] in the same group of subjects (Table 4.2.2).

Analyses of the impact of the *HMGCR* polymorphism on age of onset in AD is summarized in Figure 4.2.1. Although we did not observe any effect of this variant on the age at death [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 293} = 0.950$ ; *P* = .330], a significant effect of a double



dose of intron 13 A allele (G negative genotype) on age of onset was detected [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 289} = 4.57$ ;  $P = .024$ ]. This *HMGCR* protective genotype exerted a strong impact in **women** [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 188} = 6.09$ ;  $P = .017$ ] who exhibited a delayed age of onset of about 3.6 years. This age effect in G negative subjects was not found in **men** [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 100} = 1.88$ ;  $P = .170$ ]. Analysis of the “A” variant dose effect on age of onset reveals a significant association ( $p < 0.03$ ) in women; particularly between the age of 60 and 80 (Supplementary material 4.2.1).

As reported previously in several independent studies<sup>111, 186</sup>, a very similar protective effect was observed with the *APOE2* allele [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 289} = 5.05$ ;  $P = 0.019$ ], **women** displaying again the most significant impact on age of onset [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 188} = 6.43$ ;  $P = 0.013$ ] (Figure 4.2.1). In sharp contrast, the *APOE4* allele in this study was strongly associated with an earlier age of onset of AD [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 289} = 11.32$ ;  $P < .001$ ], particularly so in **women** [Wilcoxon Survival test:  $X^2_{1, 188} = 7.48$ ;  $P = 0.009$ ].

In summary, studies performed in our autopsied-confirmed QFP subjects uncovered a protective association between *HMGCR*'s G negative genotype, AD risk and age of onset, particularly in women. The question was then to decipher whether or not the A allele could modulate the *APOE4* risk in patients not affected by full-blown AD, such as in MCI patients.

**Table 4.2.1: QFP, ADCS and ADNI Demographics.**

	<u>AD autopsy-Confirmed Cases</u>		<u>MCI patients</u>		<u>AD, MCI and elderly controls</u>	
	Control n = 250	AD n = 324	Non-converters n = 271	AD Converters n = 138	Non-converters n = 935	Converters n = 298
<b>Age at death/ recruitment</b> mean ± SD, y	75.5 ± 11.1	79.2 ± 8.3	71.56 ± 7.48	74.18 ± 6.54	75.02 ± 7.06	75.43 ± 6.56
<b>Age at onset/conversion</b> mean ± SD, y	—	71.7 ± 8.9	—	75.4 ± 8.43	-	77.27 ± 6.8
<b>Sex</b> No. (%) female	124 (50)	210 (65)	115 (38.7)	69 (45)	348 (39)	97 (35)
<b>Schooling</b> mean ± SD, y	8.1 ± 4.0	8.9 ± 4.4	15.13 ± 2.86	14.67 ± 3.09	14.92 ± 4.74	14.90 ± 5.25
<b>APOE3 allele</b> frequency	0.76	0.56	0.611	0.536	0.71	0.59
<b>APOE4 allele</b> frequency	0.11	0.38	0.354	0.428	0.24	0.39
<b>APOE2 allele</b> frequency	0.13	0.06	0.035	0.036	0.05	0.03
<b>HMGCR A allele</b> frequency	0.60	0.53	0.53	0.49	0.47	0.46

Abbreviations: QFP: Quebec Founder Population; ADCS: Alzheimer's disease cooperative study; ADNI: Alzheimer's disease neuroimaging initiative; AD: Alzheimer's disease; y: year; SD: standard deviation.

**Table 4.2.2: Binary logistic regression between *HMGR* rs3846662 and the AD status (QFP cohort).**

Allele	N	Overall effect		Women			Men		
		Sig. (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR
<i>HMGR-G-</i>	574	0.024*	0.694	334	0.003*	0.521	240	0.686	0.890
<i>APOE4</i>	573	0.001**	6.180	333	0.001**	7.204	240	0.001**	5.253
<i>APOE2</i>	573	0.001**	0.447	333	0.001**	0.316	240	0.293	0.679

Allele	N	Non- <i>APOE4</i> carriers		<i>APOE4</i> carriers		Non- <i>APOE2</i> carriers		<i>APOE2</i> carriers				
		Sig. (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR			
<i>HMGR-G-</i>	308	0.634	0.881	262	0.183	0.713	469	0.05*	0.634	101	0.304	1.558

**Abbreviations:** OR: odds ratio; N: sample size; *HMGR-G-* : G negative versus G positive genotype. Asterisks represent significant risk for AD at the 95% C.I. (\*) or 99% C.I. (\*\*) level. The regression was performed in the autopsy-confirmed AD cases of the QFP cohort. Secondary analyses were performed in the same population but stratified by gender or *APOE* genotype, using Wald statistic. The odds ratios are also provided.

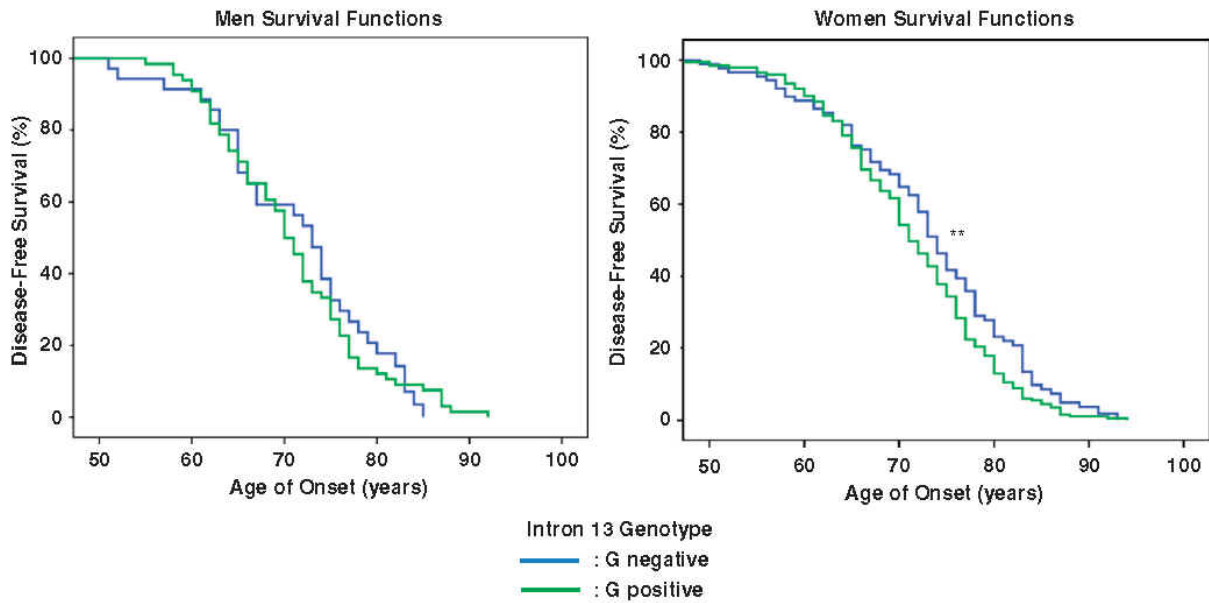
**Table 4.2.3. Binary logistic regression between *HMGR* rs3846662 and the AD status (ADCS cohort).**

Allele	N	Overall effect		Women			Men		
		Sig. (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR
<i>HMGR-G-</i>	409	0.129	0.726	164	0.342	0.798	245	0.145	0.650
<i>APOE4</i>	408	0.029*	1.573	164	0.017*	2.24	244	0.285	1.238
<i>APOE2</i>	409	0.118	0.408	164	0.209	0.403	245	0.296	0.355

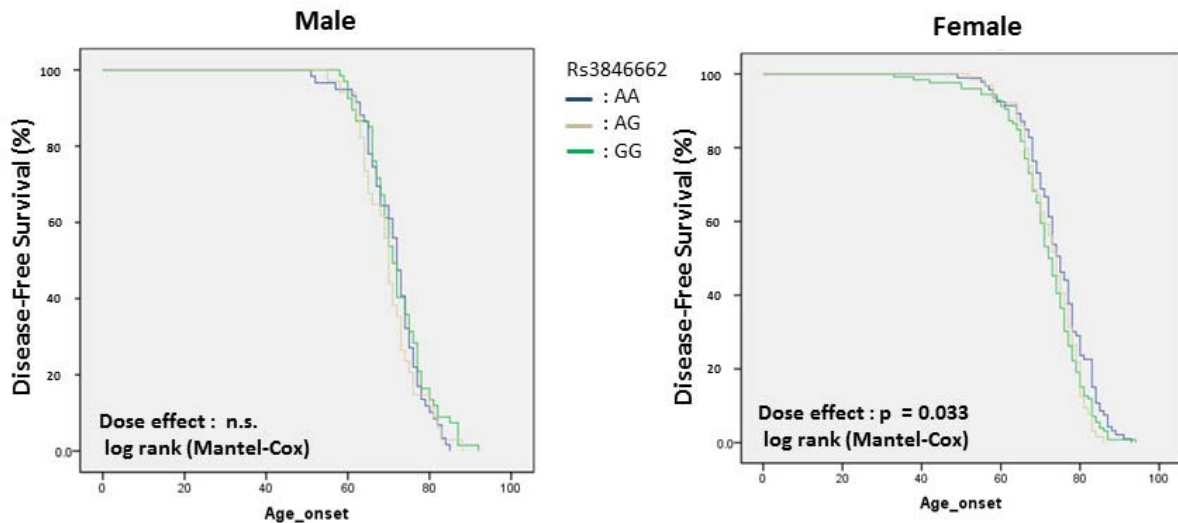
  

Allele	N	Non- <i>APOE4</i> carriers		<i>APOE4</i> carriers		Non- <i>APOE2</i> carriers		<i>APOE2</i> carriers				
		Sig. (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR	N	Sig (2-tailed)	OR			
<i>HMGR-G-</i>	140	0.476	1.129	268	0.041*	0.554	392	0.156	0.742	17	0.579	0.545

**Abbreviations:** OR: odds ratio; N: sample size; *HMGR-G-* : G negative versus G positive genotype. Asterisks represent significant risk for AD at the 95% C.I. (\*) level. Regressions were computed in the MCI patients of the ADCS cohort. Secondary analyses were performed in the same cohort stratified by gender and *APOE* genotype using Wald Statistics. Odds ratios are also provided.



**Figure 4.2.1: Age of onset in *HMGR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.** The joint Table contrasts the effects of the different genetic variants of the *HMGR* gene to those of *APOE* using a Wilcoxon chi-square rank test. N: sample size;  $X^2$ = chi square; r: correlation; *HMGR* G-: G negative genotype versus G positive. Asterisks represent significant association for AD at the 95% C.I. (\*) or 99% C.I. (\*\*) level.

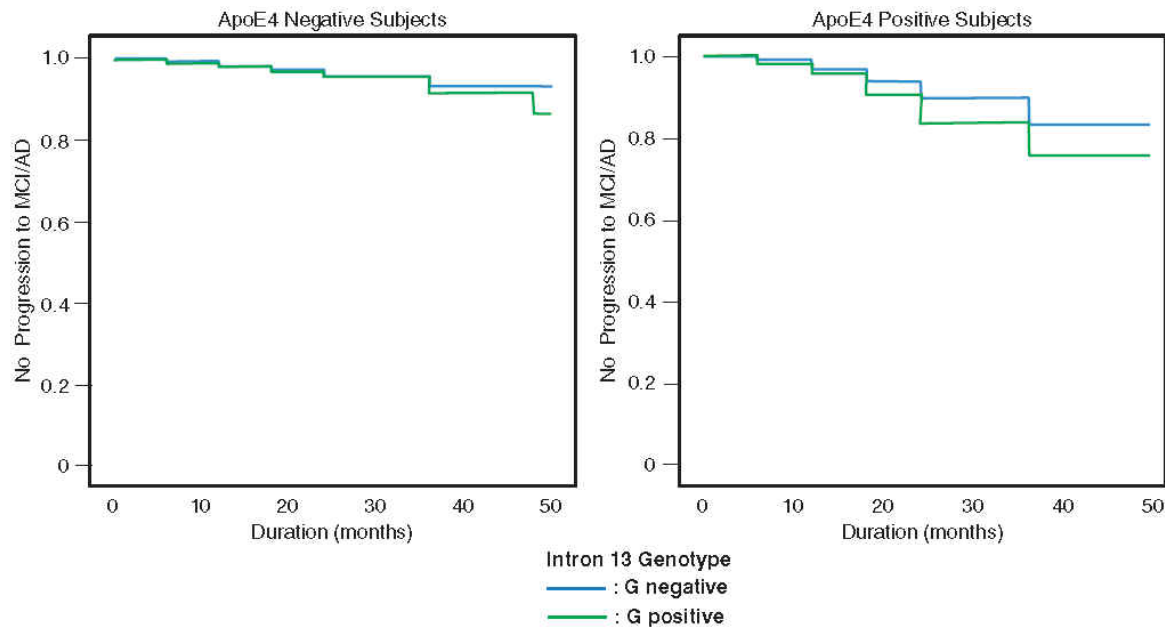


**Supplementary material 4.2.1: Age of onset in *HMGR* rs3846662 intron 13 genotype carriers.**

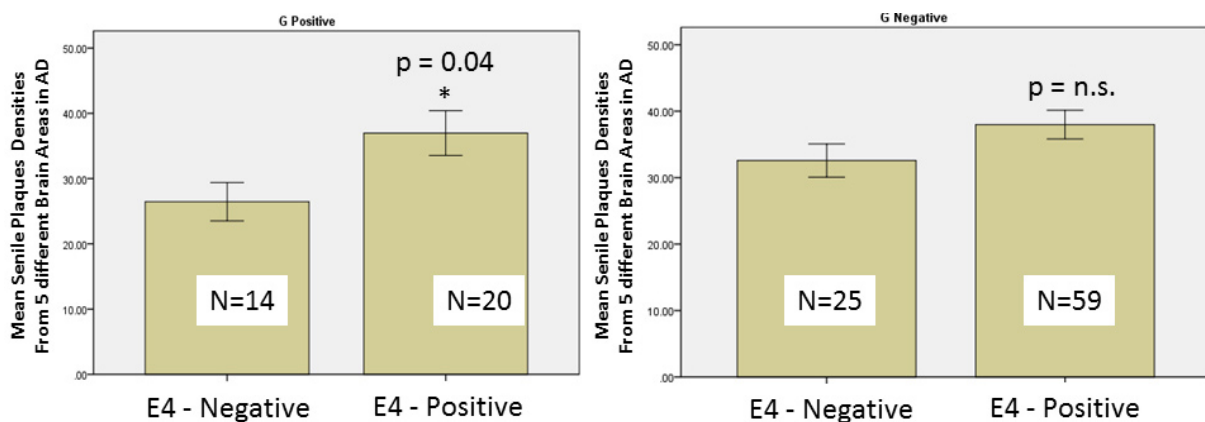
In a follow-up study, a total of 409 MCI patients from the original Petersen et al., 2005<sup>178</sup> MCI conversion trial (ADCS) were thus genotyped for *APOE* and *HMGCR* polymorphisms. Table 4.2.1 summarizes the frequency distribution obtained in MCI patients from the three years ADCS study that included 271 non-converters and 138 converters to AD. Conversion was determined by an expert panel from the ADCS study (refer to<sup>178</sup> for more details). Associations between intron 13 A allele and AD conversion were not found to be significant [*O.R.* = 0.726; *P* =.129, Table 4.2.3]. However, *APOE4* genotype stratification revealed a significant protective effect in G negative carriers on AD conversion among ***APOE4*-positive** MCI patients [*O.R.* = 0.554; *P*=.041, Table 4.2.3]. Interestingly, conversion rate among *APOE4/HMGCR*'s G negative subjects was markedly reduced [from 76% to 26.97% conversion to AD] to levels similar to *APOE4* non-carriers [27.14% conversion to AD] at three years' post-MCI diagnosis. This suggests that the *HMGCR* gene variant can markedly attenuate *APOE4* risk, especially in the pre-dementia stages of the disease.

To extend and replicate the conversion dataset in the ADCS cohort, we decided to examine the conversion rate from normal controls/MCI/AD to MCI/AD in the ADNI cohort as a function of *HMGCR*'s G allele (positive vs negative) status and *APOE* stratification. To this end, we used genotyping data from ADNI that included 1233 individuals who were followed over a period of 48 months for conversion to MCI or AD. Table 4.2.1 summarizes the frequency distribution obtained in this mix population of cognitively intact, MCI and AD subjects that included 935 non-converters and 298 converters. Consistent with the abovementioned ADCS' findings, associations between G negative status and MCI/AD conversion were not found to be significant [*O.R.* = 1.019; *P* =.908]. However, the G negative polymorphism exerted a very significant protective effect specific to ***APOE4* carriers** [ $X^2_{1, 756} = 7.751$ ; *P* =.005] (Figure 4.2.2). Analysis of senile plaques and neurofibrillary tangles densities in a cohort of 118 autopsied AD cases derived from our eastern Canadian population isolate reveals that the reported apoE4-mediated increases in hippocampal and cortical plaques and tangles density in AD is actually prevented in G negative carriers as opposed to G positive subjects (Supplemental material

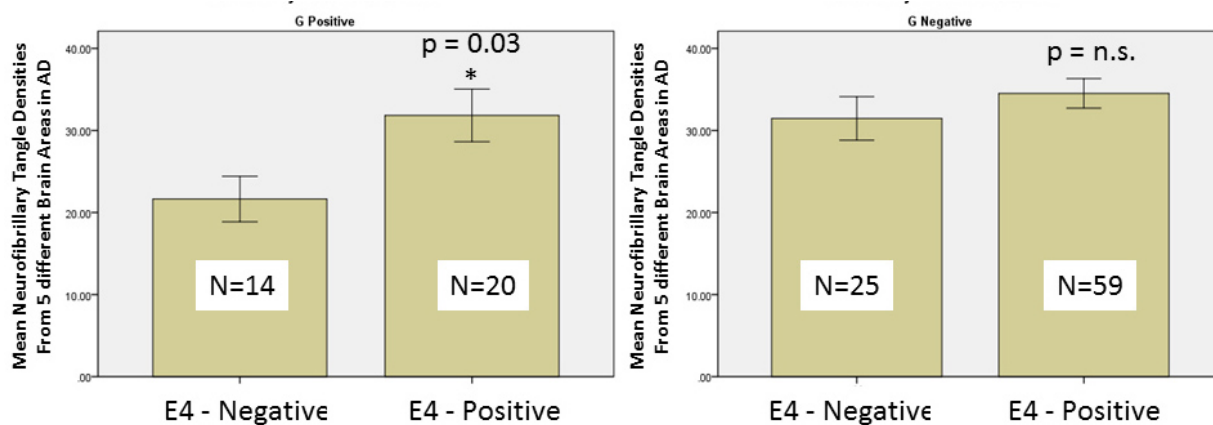
4.2.2 and 4.2.3); consistent with the protective role of G negative polymorphism on age of onset and conversion rate. As initially hypothesized, these confirmatory results clearly indicate that *APOE* and *HMGCR* genes are interdependently modulating conversion to MCI or AD among an at-risk cognitively intact or MCI population.



**Figure 4.2.2: Kaplan–Meier Estimates of the Rate of Progression from Normal to Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer’s Disease (AD).** Conversion rate, stratified by *APOE* genotype, among subjects from the ADNI cohort as a function of the *HMGCR* intron13 genotype (*APOE4* positive subject,  $P = 0.005$ ). AA: G negative genotype; AG/GG: G positive genotype.



**Supplementary material 4.2.2: Effect of *APOE* genotype on senile plaques densities in AD stratified by *HMGCR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.**



**Supplementary material 4.2.3: Effect of *APOE* genotype on tangles pathology in AD stratified by *HMGCR* rs3846662 intron 13 G negative vs G positive carriers.**

**4.2.6 Discussion**

The association between sporadic AD and the *HMGCR*'s rs3846662 *G negative status* in this three cohorts study clearly identify the *HMGCR* gene as one of the most important and common protective variant ever identified for sporadic AD, second only to *APOE2*. It provides us with a novel lead explanation as for the discrepancies between retrospective and prospective studies dealing with the potential benefit of statins in sporadic AD. Indeed, several retrospective cross-sectional observational studies have shown that statins can reduce by up to 70% the risk of developing AD<sup>116, 118</sup>. However, results of prospective studies have been inconsistent<sup>198-200</sup>, and recent double blind placebo-controlled clinical trials in mild-to-moderate AD using simvastatin and atorvastatin for at least 6 months failed to show disease stabilization or improvement<sup>120, 121</sup>, mostly due to a marked treatment response heterogeneity. This suggests that for statins to reduce risk, it must be taken during a certain critical period and for a certain length of time, preferably years prior to the expected onset of the disease. Corroborating this conclusion, the protective *HMGCR*'s *G negative* polymorphism was shown to modulate *APOE4* risk in cognitively intact and MCI subjects and, to delay age of onset of AD by 3.6 years. These findings are consistent, at least in part, with a recent small case-control study which reported an interaction between the rs3761740 A allele in the promoter region of the

HMGCR gene, the *APOE E4* allele and an altered risk of AD (OR = 2.41; 95% CI = 0.93–6.22) (60). Analysis of the allelic distribution of this promoter variant and the rs3846662 SNP examined in the present study reveals a potent linkage disequilibrium (probability: 0.97) between the two variants in our population isolate from eastern Canada which could very well explain the complementary nature of findings reported by the two research teams (data not shown).

Whether the protective effect of statins on AD risk is mediated through reduction of vascular risk factors or through the direct modulation of CNS cholesterol homeostasis remains to be clarify. Interestingly, Wolozin and colleagues reported that statins neuroprotective properties sharply differed as a function of lipids solubility <sup>119</sup>, an observation recently replicated in a secondary analysis of the “preventive” Ginkgo Evaluation of Memory Study <sup>201</sup>. These studies found that the more lipid-soluble (i.e. simvastatin) HMGCR inhibitors exhibited high protective effects as opposed to the more lipophobic and less likely to cross the blood-brain-barrier statins (i.e. atorvastatin), which exhibited little to no protective effect. These observations would thus favor the hypothesis that statin mediates its neuroprotective effect through direct modulation of CNS cholesterol homeostasis. Unfortunately, none of the statin studies examined the contribution of the genetic polymorphisms of *HMGCR* and *APOE* on the extent of the protective effect.

Combined with the results of the genome-wide screening on chromosome 5 <sup>112, 113</sup>, our findings clearly point toward a potential role of the *HMGCR* in the etiopathology of AD. Our study indicates that carriers of the intron 13 rs3846662 variant display a protective effect that resemble in size and gender what has been reported for *APOE2* in humans. The similarity between the genetic association of APOE, the brain’s most important cholesterol transporter, and HMGCR, the rate-limiting step in cholesterol synthesis in the brain, is revealing to be quite interesting. On one hand, *APOE4* is a risk factor that precipitates age of onset, markedly so in women, whereas the *APOE2* variant as well as the *HMGCR*’s G negative polymorphism both delay age of onset of AD, more so, in women. Furthermore, APOE is perceived by lipid neurobiologists as a key extracellular lipid transport protein,



while HMGCR, which is localized in the endoplasmic reticulum, is primarily an intracellular, organelle-specific protein that regulates intracellular lipid production. It is thus quite conceivable that these two proteins actually have complementary roles in the maintenance of local brain cholesterol homeostasis, particularly in presence of neurodegeneration or damage.

In conclusion, this three cohorts study provides strong evidence that *HMGCR* is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to AD. Converging evidence have now confirmed the involvement of rs3846662 SNP in *HMGCR* exon 13 skipping in peripheral cells *in vitro*, the A allele being associated with an increased in exon 13 skipping<sup>30</sup>. As reflected by its association with decreased LDL-C levels<sup>194</sup>, the rs3846662 A allele is associated with decreased HMGCR activity. This finding is in accordance with the blunted response to statin therapy observed in G negative (or AA allele) carriers<sup>33, 137, 141</sup>. Given that these findings were obtained mostly in the periphery, whether the rs3846662 is as important for the CNS needs to be substantiated. Studies addressing if the rs3846662 modulates mRNA splicing, protein HMGCR levels and activity in the human brain are currently underway in autopsied human brains.

#### **4.2.7 Acknowledgements**

This study was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JP), J.L. Levesque Foundation (JP) and by the Canadian Institutes of Health Research (VL/LDB/JP). The authors would also like to thank Mrs. Danielle Cécycy at the Douglas Institute/ Bell Canada Brain Bank for providing human brain tissues. Data collection and sharing for this project was supported by the ADNI National Institutes of Health (NIH) grant U01 AG024904 (PI: Michael W Weiner, MD, VA Medical Center and University of California, San Francisco, CA, USA). Funding sources for ADNI include the National Institute on Aging (NIA), the National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, the US Food and Drug Administration, the non-profit partners of the Alzheimer's Association, the Alzheimer's Drug Discovery Foundation and the Dana Foundation, and the following private sector contributors: Abbott, AstraZeneca AB,

Amorfix, Bayer Schering Pharma AG, Bioclinica Inc, Biogen Idec, Bristol–Myers Squibb, Eisai Global Clinical Development, Elan Corporation, Genentech, GE Healthcare, Innogenetics, IXICO, Janssen Alzheimer Immunotherapy, Johnson and Johnson, Eli Lilly and Co, Medpace Inc, Merck and Co, Inc, Meso Scale Diagnostic & LLC, Novartis AG, Pfizer Inc, F Hoffman–La Roche, Servier, Synarc, Inc and Takeda Pharmaceuticals. Private sector contributions to ADNI are facilitated by the Foundation for the NIH ([www.fnih.org](http://www.fnih.org)). The grantee organization is the Northern California Institute for Research and Education. The study is coordinated by the Alzheimer’s Disease Cooperative Study at the University of California, San Diego, CA, USA and ADNI data are disseminated by the Laboratory of Neuro Imaging at the University of Los Angeles, CA, USA. Additional ADNI support comes from the NIH grants P30 AG010129, K01 AG030514 and U24 AG21886. We also wish to thank all the members and funders of the ADCS who participated in the original MCI study.

## **4.3 Role of rs3846662 and *HMGCR* alternative splicing in statin efficacy and baseline lipid levels in familial hypercholesterolemia**

### **4.3.1 Avant-propos**

Deux équipes ont travaillé sur l'étude de l'*HMGCR* dans le système périphérique : celle de Jan L Breslow<sup>30</sup> et celle de Ronald M Krauss et Marisa W Medina<sup>33</sup>. L'étude de l'*HMGCR* fut réalisée dans les deux cas *in vitro*, à l'aide de lignées cellulaires immortalisées. Ces modèles cellulaires sont fort utiles pour les études de mécanismes, mais elles ne donnent pas nécessairement un portrait juste de ce qui se passe *in vivo*. Le but de cette étude était donc de déterminer, *in vivo*, si le génotype rs3846662 de l'*HMGCR* corrèle bel et bien avec les niveaux lipidiques de base, les niveaux d'ARNm des deux variants de l'*HMGCR* et la réponse au traitement avec des statines dans une population de patients atteints HF. Nous nous sommes intéressés à cette population en particulier car, en plus de n'avoir jamais fait l'objet d'une étude en lien avec le locus rs3846662 de l'*HMGCR*, elle présente une forte homogénéité génétique.

### **4.3.2 Authors, abstract, keywords, conflict of interest and source of funding**

**Authors:** Valerie Leduc<sup>2,3</sup>; Lucienne Bourque<sup>3</sup>; Judes Poirier<sup>1,2</sup> and Robert Dufour<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centre for Studies in Alzheimer's disease prevention, McGill University

<sup>2</sup> Douglas Mental Health University Institute, McGill University

<sup>3</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Department of Nutrition, Université de Montréal

**Abstract :** *Objectives:* To assess the contribution of rs3846662 locus and *HMGCR* alternative splicing on serum lipid levels and statin efficacy, we measured *in vivo* *HMGCR* mRNA and lipids levels in French Canadian individuals all affected by heterozygous

familial hypercholesterolemia due to the >15kb deletion of the *LDLR* gene. *Results:* FH men and women carrying the AA genotype at rs3846662, but no *APOE4* allele, have higher levels of total cholesterol and LDL-C at baseline (n = 98,  $P < 0.05$ ). However, with regard to statin efficacy, the penetrance of the AA genotype is sex-dependent. Indeed, the percent in LDL-C reduction upon statin treatment is significantly decreased in women with the AA genotype compared to women without it (n = 85,  $P < 0.05$ ), whereas this is not observed in men. While both men and women bearing the AA genotype showed higher ratio of full length *HMGCR* compare to subjects without it (n = 42,  $P < 0.05$ ), overall transcription was respectively decreased and increased in men and women carrying this genotype (n = 42,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). Finally, in our FH cohort, the interaction sex/AA genotype explained between 6 and 9% of the variance in statin response, whereas *HMGCR* alternative splicing explained between 22 and 55% of its variance. *Conclusion:* the genotype at rs3846662 locus and *HMGCR* mRNA splicing significantly impact the women response to statin therapy.

**Keywords:** genetic polymorphism; rs3846662; human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; familial hypercholesterolemia; alternative splicing; serum lipid levels ; statin efficacy.

**Conflict of Interest and Source of Funding:** This study was supported by the Canadian Institute of Health Research (VL, JP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JP), the Canadian Stroke Network (VL) and the Fondation Leducq Transatlantic Networks of Excellence (LB, RD).

### **4.3.3 Introduction**

Elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels are the primary risk factor for atherosclerosis and atherosclerosis related-diseases (reviewed in <sup>202</sup>). Consequently, lipid-lowering therapies have become the foundation for prevention and treatment of these disorders <sup>202</sup>. Statins are the most commonly prescribed drugs to lower LDL-C levels. They inhibit the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis, namely 3-

hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), thereby reducing hepatic cholesterol production, upregulating hepatic LDL receptors (LDLR) and maximizing LDL-C and LDL-related particles clearance<sup>4</sup>. There are wide interindividual differences in both serum lipid levels and the magnitude of response to statin therapy. Although not a universal finding<sup>203</sup>, studies on monozygotic twins reared apart or together suggest that despite the undeniable environmental influence, the interindividual variations observed in serum lipid levels are predominantly explained by genetic variability<sup>204-206</sup>. As for the differences observed in statin response, they have been attributed to a plethora of genetic and non-genetic factors, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) in lipid metabolism genes (reviewed in<sup>207</sup>), age, smoking status, body weight, diet, physical activity and racial ancestry<sup>138-140</sup>. Recent evidences suggest that gene alternative pre-mRNA splicing may also be a likely determinant of serum lipid levels and statin efficacy. Indeed, while *HMGCR* genotypes explained less than 2% of the variance in statin response<sup>141</sup>, *HMGCR* alternative splicing explained between 6 and 15% of its variance<sup>32,33</sup>.

Effectively, *HMGCR* pre-mRNA undergoes alternative splicing of exon 13 and generates two transcripts: full-length (FL) *HMGCR* and  $\Delta 13$  *HMGCR*<sup>28</sup>. Exon 13 encodes part of the catalytic/statin-binding domain of the enzyme<sup>29, 31</sup> and, unsurprisingly, transfection of the  $\Delta 13$  transcript could not rescue HMGCR activity in UT2 *HMGCR*-deficient cells<sup>30</sup>. Interestingly, two independent groups reported the involvement of the intron 13 SNP rs3846662 (A or G allele) in regulation of *HMGCR* exon 13 skipping<sup>30,33</sup>. This SNP likely alters the binding motif of heterozygous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1), a molecule that regulates *HMGCR* alternative splicing<sup>7</sup>. The major and ancestral A allele at locus rs3846662 likely engenders the preferential binding of HNRNPA1, which promote skipping of exon 13<sup>7</sup>. These findings suggest that an increase proportion of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA is promoted in individuals carrying the rs3846662 A allele<sup>30,33</sup>, resulting in an HMGCR protein with possibly lower activity<sup>30,32</sup>, lower levels of LDL-C at baseline<sup>194, 208, 209</sup> and lesser sensitivity and response to statin inhibition<sup>32, 137, 141, 210</sup>.

Despite the growing body of *in vitro* literature examining the impact of the A/G allele at locus rs3846662, researchers have not yet measured *HMGCR* mRNA levels *in vivo*, in living humans. Furthermore, it has been suggested that the alternative splicing of *HMGCR* may exist primarily to correct small imbalances in cholesterol homeostasis, allowing the cell to dodge the need for stimulation of a robust transcriptional response when cholesterol disequilibrium occurs<sup>211</sup>. Alternative splicing and rs3846662 would thus be expected to have a stronger impact on baseline lipid levels rather than on LDL-C levels following statin treatment<sup>211</sup>. To further assess the contribution of *HMGCR* alternative splicing and rs3846662 on baseline lipid levels and statin response, we quantified these parameters in an homogenous cohort of French Canadians individuals all affected by heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) due to the >15kb deletion of the promoter and first exon of the *LDLR* gene. FH is a monogenic hereditary disorder characterized by large increase in plasma LDL-C levels, cholesterol deposition in tendons and increased risk of atherosclerosis<sup>212</sup>. Owing to a founder effect, the prevalence of FH in French Canadians of Quebec is twice that observed generally worldwide, with the >15kb deletion of the *LDLR* gene accounting for 60% of the mutant allele<sup>149</sup>. These patients, in addition to sharing a homogeneous genetic background, are functional hemizygotes<sup>213</sup>. Their LDL-C levels are thus likely strongly influenced by variations within the functional *LDLR* allele and by the other genetic and environmental factors specific to the individuals<sup>214 150</sup>. Notably, gender and apolipoprotein E (*APOE*) genotype have previously been shown to affect lipid traits<sup>215</sup> and response to statin treatment<sup>216</sup> in FH subjects of French Canadian descent. Last year, in a population of elderly French Canadians not affected by FH, the effects of rs3846662 on cognitive impairment have also been shown to be modulated by gender and *APOE* ε4 allele (*APOE4*) presence<sup>217</sup>. Our study thus sought to explore, in FH subjects of French Canadian descent, the effects of rs3846662 and *HMGCR* alternative splicing on lipids levels and statin efficacy with respect to gender and *APOE4* presence.

### **4.3.4 Methods**

#### ***4.3.4.1 Patient's demographics, data collection and statistical procedure***

106 patients were selected from the nutrition, metabolism and atherosclerosis clinic of the Clinical Research Institute of Montreal. All subjects were diagnosed with heterozygous FH based on the presence of levels of LDL-C > 95<sup>th</sup> percentile for age and gender norms, a family history of hypercholesterolemia and the presence of one allele bearing the >15kb-deletion of the promoter and first exon of the *LDLR* gene. Patients were considered for inclusion in the study regardless of the nature or dose of statin currently administered, and most of them received statin with other lipid-lowering therapy (e.g., ezetimibe, bile acid sequestrants, niacin). Height, weight and body mass index (BMI) were recorded following a standardized protocol. All procedures were approved by the institutional ethics committee and all patients signed an informed consent form for medical record consultation as well as plasma and DNA analysis for dyslipidemia-related research.

#### ***a) Baseline lipid levels study***

Medical records were sought to determine baseline lipid profiles. These 12h-fasting plasma lipid concentrations were measured before any hypolipidemic drug treatment and after introduction of the American Heart Association phase II diet for at least 4 weeks. These data were available for 98 of the 106 patients initially screened (Table 4.3.1). Baseline lipid levels were normalized for age and sex by subtracting, from individual value, the 50<sup>th</sup> percentile lipid value obtained for normal Canadians in the same sex and age group. These reference percentiles were taken from the “Canadian Health measures survey: cycle 1 data Tables (2007 to 2009)” of Statistic Canada. The effect of rs3846662 on the normalized data, namely  $\Delta$  total cholesterol (TC) and  $\Delta$  LDL-C levels, were then analyzed by means of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U-tests since the values didn't follow a normal distribution. To account for its possible effect on baseline lipid levels, data were split by *APOE4* allele status (0, subjects without an *APOE4* allele; 1, subjects with at least one *APOE4* allele).

**b) Efficacy study**

In order to determine the patient's response to statin therapy, 12h-fasting plasma lipid concentrations were measured after a hypolipidemic treatment of at least four weeks. We again used medical records to retrieve the 12h-fasting plasma lipid concentrations initially obtained after at least four weeks of statin monotherapy. These data were available for 85 of the 98 patients (Table 4.3.1) and among them, 50 received atorvastatin, 16 rosuvastatin, 12 simvastatin, 5 lovastatin and 2 pravastatin. Patients were instructed to maintain their cholesterol-lowering diet and their lipid-lowering therapy throughout the study and were seen at 4 weeks intervals. Patient compliance (or adherence to treatment) was monitored by the medical team through specific questionnaire. Only subjects with good compliance (>80%) were included in the study. The patient's response to statin therapy was evaluated by comparing the observed decrease in LDL-C following therapy with the expected LDL-C reduction, at the appropriate dose, stated in the statin monographs. Results are expressed as percent efficacy of statin treatment and percent reduction in LDL-C, and calculations were as follow:

$$\textit{efficacy of statin treatment} (\%) = 100 \times \left[ \frac{\text{observed reduction in LDLC}}{\text{expected reduction in LDLC}} \right]$$

$$\textit{LDLC reduction} (\%) = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\text{LDLC after 4 weeks of treatment}}{\text{LDLC before treatment}} \right) \right]$$

The effects of rs3846662 on statin efficacy were analyzed by means of univariate analysis of variance models which included sex and *APOE4* allele status as cofactors, and age, BMI and baseline LDL-C levels as covariates. The partial eta squared was use to estimate the percent of variance in statin efficacy explained by the different variables.



**Table 4.3.1: Characteristics of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia due to the >15kb deletion of the *LDLR*.**

	<b>Baseline lipid levels study</b>		<b>Efficacy study</b>		<b>RNA levels study</b>	
	<b>APOE4=0 N = 59</b>	<b>APOE4=1 N = 40</b>	<b>Male N = 48</b>	<b>Female N = 37</b>	<b>Male N = 22</b>	<b>Female N = 15</b>
<b><i>Age at measurement</i></b>						
Mean ± SD, y	43.7 ± 11.7	41.5 ± 10.6	45.5 ± 9.9	45.8 ± 12.7	61.6 ± 8.8	53.2 ± 14.2
<b><i>BMI</i></b>						
Mean ± SD, kg/m <sup>2</sup>	26.1 ± 4.3	25.4 ± 3.8	26.4 ± 3.8	25.8 ± 4.2	28.9 ± 5.1	28.4 ± 5.2
<b><i>Sex</i></b>						
No. (%) female	23 (40)	21 (53)	-	-	-	-
<b><i>Total cholesterol</i></b>						
Baseline (Mean ± SD, mmol/L)	9.84 ± 1.34	9.57 ± 1.50	9.76 ± 1.29	9.67 ± 1.64	9.91 ± 1.20	9.65 ± 1.29
On statin (Mean ± SD, mmol/L)	-	-	6.13 ± 1.22	6.09 ± 1.08	5.31 ± 1.81	6.12 ± 1.81
<b><i>LDL-C</i></b>						
Baseline (Mean ± SD, mmol/L)	7.76 ± 1.28	7.62 ± 1.33	7.83 ± 1.17	7.58 ± 1.48	7.99 ± 1.12	7.58 ± 1.10
On statin (Mean ± SD, mmol/L)	-	-	4.45 ± 1.08	4.24 ± 0.93	3.50 ± 1.63	4.00 ± 1.59
<b><i>TG</i></b>						
Baseline (Mean ± SD, mmol/L)	1.88 ± 0.75	1.52 ± 0.65	1.82 ± 0.76	1.60 ± 0.75	1.82 ± 0.69	1.55 ± 0.91
On statin (Mean ± SD, mmol/L)	-	-	1.27 ± 0.65	1.22 ± 0.56	1.27 ± 0.55	1.29 ± 0.78
<b><i>HDL-C</i></b>						
Baseline (Mean ± SD, mmol/L)	1.13 ± 0.34	1.18 ± 0.37	1.04 ± 0.28	1.29 ± 0.38	1.01 ± 0.32	1.30 ± 0.38
On statin (Mean ± SD, mmol/L)	-	-	1.10 ± 0.25	1.30 ± 0.32	1.23 ± 0.34	1.50 ± 0.40
<b><i>APOE4 allele</i></b>						
frequency	-	-	0.21	0.23	0.17	0.18
<b><i>HMGCR A allele</i></b>						
frequency	0.60	0.60	0.63	0.66	0.48	0.50

Abbreviations: APOE4: apolipoprotein ε4, BMI: body mass index, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, LDLR: low-density lipoprotein receptor, N/No.: number, SD: standard deviation, TG: triglyceride, y: year.

### ***c) RNA levels study***

In order to measure the patient's *HMGCR* mRNA levels, a fresh blood sample was collected in a PAXgene tube after an overnight fast of at least 12h. These blood samples were collected in 45 of the 85 patients for which the efficacy of statin treatment had been previously determined (Table 4.3.1). The low participation rate (53%) could be attributed to the project being conducted during the summer vacation period. Of the 45 samples collected, 3 could not be used given poor RNA extraction. Results are presented as *HMGCR* mRNA levels and *HMGCR* mRNA ratios, the latter being calculated as the mRNA levels of the FL or  $\Delta 13$  *HMGCR* variant divided by the total mRNA levels of *HMGCR* (any *HMGCR* transcripts containing exon boundary 6/7). While the FL,  $\Delta 13$  or total *HMGCR* mRNA levels reflect the numbers of each mRNA transcripts in a given tissue, the mRNA ratios assess the effects of splicing independently of the effects on overall transcription. The effects of rs3846662 on *HMGCR* mRNA levels or *HMGCR* mRNA ratios were analyzed by means of univariate analysis of variance models which included sex and *APOE4* allele status as cofactors, and age and BMI as covariates. The partial eta squared was used to estimate the percent of variance in RNA levels explained by the different variables. Importantly, for safety and ethical reasons, the patients, who were all taking statin with other lipid-lowering therapy (mostly ezetimibe), continued their medication at the time of the blood draw. Therefore, variations in the *HMGCR* mRNA levels cannot be attributed solely to statin use. Finally, the correlation between *HMGCR* mRNA levels and the efficacy of statin treatment was analyzed by means of Pearson correlation.

#### ***4.3.4.2 Determination of plasma lipid concentrations***

Blood from subjects was drawn under vacuum into EDTA-Vacutainer tubes (VWR international, QC, Canada) after an overnight fast of at least 12h and kept on ice until separation. Following separation by centrifugation (15 min, 3000 rpm, 4 °C), plasma was kept on ice and sent to the laboratory for analysis within 24h, whereas white blood cells were kept at -80°C until needed. TC, high-density-lipoprotein- cholesterol (HDL-C) and triglyceride concentrations were quantified as previously reported<sup>218</sup>.

#### ***4.3.4.3 Determination of LDLR, APOE and HMGCR genotype***

DNA was extracted from white blood cells using an automated 340A DNA extractor (Applied Biosystems, CA, USA) or a QIAmp Blood Maxi Kit (Qiagen, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. In a few cases, DNA was extracted using the Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) on a Maxwell® 16 LEV Instrument (Promega, WI, USA). The presence of the >15kb-deletion of the promoter and first exon of the *LDLR* gene was assessed by southern blotting as previously described<sup>219</sup> or by Sanger sequencing using standard laboratory procedure on a ABI 3130xl Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). Genotype profiling of rs3846662 of the *HMGCR* gene was performed with PCR followed by pyrosequencing as previously described<sup>217</sup>. *APOE* allele determination was also performed by PCR followed by pyrosequencing using established protocols<sup>178</sup>.

#### ***4.3.4.4 Determination of HMGCR mRNA levels***

Blood from subjects was drawn under vacuum into PAXgene® Blood RNA tubes (VWR international, QC, Canada) after an overnight fast of at least 12h. RNA was extracted using the Maxwell® 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit (Promega, WI, USA) on a Maxwell® 16 LEV Instrument (Promega, WI, USA). The purity and integrity of RNA was estimated using, respectively, the ratio of absorbance values at 260 nm and 280 nm evaluated on a Biotek Synergy H1 reader (Fisher Scientific, ON, Canada), and the RNA integrity number (RIN) determined with a Bio-Rad's Experion instrument (Bio-Rad, CA, USA). The ratios of absorbance were all over 2, while RINs ranged from 6.2 to 10, with 70% of samples over 8. Then, cDNA was obtained by reverse transcription on a Multigene thermocycler (Labnet International Inc.) using the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, CA, USA). The thermocycler was set as follows: 10 min at 25 °C, 80 min at 37 °C and 5 min at 85 °C. Finally, 10ng of each cDNA were applied in triplicate for real-time PCR performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). The following TaqMan® Gene Expression Assays Kits were used: total *HMGCR*, Taqman assay #Hs00168352\_m1 covering exon boundary 6/7; FL *HMGCR* variant, custom assay covering exon boundary 13/14 with forward primer: TGTGGCCAGCACCAATAGAG, reverse primer: CAACTGGGCCACGAGTCAT and probe: CAGAGCAATAGGTCTTGGT;  $\Delta 13$  *HMGCR*

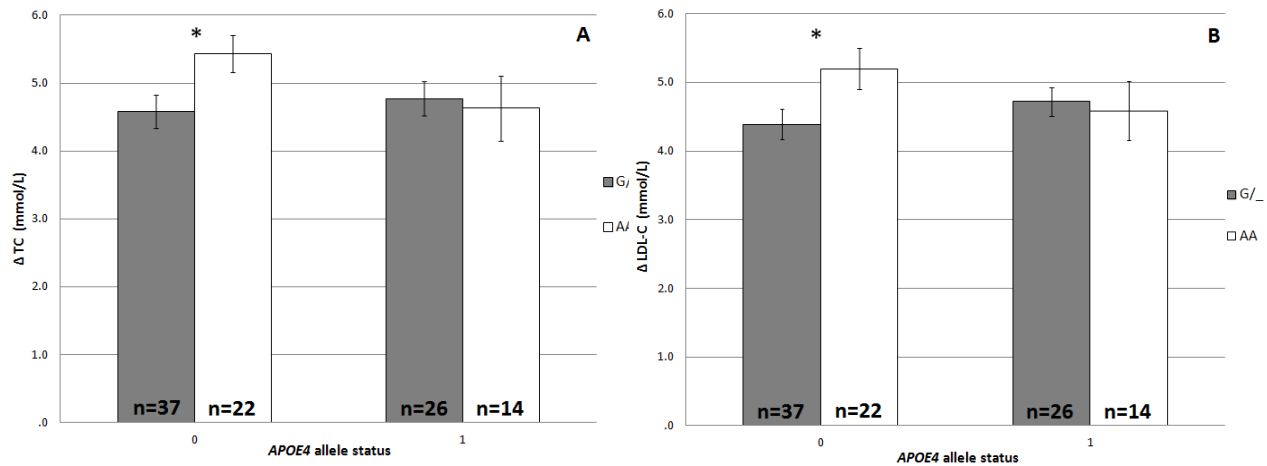
variant, custom assay covering exon boundary 12/14 with forward primer: TCAGAACCTTCTTCTCTCCAGTACCT, reverse primer: CACCTCCACCAAGCAAGGA, probe: CCTTACAGGGATTATAATTA; *peptidylprolyl isomerase A* (PPIA), Taqman assay # Hs99999904\_m1; *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1), Taqman assay # Hs99999909\_m1; beta actin (ACTB), Taqman assay # Hs99999903\_m1 and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), Taqman assay # Hs99999905\_m1. The cycling conditions were 20 sec at 95 °C, 40 cycles of 3 sec at 95 °C and 30 sec at 60 °C. The relative gene expression of *HMGR* was determined using the comparative Ct method ( $\Delta\Delta C_t$  method, Applied Biosystems User Bull. #2 Dec. 97). The efficiency of each gene expression assay kit was assessed and corrected accordingly in the equation used to calculate the relative quantities of mRNA<sup>173</sup>. A random sample that was repeated on each qPCR plate was chosen as calibrator. Selection of the most appropriate endogenous reference gene was performed as previously described<sup>220</sup> on all RNA available, and the geometric mean of *PPIA*, *HPRT1* and *GAPDH* was used as endogenous reference genes.

### **4.3.5 Results**

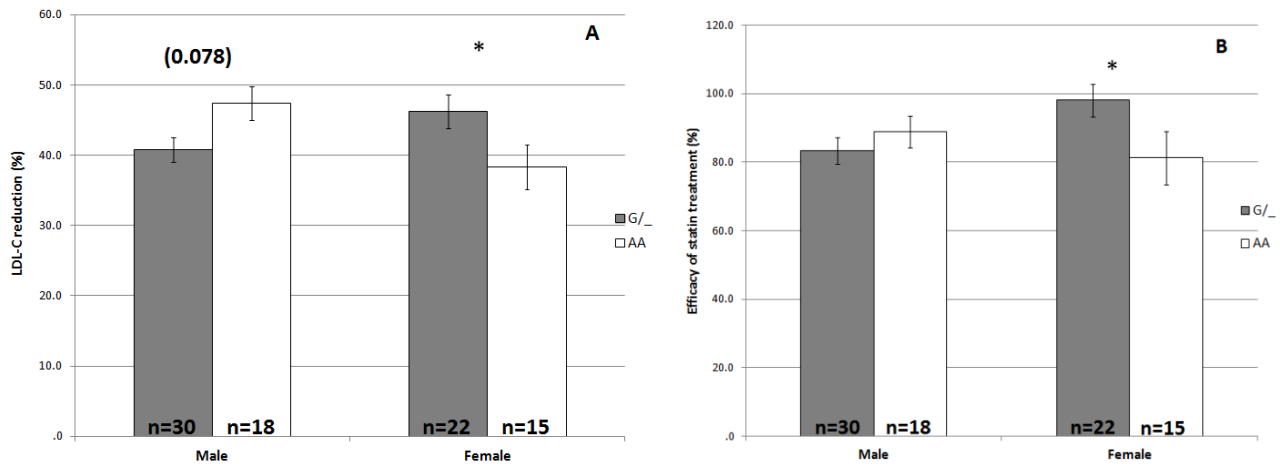
The demographic characteristics of the studied cohort are available in Table 4.3.1.

#### **4.3.5.1 Baseline lipid levels study**

Medication-free FH subjects carrying the AA genotype had higher levels of TC and LDL-C at baseline (4.58 vs 5.43mmol/L for TC, and 4.39 vs 5.20mmol/L for LDL-C,  $P < 0.05$ , Figure 4.3.1). Yet, in individuals with an *APOE4* allele, the effects of the AA genotype at locus rs3846662 were blunted. HDL-C and triglycerides levels remained unchanged by the allele status at rs3846662 (results not shown).



**Figure 4.3.1: Baseline lipid levels of  $\Delta$  TC (A) and  $\Delta$  LDL-C (B) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) according to rs3846662 genotype and the presence of the *APOE4* allele.** The  $\Delta$  values were obtained by subtracting, from the individual lipid value, the estimate 50<sup>th</sup> percentile lipid value observed in a group of normal Canadians of the same age and sex. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ .  $P$  values are for Mann-Whitney U-tests.



**Figure 4.3.2: LDL-C reduction relative to baseline upon statin treatment (A) and efficacy of statin treatment at reducing LDL-C (B) in patients with FH ( $\Delta$ 15kb) according to rs3846662 genotype and gender status.** Calculations were performed as follow: % efficacy = [(observed reduction in LDL-C/expected reduction in LDL-C) \* 100]; % reduction LDL-C = 100 - [(LDL-C after at least 30days of treatment/LDL-C before treatment) \* 100]. The expected reductions in LDL-C were obtained from each statin monograph. Bars represent mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , (0.05 >  $P$  value < 0.1).  $P$  values are for multiple regression models including age, BMI, sex, *APOE4* allele status and baseline LDL-C levels.

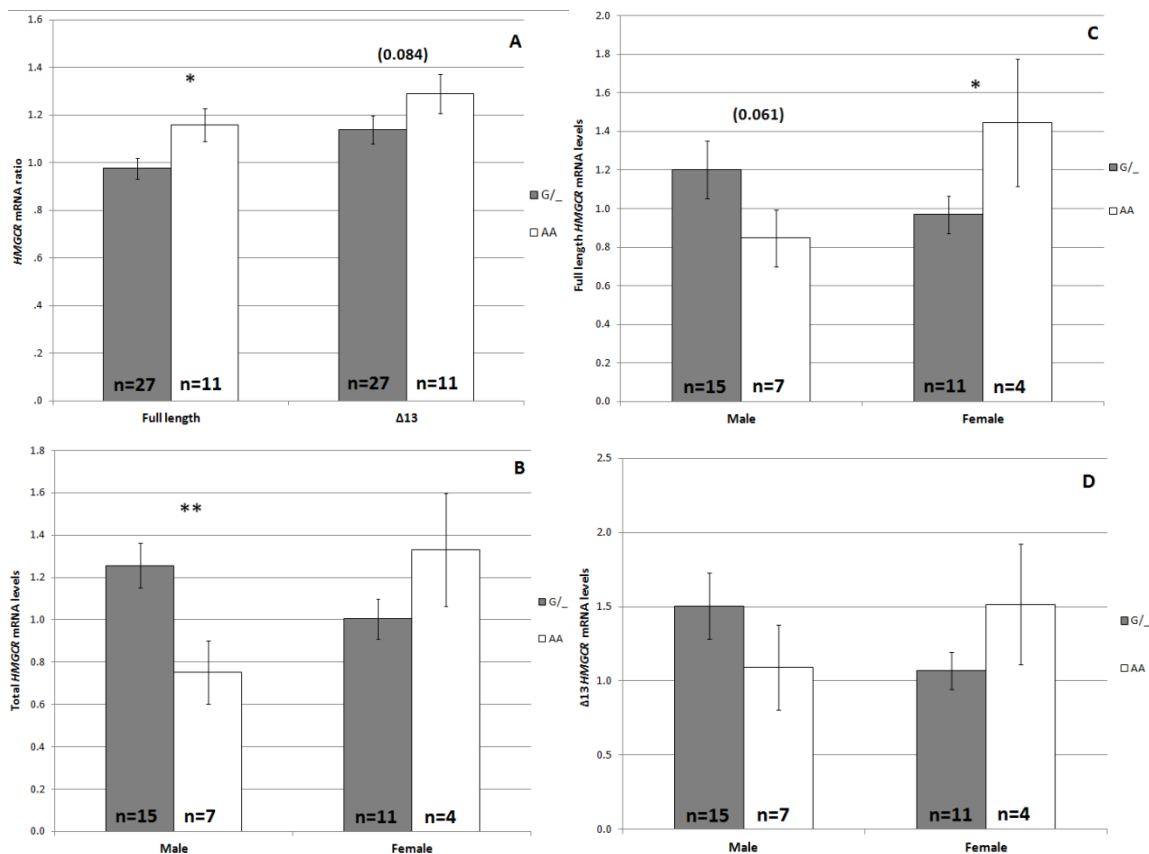
#### 4.3.5.2 Efficacy study

As previously reported in a FH population similar to ours<sup>214, 221</sup>, the penetrance function is sex-dependent for both the percent in LDL-C reduction (interaction genotype\*gender,  $P = 0.008$ ) and the efficacy of statin treatment (interaction genotype\*gender,  $P = 0.029$ ). Indeed, we observed that the percent in LDL-C reduction upon statin treatment and the efficacy of statin treatment are significantly decreased in women with the AA genotype compared to women without it (38.4% vs 46.2% for LDL-C reduction, and 81.3% vs 98% for efficacy of statin treatment,  $P < 0.05$ , Figure 4.3.2), whereas the exact opposite tendency can be observed in men ( $P = 0.078$ , Figure 4.3.2A). Women with the AA genotype thus have a lesser response to statin therapy, whereas we observed no effect in men bearing the AA genotype (Figure 4.3.2B). According to our regression model, the percent of variance in LDL-C reduction and efficacy of statin treatment explained by the interaction sex/AA genotype is 9% and 6%, respectively.

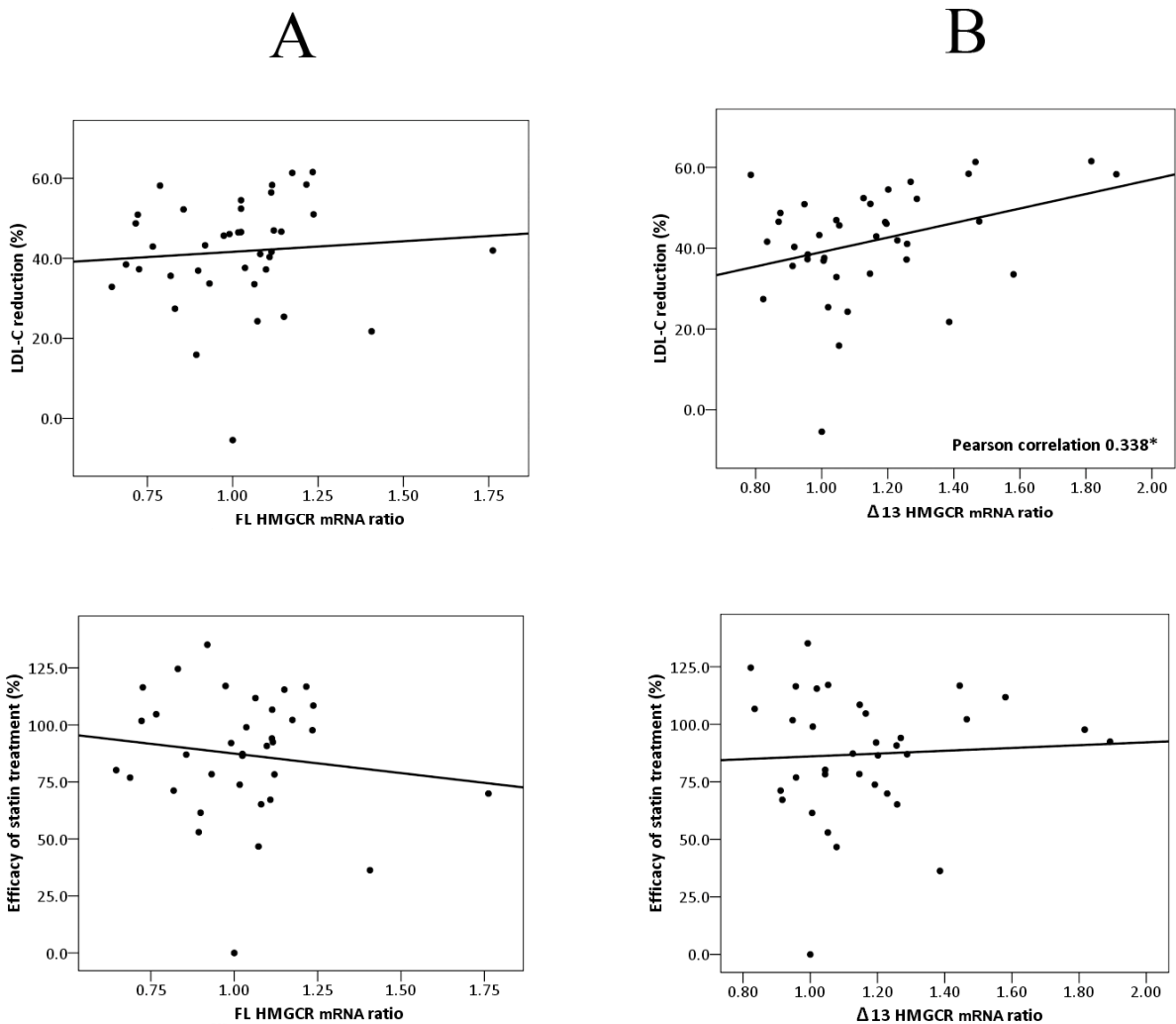
#### 4.3.5.3 RNA levels study

Finally, we sought to determine whether the genotype at rs3846662 was associated with changes in the *HMGCR* mRNA levels. Unfortunately, these mRNA levels could not be determined at baseline, but they were efficiently quantified by qPCR using the Taqman chemistry in FH individuals receiving statin combined with other lipid-lowering therapy (mostly ezetimibe). Our results indicate that the FL *HMGCR* mRNA ratio is significantly increased in subjects with the AA genotype (1.0 vs 1.2,  $P < 0.05$ , Figure 4.3.3A), whereas only a non significant trend is observed for the  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio ( $P = 0.084$ ). According to our regression model, the percent of variance in FL *HMGCR* mRNA ratio explained by the AA genotype is 14%. While no sex-dependent effects were observed on these ratio values, one was evident on *HMGCR* overall transcription (interaction genotype\*gender for total *HMGCR*,  $P = 0.007$ ; interaction genotype\*gender for FL *HMGCR*,  $P = 0.040$ ). Indeed, *HMGCR* mRNA levels (Figure 4.3.3B, C, D) are increased in women with the AA genotype (significant only for FL *HMGCR* levels, 0.968 vs 1.446,  $P < 0.05$ , Figure 4.3.3C), whereas the exact opposite is observed in men with the AA genotype (significant only for total *HMGCR* levels, 0.753 vs 1.256,  $P < 0.05$ , Figure 4.3.3B). According to our regression models, the percent of variance in total *HMGCR* and FL *HMGCR* mRNA levels explained by the interaction sex/AA genotype

is 24% and 15%, respectively. Although measured at two different points in time, *HMGCRC* mRNA levels and the efficacy of statin treatment were correlated (Figure 4.3.4). Interestingly, an increase in the percent in LDL-C reduction was correlated with an increase in  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA ratio, irrespective of sex. When the ratios of  $\Delta 13$  and FL *HMGCRC* mRNA are included in our regression models, the percent of variance in LDL-C reduction and efficacy of statin treatment explained by the  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA ratio is 55% ( $P < 0.001$ ) and 22% ( $P = 0.043$ ), respectively.



**Figure 4.3.3: Ratios of full length *HMGCRC* mRNA (A, left) and  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA (A, right) in patients with FH ( $\Delta 15\text{kb}$ ) treated with statin according to rs3846662 genotype. mRNA levels of total *HMGCRC* (B), full-length *HMGCRC* variant (C) and  $\Delta 13$  *HMGCRC* variant (D) in patients with FH ( $\Delta 15\text{kb}$ ) treated with statin according to rs3846662 genotype and gender status.** Bars represent mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , ( $0.05 > P$  value  $< 0.1$ ).  $P$  values are for multiple regression models including age, BMI, sex and *APOE4* allele status.



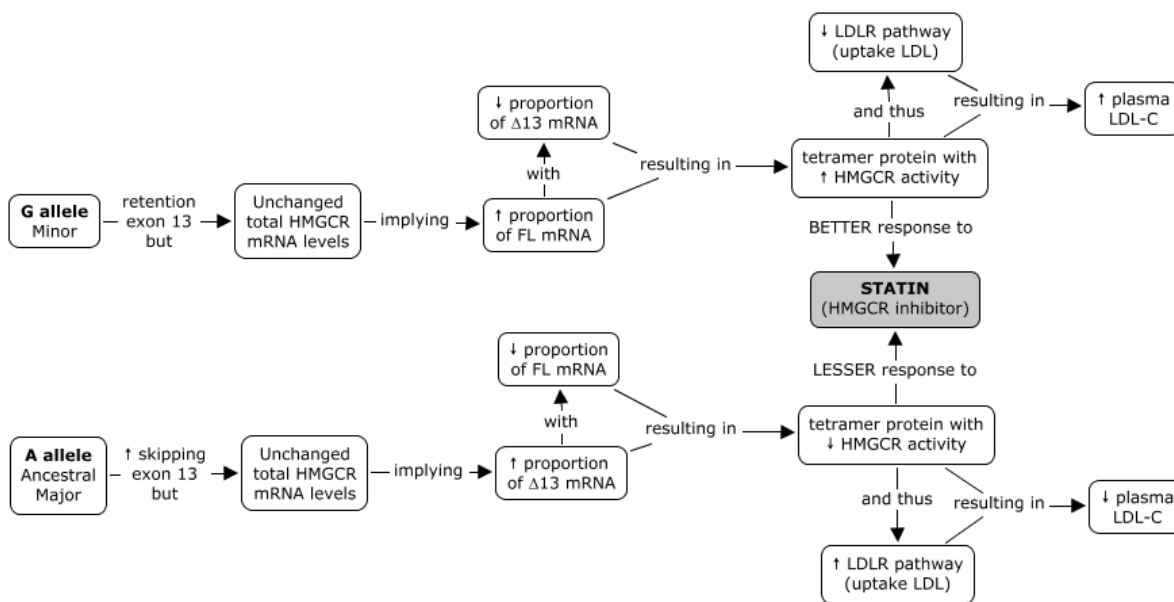
**Figure 4.3.4: Associations of full length *HMGCR* mRNA ratio (panel A) and  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio (panel B) with LDL-C reduction relative to baseline (upper graphs) and efficacy of statin treatment at reducing LDL-C (lower graphs) in patients with FH ( $\Delta 15$ kb) treated with statin.** \*  $P < 0.05$ .  $P$  value is for Pearson correlation.

### **4.3.6 Discussion and conclusion**

Current knowledge suggests that response to statin treatment and baseline LDL-C levels of normal, healthy individuals are at their lowest when an A allele is present at locus rs3846662. Indeed, the increased skipping of exon 13 associated with the A allele likely



results in lower HMGCR activity. The smaller the HMGCR activity levels, the smaller the treatment response and the larger the uptake of LDL particles via the LDLR pathway are expected (Figure 4.3.5). However, the LDLR pathway being 50% defective in heterozygous FH subjects, we expected this equipoise to be disrupted.



**Figure 4.3.5: Expected impact of A or G allele at locus rs3846662 of HMGCR gene on baseline lipid levels in normal individuals.** This model was based on the *in vitro* findings

reported in <sup>7, 30, 32, 33, 194</sup>. While it is still unclear whether the  $\Delta 13$  mRNA transcript is translated *in vivo* into proteins, it doesn't change its expected result on overall HMGCR activity. If the  $\Delta 13$  mRNA transcript is not translated into proteins, the decrease in HMGCR activity and sensitivity to statin associated with the A allele would likely results from lower levels of functional HMGCR proteins due to lower levels of FL mRNA transcripts. On the other hand, because the catalytically active HMGCR is found as a tetramer, the translation of the  $\Delta 13$  mRNA into inactive monomer proteins may lead to the formation of heterotetramers of reduced enzymatic activity and sensitivity to statin <sup>32</sup>.

The present study highlighted three particular findings. First, contrary to what is generally observed in normal populations, our results show that *APOE4* does not contribute to variations in plasma baseline lipid concentrations (Figure 4.3.1). This finding is, however, in accordance with several other studies of untreated FH patients <sup>216, 222-224</sup>. The higher LDL-C levels seen in normal populations carrying an *APOE4* is not completely understood, but it may

result in part from the higher affinity of *APOE4* for the LDLR<sup>225, 226</sup>. This higher affinity is believed to promote an increase hepatic uptake of VLDL and IDL remnants, resulting in a downregulation of LDLR activity and consequently, increased LDL-C levels<sup>227, 228</sup>. As hypothesized by O'Malley and Illingworth, the LDLR in FH patients may be already repressed to a degree that is not further affected by the *APOE4* allele<sup>216, 222</sup>. That being said, cholesterol requirements of hepatocytes are met by two independent yet interrelated processes: internalization of lipoproteins and *de novo* cholesterol synthesis. Given the disruption of the LDLR pathway in FH, we were expecting variations within *HMGCR* to have a considerable impact on baseline lipid levels. Our results indicate that the baseline LDL-C levels of FH individuals born without an *APOE4* allele show an inverse pattern to what was expected from normal individuals (Figure 4.3.5): FH subjects with the AA genotype have higher levels of TC and LDL-C at baseline. In normal individuals, the lower LDL-C levels associated with the AA carriers are believed to result from their lower HMGCR activity that prompts an increase uptake of LDL particles by the LDLR pathway (Figure 4.3.5). In FH, the loss of one functional allele of the *LDLR* gene prevents the LDLR pathway, on which AA carriers rely on to efficiently clear LDL-C particles from plasma, to exert its beneficial effect. Because the levels of *LDLR* and *HMGCR* transcripts were not quantified in our baseline lipids levels study, the reason for increased LDL-C levels in FH carriers of the AA genotype remains unclear. Perhaps the lower HMGCR activity combined with the lower LDLR activity that are expected to occur in FH-AA carriers prompt the hepatocytes to increase their HMGCR synthesis pathway. In accordance with this hypothesis, the “hypercholesterolemic” effect of the AA genotype is lost in FH individuals carrying both the AA genotype and an *APOE4* allele, a blunting effect which might be attributed to the fact that individuals carrying an *APOE4* allele absorbed more and synthesized less cholesterol<sup>229-231</sup>.

Second, the percent in LDL-C reduction upon statin treatment and the efficacy of statin treatment are significantly decreased in women with the AA genotype compared to women without it, whereas the exact opposite tendency can be observed in men with the AA genotype (although not significantly). Women carrying the AA genotype thus responded similarly to normal individuals (Figure 4.3.5), but men did not. Interestingly however, both men and women bearing the AA genotype showed higher ratio of FL *HMGCR* mRNA compare to

subjects without it (Figure 4.3.3A). Hence, since carrying an AA genotype resulted in decreased response to statin only in women, the effects of rs3846662 on splicing cannot explain the differences observed between men and women. We thus looked at a possible effect of rs3846662 on overall transcription (Figure 4.3.3 B, C, D). We found that in addition to having a higher ratio of FL *HMGCR* mRNA, women receiving treatment and bearing the AA genotype also showed higher FL *HMGCR* mRNA levels compare to women without it. Hence, the *HMGCR* synthesis pathway appears to be somehow more activated in women carrying the AA genotype compare to women without it, which could explain their lesser response to statin. Once again, the opposite is observed in men. Despite these observations, Pearson correlation analyses suggest that, for both men and women, the percent in LDL-C reduction upon statin treatment correlated better with the increase in  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio rather than with the decrease in FL *HMGCR* mRNA ratio. While the *in vitro* findings reported thus far in the literature have correctly put emphasis on the ratios of *HMGCR* fold changes, our *in vivo* study highlights the importance of also reporting *HMGCR* mRNA levels.

The abovementioned results raise two major questions. Firstly, because the A allele promotes skipping of exon 13 (Figure 4.3.5), we were expecting lower ratio and mRNA levels of FL *HMGCR* and higher ratio and mRNA levels of  $\Delta 13$  *HMGCR* to result in a lower response to statin treatment in carriers of the AA genotype. Rather, it appears as though the ratio and mRNA levels of *HMGCR* are just a mere reflection of the suboptimal statin response observed in women carrying the AA genotype. Thus, our results suggest that the effects mediated by the AA genotype on statin efficacy may not be related to its impact on *HMGCR* alternative splicing, at least in FH. Indeed, cholesterol levels are dependent upon the interaction of a plethora of genes (*HMGCR*, *LDLR*, *PCSK9*, etc.), and epistasis between those genes may be responsible for the association between AA and suboptimal statin response in FH women. Interestingly, evidences for epistasis for rs3846662 have previously been demonstrated: rs3846662 interact with one locus in hepatic lipase (*LIPC*) to modulate HDL-C levels<sup>232</sup>, and rs3846662 modulates AD risk in women only<sup>217</sup>, a finding suggesting an epistatic interaction between *HMGCR* and genotype defined by the X and Y chromosomes<sup>233</sup>. Lastly, the penetrance function of the AA genotype appears sex-dependent in FH subjects. Even though other genotype sex-dependent differences have been reported previously in FH

subjects<sup>214, 221</sup>, our gender difference remains unclear at the moment. Additional studies are required to clarify this issue. However, our gender difference was not unexpected given the fact that the liver is the target organ of statins, and liver metabolism has been shown to be markedly sex-dimorphic<sup>234</sup>. An efficient first-pass uptake by the liver may be more important than an high bioavailability to achieve the statin effect<sup>235</sup>. Thus, gender differences in liver size<sup>236</sup> and metabolism may very well translate into gender differences in statin response, especially for those treated with pro-drugs such as simvastatin.

Third, as was previously reported by others<sup>32, 33</sup>, the variance in statin response is better explained by *HMGCR* alternative splicing rather than by *HMGCR* genotype, especially in FH subjects. Indeed, the percent of variance in LDL-C reduction and efficacy of statin treatment explained by the ratio of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA could be as high as 55% and 22%, respectively.

However, several aspects of our study warrant caution, mostly for the third arm of the study (mRNA levels study). First, the power of the overall study was not as high as initially planned given lower than expected data retrieval. Given our small sample sizes, our study could only detect reliably large population effects. For example, given an alpha of 0.05 and N=58 (representative of the number of subjects in the *APOE4* negative subgroup), we had a power of 0.50 given an effect size of 0.54, and a power of 0.80 given an effect size of 0.77. This situation increases the likelihood of type 2 errors (failing to obtain a statistical significance when there is a real effect) and the chance of having a large effect size when statistical significance is found<sup>237</sup>. In addition, given our small sample sizes, we performed no type 1 errors (obtaining a statistical significance when there is no real effect) correction for multiple testing. Therefore, our findings should be considered as exploratory until they can be cross-validated on an independent study. Second, because the mRNA levels study did not involve an adjuvant monotherapy arm, we could not evaluate individual ensuing responses to the addition of adjuvant (mostly ezetimibe) on ongoing statin therapy. Thus, for most patients, the result reflects combine therapy (statin/ezetimibe). While a review of the literature has revealed no studies suggesting that ezetimibe modifies *HMGCR* mRNA levels, this confounder might still overestimate the percent of variance in *HMGCR* mRNA levels and

statin efficacy explained by the rs3846662 genotype or *HMGCR* mRNA levels. In addition, the purpose of the current study was to investigate the impact of rs3846662 genotype on statin efficacy, no matter which statin was used. While statins are widely different in their chemical structure, metabolism, pharmacological properties and clinical efficacy, they all block cholesterol synthesis by inhibiting HMGCR<sup>238</sup>. Thus, studies performed with one specific statin should yield results similar to ours. Third, we compared the current *HMGCR* mRNA levels of subjects with their past response to statin treatment. In our context, only this procedure allowed an ethical comparison of the *HMGCR* mRNA levels with the efficacy of statin monotherapy. However, since the extent of inter-individual variations seems to be largely independent of the dose and drug used<sup>239</sup>, two parameters that were modified over the course of years in most of these subjects, we believe that comparison of their current *HMGCR* mRNA levels with their past response to statin therapy is worth investigating.

In conclusion, the genotype at rs3846662 locus contributes to the variability of baseline TC and LDL-C levels observed among FH individuals carrying the same *LDLR* mutation. The rs3846662 SNP also explains part of the variance observed in statin response, although *HMGCR* alternative splicing constitutes a better predictor. As reported previously, the rs3846662 SNP appears involved in regulation of *HMGCR* exon 13 skipping, but the penetrance function of the AA genotype appears sex-dependent in FH subjects. Therefore, the genotype at rs3846662 locus or *HMGCR* splicing cannot alone predict a patient response to statin therapy, even in a genetically homogenous population such as the French Canadians FH individuals bearing the >15kb deletion of the *LDLR*.

#### **4.3.7 Acknowledgments**

The authors would like to thank Mrs Martine Gauthier, Hélène L'archevêque and Jocelyne Fouquette for invaluable assistance in contacting patients and collecting blood samples.

## **4.4 Effects of rs3846662 variants on *HMGCR* mRNA and protein levels and on markers of Alzheimer's disease pathology**

### **4.4.1 Avant-propos**

Mise à part l'étude publiée par l'équipe de Steven Estus<sup>40</sup>, aucune équipe ne s'est intéressée à l'impact du polymorphisme rs3846662 sur les niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* dans le SNC. De plus, aucune étude n'a été publiée quant aux associations potentielles entre les différents marqueurs de la MA et les niveaux d'ARNm ou de protéines HMGCR. C'est précisément cette lacune que cette étude vise à combler. De surcroît, plusieurs études rétrospectives suggèrent que la prise de médicaments statines durant l'âge mûr diminue les risques de développement de la MA<sup>116-119</sup> et diminue la pathologie neurofibrillaire<sup>122, 123</sup>. Un mystère demeure toutefois : ces effets bénéfiques sont-ils véhiculés par une action de l'*HMGCR* sur le système vasculaire (indirect) ou le SNC (direct) ? Il nous apparaît donc primordial d'investiguer si cette protection contre la MA pourrait être intimement liée aux niveaux d'ARNm/protéines de l'*HMGCR* dans le SNC.

### **4.4.2 Authors, abstract, keywords and conflict of interest**

**Authors:** Valerie Leduc, MSc<sup>1,3</sup>; Louise Théroux, BSc<sup>1</sup>; Doris Dea, MSc<sup>1</sup>; Robert Dufour, MD/MSc<sup>3</sup> and Judes Poirier, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Douglas Mental Health University Institute, McGill University

<sup>2</sup>Centre for Studies in the Prevention of Alzheimer's disease, McGill University

<sup>3</sup>Institut de recherches cliniques de Montréal, Department of Nutrition, Université de Montréal

**Abstract:** Since rs3846662 may be involved in regulation of *HMGCR* alternative splicing, we explored its impact on HMGCR mRNA and protein levels in the brain, and the associations between those levels and levels of Alzheimer's disease pathological markers. We used brain samples derived from a cohort of 33 non-demented controls and 90 Alzheimer's disease autopsied-confirmed cases. HMGCR mRNA levels were determined in the frontal cortex (n=114) and cerebellum (n=110) using Taqman-qPCR, and HMGCR protein levels

were determined in the frontal cortex (n=117) using a commercial enzyme immunoassay from MyBioSource. While densities of neurofibrillary tangles and senile plaques were determined in the frontal cortex (n=74), total tau, phosphorylated Tau and beta-amyloid 1-42 levels were determined in the frontal cortex (n=94) and cerebellum (n=91) using commercial enzyme immunoassays from Innotech. Despite an increase in full-length HMGCR mRNA ratio in the frontal cortex in women carrying the AA genotype, there were no associations between rs3846662 and HMGCR mRNA or protein levels. An increased  $\Delta 13$  HMGCR mRNA ratio was associated with increased levels of HMGCR proteins and neurofibrillary tangles in the frontal cortex, but with reduced beta-amyloid 1-42 levels in the cerebellum, suggesting a brain cell type- or, more likely, a disease progression-dependent association.

**Keywords:** Alzheimer's disease; HMGCR; rs3846662; alternative splicing; Tau proteins; beta-amyloid

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **4.4.3 Introduction**

Recent evidences suggest that 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), the enzyme regulating the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis, might act as a genetic modifier for risk, age at onset and mild cognitive impairment (MCI) conversion to Alzheimer's disease (AD)<sup>217</sup>. More specifically, carrying a double dose of A allele at locus rs3846662 (AA or G- genotype) was shown to be strongly protective against the onset and risk of AD, especially in women, and to decrease MCI conversion to AD and neurofibrillary tangles (NFT) / senile plaques (SP) accumulation in subjects also carrying the apolipoprotein  $\epsilon 4$  risk allele (*APOE4+*)<sup>217</sup> (see for a review<sup>56</sup>).

The reason for the importance of this rs3846662 single nucleotide polymorphism (SNP) may lie with its involvement in regulation of *HMGCR* alternative splicing. Indeed, *HMGCR* mRNA exists in two prominent forms, full-length (FL) *HMGCR* and  $\Delta 13$  *HMGCR*<sup>28</sup>, the latter possibly resulting in an HMGCR protein with lower or null activity<sup>30, 32</sup>. It

appears that rs3846662 is located in the binding motif of two splicing factors that are known to compete with each other to promote exon exclusion or retention<sup>7</sup>. While the rs3846662 G allele is compatible with both motifs, the A allele disrupts the binding motif of the splicing factor promoting retention and engenders the preferential binding of heterozygous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1) that promotes skipping of exon 13<sup>7</sup>. This finding is in accordance with previous reports showing that the A allele at locus rs3846662 is associated with increased proportion of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA *in vitro*<sup>30, 33, 40</sup>. While little is known about the effects of rs3846662 on *in vivo* cholesterol homeostasis in the brain, the A allele has been associated in the periphery with increased proportion of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA, *in vivo*, in human livers<sup>40</sup>; lower levels of LDL-C at baseline<sup>194, 208, 209</sup> and a lesser sensitivity and response to statin treatment, a drug inhibiting HMGCR protein<sup>32, 137, 141, 210</sup>. Since elevated plasma cholesterol levels<sup>191, 192</sup> and treatment of hypercholesterolemia with HMGCR inhibitors (statins) in middle-aged individuals<sup>116-119</sup> appears respectively detrimental and protective against late-life development of AD, it remains unclear whether rs3846662/HMGCR affects AD risk via peripheral effects on vasculature and/or direct effects on cholesterol homeostasis in the central nervous system (CNS). However, evidence obtained in humans in recent years clearly indicates that statin utilization causes a significant reduction of phosphorylated Tau (P-Tau) proteins in the CSF, but not of total Tau (T-Tau), beta amyloid 1-40 (A $\beta$ 40) or beta-amyloid 1-42 (A $\beta$ 42) proteins<sup>122</sup>. Furthermore, antecedent statin use in elderly subjects with normal cognitive functions leads, over the course of several years, to a marked reduction of NFT accumulation but not of SP density, at autopsy, when compared to nonusers<sup>123</sup>. Because these findings demonstrate an association between antecedent statin use and decrease P-Tau and NFT burden, we sought to examine whether lower HMGCR levels were associated with lower AD neuropathologic changes.

The current study aims to take the first steps towards exploring the impacts of rs3846662/HMGCR in the CNS affected by AD. Correlation analyses were undertaken to identify associations between HMGCR mRNA and protein levels, with brain levels of A $\beta$ 42, T-Tau, P-Tau, NFT and SP. Since analysis of the anterior cingulate cortex using SYBR Green chemistry could not substantiate an effect of rs3846662 on *HMGCR* alternative splicing in the autopsied brain<sup>40</sup>, we used the highly specific and sensitive TaqMan chemistry to analyze the



mRNA expression levels of the different *HMGCR* transcripts. Furthermore, as brain cell-type heterogeneity may obscure the effects of rs3846662<sup>40</sup>, we determine the *HMGCR* mRNA levels in the frontal cortex, a region where nonneuronal cells outnumber neuronal cells by a ratio of 3.8<sup>240</sup>, and in the cerebellum, a region where neuronal cells outnumber nonneuronal cells by a ratio of 5<sup>240</sup>.

#### **4.4.4 Material and Methods**

##### **4.4.4.1 Human Subjects Demographics**

This study conformed to the Code of Ethics of the World Medical Association and was approved by the Ethics Board of the Douglas Hospital Research Centre. Every participant, or his or her legal tutor, signed an informed consent statement. Patients' demographic characteristics are summarized in Table 4.4.1. Definite diagnosis of AD (n=90) was based on histopathological confirmation of AD according to NINCDS-ADRDA criteria<sup>167</sup>, whereas controls (n=33) had to be free of neurological or psychiatric diseases and of brain structural lesions (tangle and plaque indices reading < 20 /mm<sup>3</sup> and < 10 /mm<sup>2</sup>, respectively). All brain tissues were obtained from the Douglas – Bell Canada Brain Bank, Montreal, Canada. Age at death, percent of female, percent of French Canadian descendent, and frequency of *APOE4* allele are significantly different between controls and AD subjects. Except for the French Canadian status that was given for information purposes only, all other parameters were included as cofactors in the statistical analyses or accounted for by stratification (see statistical analysis section for more details).

##### **4.4.4.2 DNA extraction and genotyping**

DNA extraction and genotyping of *HMGCR* rs3846662 and *APOE4* allele were performed on brain tissues samples as previously described<sup>217</sup>, with DNeasy tissue Kit (Qiagen) and pyrosequencing protocols, respectively.

**Table 4.4.1 : Demographic characteristics of the studied cohort.**

	CTL N= 33	AD N=90
<b><i>Age at death*</i></b>		
mean $\pm$ SD, years	72.6 $\pm$ 12.0	78.0 $\pm$ 8.0
<b><i>Age at onset</i></b>		
mean $\pm$ SD, years	-	69.9 $\pm$ 9.2
<b><i>PMD</i></b>		
mean $\pm$ SD, hours	30.7 $\pm$ 21.9	24.1 $\pm$ 13.0
<b><i>French Canadian*</i></b>		
No. (%) French Canadian	23 (70)	79 (88)
<b><i>Sex**</i></b>		
No. (%) women	12 (36)	59 (66)
<b><i>Apolipoprotein E4 allele***</i></b>		
Frequency	0.12	0.37
<b><i>HMGCR A allele</i></b>		
Frequency	0.38	0.41

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; CTL, non-demented control; PMD, post-mortem delay; SD, standard deviation; No./N, number. Statistically significant difference between the CTL and AD groups according to t-test, \* P  $\leq$  0.05, \*\* P  $\leq$  0.01, \*\*\* P  $\leq$  0.001.

#### 4.4.4.3 RNA extraction, determination of *HMGCR* mRNA levels and quality control

RNA was extracted from cerebellum (n=119) and frontal cortex tissues (n=123) using the Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit (Promega, WI, USA) on a Maxwell® 16 LEV Instrument (Promega, WI, USA). Then, cDNA was obtained by reverse transcription on a Multigene thermocycler (Labnet International Inc.) using the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, CA, USA) and 200ng of total RNA. The thermocycler was set as follows: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C and 5 min at 85 °C. Finally, 20ng of each cDNA were applied in triplicate for real-time PCR performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). The following TaqMan® Gene Expression Assay Kits (Applied Biosystems, CA, USA) were used: total *HMGCR*, Taqman assay #Hs00168352\_m1 covering exon boundary 6/7; FL *HMGCR* variant, custom assay covering exon boundary 13/14 with forward primer: TGTGGCCAGCACCAATAGAG, reverse primer:

CAACTGGGCCACGAGTCAT and probe: CAGAGCAATAGGTCTTGGT;  $\Delta 13$  *HMGCR* variant, custom assay covering exon boundary 12/14 with forward primer: TCAGAACCTTCTTCTCTCCAGTACCT, reverse primer: CACCTCCACCAAGCAAGGA, probe: CCTTACAGGGATTATAATTA; peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*), Taqman assay # Hs99999904\_m1; ubiquitin-conjugating enzyme E2D2 (*UBE2D2*), Taqman assay # Hs00366152\_m1; hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), Taqman assay # Hs99999909\_m1; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Taqman assay # Hs99999905\_m1; beta actin (*ACTB*), Taqman assay # Hs99999903\_m1; and cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*CDKN1B*), Taqman assay # Hs00153277\_m1. The cycling conditions were 20 sec at 95 °C and 40 cycles of 3 sec at 95 °C and 30 sec at 60 °C. The relative gene expression of *HMGCR* was determined using the comparative Ct method ( $\Delta\Delta C_t$  method, Applied Biosystems User Bull. #2 Dec. 97). The efficiency of each gene expression assay kit was assessed and varied between 96 and 103%. HEPG2 was chosen as calibrator. Selection of the most appropriate endogenous reference gene was performed as previously described<sup>220</sup> on 25 randomly selected individuals, and *PPIA* was selected out of 5 other candidates as the single most stable reference gene to use in our study. The plate-to-plate variability in relative quantities of the repeated samples was 5.2%, 4.5%, 6.2% and 2.3% (coefficient of variation, CV) for respectively total *HMGCR*, FL *HMGCR*,  $\Delta 13$  *HMGCR* and *PPIA* mRNA.

To ensure the reliability of the mRNA levels determined, several precautions were duly used. In addition to the usual quality controls, that are no reverse transcriptase controls (resulted in no amplification), no template controls (resulted in no amplification), genomic DNA controls (resulted in no amplification), confirmation of primer sets specificity on agarose gels (resulted in single band of the expected molecular weight) and determination of RNA input range linearity (linear between 16 and 1000ng of RNA), we performed RNA purity and integrity measurements. The purity and integrity of RNA was estimated using the ratio of absorbance values at 260 nm and 280 nm evaluated on a Biotek Synergy H1 reader (Fisher Scientific, ON, Canada) and the RNA integrity number (RIN) determined with a Bio-Rad's Experion instrument (Bio-Rad, CA, USA). The ratios of absorbance were all over 1.5, while RINs ranged from 2 to 8.4, with 60% of samples over 6. All Experion's electropherograms showed no DNA contamination and visible 28S and 18S peaks. Note that samples had to have

a RIN  $\geq 4$  to be included in statistical analysis (n=114 for the frontal cortex, n=110 for the cerebellum). Results are presented as *HMGCR* mRNA levels and *HMGCR* mRNA ratios, the latter being calculated as the mRNA levels of the FL or  $\Delta 13$  *HMGCR* variant divided by the total mRNA levels of *HMGCR* (any *HMGCR* transcripts containing exon boundary 6/7). While the FL,  $\Delta 13$  or total *HMGCR* mRNA levels reflect the numbers of each mRNA transcripts in a given tissue, the mRNA ratios assess the effects of splicing independently of the effects on overall transcription.

#### **4.4.4.4 Protein extraction for HMGCR and A $\beta$ 42/Tau protein quantification**

Frozen brain tissues were homogenized in cold phosphate saline buffer (PBS) with protease inhibitor using a Omni beads Ruptor 24 (Omni International, GA, USA) and ceramic beads as per manufacturer's instructions. Protein content was determined in the frontal cortex by the Pierce BCA protein assay (Promega) using bovine serum albumin as standard (Sigma) and a Synergy H1 microplate reader (BioTek, VT, USA) set at a wavelength of 562nm. Homogenates were kept at -80°C until use, and repeated freeze-thaw cycles were avoided.

#### **4.4.4.5 Determination of HMGCR protein levels**

HMGCR protein levels were measured in the frontal cortex (n=117) using a commercial sandwich enzyme immunoassay (MyBioSource, CA, USA) and a Synergy H1 microplate reader (BioTek, VT, USA). In microtiter plates pre-coated with a monoclonal antibody specific for HMGCR, samples and standards were incubated along with a standardized preparation of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal antibody specific for HMGCR. The protocol was conducted as per manufacturer's instructions with the following modification: the samples and standards were incubated with the balance and conjugate solutions for 3h at 37°C instead of 1h. The sensitivity of the assay is 0.1ng/ml, and concentrations of the samples, which all fell within the standard curve range, varied between 0.2 and 1.2ng/ml. Given the high degree of inter-lot variations (mean CV of 24.7%), all samples were re-measured with the same lot number and the obtained intra-lot variation (mean CV of 8.8%) was within the manufacturer recommendation (CV < 9%).

#### **4.4.4.6 Determination of A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau protein levels**

A $\beta$ 42, T-Tau and 181-P-Tau concentrations were measured in the frontal cortex (n=94) and cerebellum (n=91) using commercial enzyme immunoassays (Innotest Inc., Ghent, Belgium) and a Synergy H1 microplate reader (BioTek, VT, USA). In these assays, the wells of polystyrene microtiter plates were coated with monoclonal antibodies 21F12, AT120 or HT7 for respectively A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau. The samples and standards were incubated in these wells along with biotinylated monoclonal antibodies 3D6, BT2/HT7 and AT270 for respectively A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau. The protocol was conducted as per manufacturer's instructions with the following modification: the samples were homogenates of brain tissues rather than CSF. The sensitivity of the assay was 50pg/ml, 60pg/ml and 15.6pg/ml for respectively A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau. Samples concentrations, which all fell within the standard curve range, varied between the appropriate detection limit and 10000 times the detection limit. Intra-assay and inter-assay variability measures were respectively 5.1% and 9.1% (CV), consistent with manufacturer recommendation.

#### **4.4.4.7 Determination of NFT and SP counts**

NFT and SP densities were determined in the frontal cortex (n=74) as previously described<sup>241</sup> and were consistent with the criteria used in the classification of Khachaturian<sup>167</sup>. Briefly, paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin, modified Bielchowsky and alkaline Congo red preparations to visualize NFTs and SPs. Diffuse plaques were purposefully excluded from all measurements.

#### **4.4.4.8 Statistical analysis**

All statistics were carried out using SPSS program. As expected given their high inter-individual variability, most of the data produced in this paper were non-normally distributed (assessed via Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk tests and visual inspection of Q-Q plots). Several transformations were attempted to obtain a normal distribution but with no success. When appropriate, parametric tests were computed but for the most part, the nonparametric alternative had to be used. The goal of our paper was to investigate the impact of rs3846662 genotype, but most importantly, of HMGCR mRNA and protein levels, on different pathological markers of AD. Given our previous findings<sup>217</sup>, their effects had to be

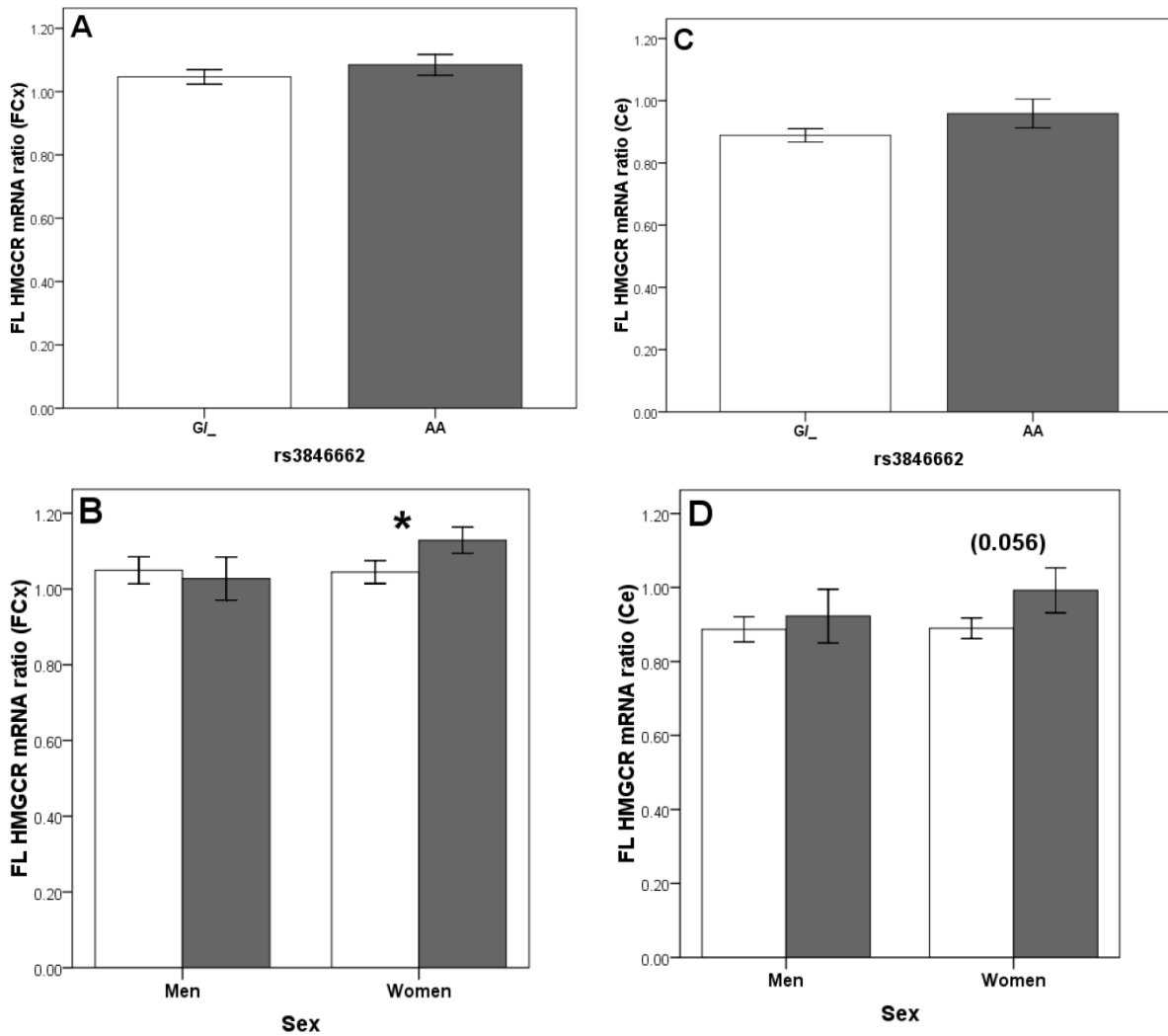
differentiated from the impacts of sex, *APOE4* allele and disease status. This raises the problem of multiple comparisons. However, the Bonferroni correction would be overly conservative, especially here, where several endpoints measure different aspects of the same phenomenon. Thus, we choose not to correct for multiple comparisons, looking instead for consistency across the results (see discussion).

Firstly, the impact of rs3846662 (G- versus G+ subjects) on *HMGCR* mRNA and *HMGCR* protein brain levels were analyzed by means of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. For all nonparametric tests, data were also split according to disease status, sex and *APOE4* allele status to examine the impacts of rs3846662 within each subgroup. Secondly, Spearman correlations were used to analyze the relationship between *HMGCR* mRNA or protein levels and NFT/SP accumulation, A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau brain levels. These relations were analyzed with and without splitting according to disease status, sex and *APOE4* allele status. Finally, even though the data were non-normally distributed, curve estimation was used to estimate the nature of the relationship between these variables. The model with the lowest standard error of the estimate was selected as best.

#### **4.4.5 Results**

##### **4.4.5.1 Frequency of rs3846662 A allele**

Previous findings indicate that homozygosity at locus rs3846662 is associated with the strongest and most significant effects<sup>30</sup>. In order to investigate the possible impact of rs3846662 on *HMGCR* mRNA and protein levels, a greater proportion of tissues from homozygote subjects were thus selected. Consequently, the frequency of the *HMGCR* A allele at locus rs3846662 (Table 4.4.1) is lower than those reported for the French Canadian<sup>217</sup> and other European populations<sup>32</sup>.



**Figure 4.4.1: FL *HMGR* mRNA ratio in the frontal cortex (A, B) and the cerebellum (C, D) according to rs3846662 genotype in the whole studied cohort (A, C) and sex subgroups (B, D).** Bars represent means, error bars represent SEM and *P* values were obtained from Kruskal-Wallis analyses, \*  $P \leq 0.05$ .

#### 4.4.5.2 Impacts of rs3846662 on HMGR mRNA and protein levels

Mann-Whitney analysis of the impacts of rs3846662 on HMGR was modestly significant at the level of the mRNA (Figure 4.4.1, A to D). Indeed, irrespective of disease status, women carrying the AA genotype (G- genotype) have higher ratio of FL *HMGR* mRNA ratio (i.e. mRNA prevalence of FL *HMGR* over prevalence of all *HMGR* transcript variants) in the frontal cortex (Figure 1B,  $P = 0.024$ ), and almost significantly in the

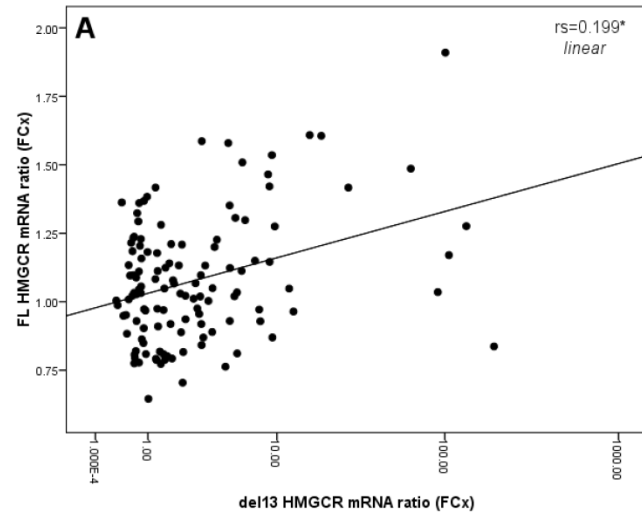
cerebellum (Figure 4.4.1D,  $P = 0.056$ ). However, no associations were observed for the  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio (i.e. mRNA prevalence of  $\Delta 13$  *HMGCR* over prevalence of all *HMGCR* transcript variants) or the FL,  $\Delta 13$  and total *HMGCR* mRNA levels (results not shown,  $P > 0.05$ ). Finally, no association between rs3846662 genotype and *HMGCR* protein levels were observed (results not shown,  $P > 0.05$ ). Stratification by disease status, sex or *APOE4* allele status did not modify these findings.

#### 4.4.5.3 *HMGCR* biology versus AD Pathological Markers

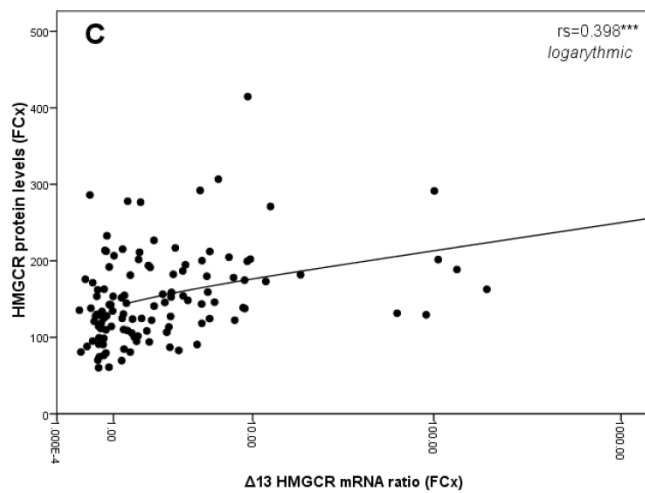
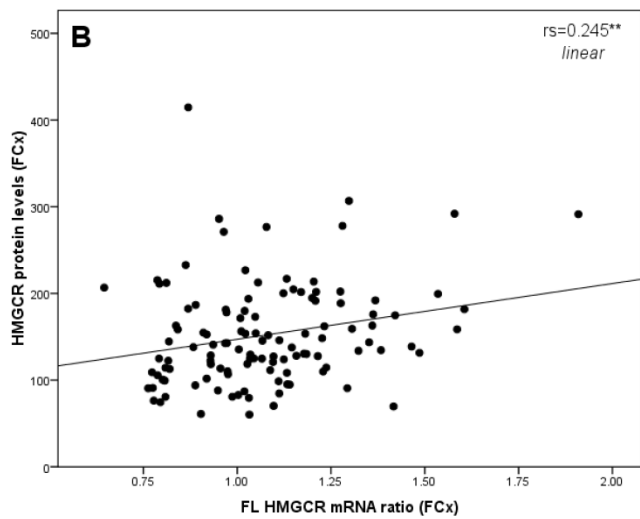
The states of mRNA and protein levels are set primarily by processes downstream of transcription. We therefore used Spearman correlations to investigate whether *HMGCR* biology was associated with AD pathological markers.

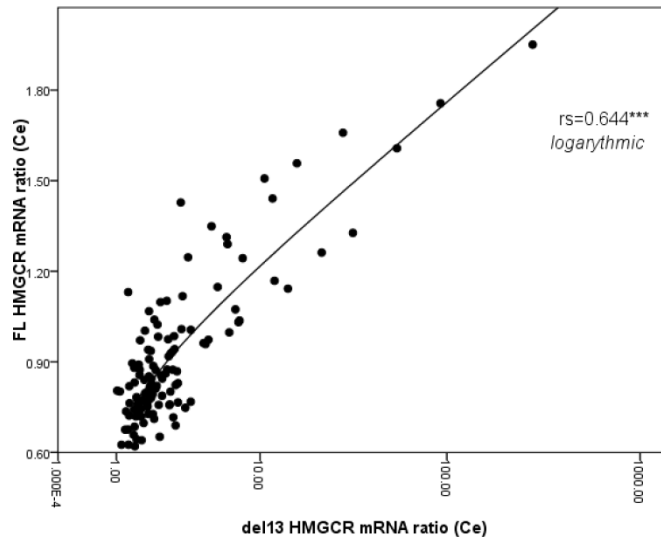
First, we observe that the FL and  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratios do not correlate with one another in the frontal cortex ( $P > 0.05$ , Figure 4.4.2A) but do so in the cerebellum ( $r_s$  0.644  $P = 6.51 \times 10^{-15}$ , Figure 4.4.3). In the frontal cortex, *HMGCR* protein levels correlate with both *HMGCR* mRNA ratios, but most notably, with the  $\Delta 13$  ratio ( $r_s$  0.209  $P = 0.029$  and  $r_s$  0.360  $P = 1.13 \times 10^{-4}$ , Figure 4.4.2 B and C, respectively for FL and  $\Delta 13$  ratios). The FL,  $\Delta 13$  and total mRNA levels also correlated with *HMGCR* protein levels: total and FL *HMGCR* mRNA levels are inversely correlated with the protein levels, while the  $\Delta 13$  mRNA levels correlates positively with it (results not shown). Overall, these data suggest that an increase in *HMGCR* protein levels correlates best with an increase in both the proportion of exon 13 skipping and the numbers of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA transcripts. Except for the control group where the significance is lost, this conclusion remains valid for each subgroup tested following stratification by disease status, sex and *APOE4* allele status (results not shown).





**Figure 4.4.2: Scatter plot between the FL and  $\Delta 13$  HMGCR mRNA ratios (A), and scatter plots between HMGCR protein levels and FL (B) or  $\Delta 13$  (C) HMGCR mRNA ratios.** Results are for the frontal cortex. Curve estimation was used to estimate the nature of the relationship between the variables. rs represent Spearman correlation, \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .





**Figure 4.4.3: Scatter plot between FL and  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA ratios in the cerebellum.**

rs represent Spearman correlation, \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Second, in the frontal cortex, very few correlations are observed between *HMGCRC* mRNA or protein levels and markers of AD pathology. Regarding the mRNA expression, we observed that the  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA ratio correlates significantly with NFT counts (0.303,  $P = 0.011$ , Table 4.4.2). Similarly,  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA levels were significantly associated with NFT counts (respectively 0.265  $P=0.027$ , Table 4.4.2). After stratification by disease status sex or *APOE4* allele status, the significance of these correlations was lost. Furthermore, no correlations were observed between  $\Delta 13$  *HMGCRC* mRNA levels or ratio and SP accumulation, A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau. Lastly, no correlations were observed between all these markers of AD pathology and FL *HMGCRC* mRNA ratio, FL and total *HMGCRC* mRNA levels. Regarding the protein expression, *HMGCRC* protein levels were correlated significantly with SP accumulation (0.252,  $P=0.037$ , Table 4.4.2) and almost significantly with NFT counts (0.230,  $P=0.057$ , Table 4.4.2). While there were no correlations with either NFT or SP counts after splitting by sex or disease status, stratification by *APOE4* allele status indicated that these correlations were significant only for the *APOE4* negative subgroup (0.473  $P=0.011$  and 0.461  $P=0.013$  for the NFT and SP counts, respectively, Table 4.4.2). Lastly, no correlations were observed between *HMGCRC* protein levels and A $\beta$ 42, T-Tau and P-Tau levels.

**Table 4.4.2: Spearman correlations between key HMGCR parameters and markers of AD pathology in the frontal cortex**

AD markers	HMGCR		Impact on significance of stratification by			HMGCR Protein	Impact on significance of stratification by		
	$\Delta 13$ ratio	$\Delta 13$ levels	Disease	Sex	APOE4		Disease	Sex	APOE4
NFT	0.303*	0.265*	<i>Lost</i>	<i>Lost</i>	<i>Lost</i>	0.230	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>0.473* for E4-</i>
T-Tau	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
P-Tau	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
SP	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	0.252*	<i>Lost</i>	<i>Lost</i>	<i>0.461* for E4-</i>
A $\beta$ 42	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>

Abbreviations: No, no correlation; \*,  $P \leq 0.05$ .

**Table 4.4.3: Spearman correlations between key HMGCR parameters and markers of AD pathology in the cerebellum**

AD markers	HMGCR			Impact on significance of stratification by		
	FL ratio	$\Delta 13$ ratio	$\Delta 13$ levels	Disease	Sex	APOE4
T-Tau	No	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
P-Tau	No	No	No	<i>No</i>	<i>No</i>	<i>No</i>
A $\beta$ 42	No	-0.351***	-0.359***	<i>AD only</i>	<i>Holds</i>	<i>Holds</i>

Abbreviations: No, no correlation; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ .

In the cerebellum, we observe significant correlations between A $\beta$ 42 levels and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA ratio and  $\Delta$ 13 *HMGCR* mRNA levels (-0.351  $P = 0.001$  and -0.359  $P = 0.001$  for  $\Delta$ 13 ratio and  $\Delta$ 13 mRNA levels, respectively, Table 4.4.3). Except for the control group where the significance is lost most likely due to an absence of pre-symptomatic amyloid pathology, this conclusion remains valid for each subgroup tested following stratification by disease status, sex and *APOE4* allele status (results not shown). No correlations were observed between *HMGCR* mRNA levels or ratios and T-Tau and P-Tau levels.

#### **4.4.6 Discussion**

Late-onset AD is a chronic neurodegenerative disorder that represent the commonest cause of dementia and the fourth most common cause of death in the developed world <sup>177</sup>. Given the absence of curative treatment and the overwhelming number of failed Alzheimer's clinical trials witnessed over the last decade, research on AD has gradually shifted his focus toward pre-Alzheimer's interventions and protective factors. *APOE* encodes the main lipid carrier protein in the CNS and is the most robustly and consistently associated gene with AD risk, with the  $\epsilon$ 4 (*APOE4*) and  $\epsilon$ 2 (*APOE2*) alleles substantially increasing and decreasing the risk level, respectively <sup>85, 89, 111, 184-186</sup>. The recent discovery that rs3846662, which modulates the alternative splicing of *HMGCR*, confers a significant protection against AD risk <sup>217</sup> stressed, once again, the importance of cholesterol homeostasis for neuronal function and CNS proper functioning. However, whether the protective effects of this SNP is mediated through reduction of vascular risk factors or through the direct modulation of CNS cholesterol homeostasis remains to be clarify.

This study was designed to explore the hypothesis that the beneficial effects of *HMGCR* are mediated through direct modulation of CNS cholesterol homeostasis. Brain cells are believed to use *HMGCR* and internalization of lipoproteins via the *APOE*/*LDLR* pathway to fulfill its cholesterol needs <sup>44, 104</sup>. Thus, our working hypothesis is that *HMGCR* A allele homozygosity at locus rs3846662 ultimately results in an *HMGCR* with lower activity. This prompts a compensatory upregulation of the internalization of lipoproteins via the *APOE*/*LDLR* pathway, resulting in a more efficient utilization of local resources (cholesterol

and ATPs) and an increase energy reserve to face unexpected neuronal insults or, neurodegenerative disorders. Even though our cross-sectional design study is not suitable to study causality, two causally related factors should cluster more frequently than is expected by chance and therefore, a cross-sectional design should find an association between these factors<sup>242</sup>. The purpose of this *in vivo* study was thus to assess if biomarkers for AD are related to local HMGCR alternative splicing. The two most predominant pathological features of AD being the extracellular SP, primarily composed of A $\beta$  peptides, and the intracellular NFT, resulting from the truncation and/or hyperphosphorylation of the microtubule-stabilizing Tau proteins (reviewed in<sup>2</sup>), we quantified SP, A $\beta$ 42, NFT, T-Tau and P-Tau levels in the brain. Increase levels of these specific parameters have been associated with increase brain damage and AD severity<sup>67, 68, 243, 244</sup>, and lower levels are expected to correlate with the protective A allele and thus, with increased  $\Delta 13$  HMGCR mRNA levels/ratio.

First, let's consider the genetic portion of the study. We found that women carrying the AA genotype had slightly higher FL HMGCR mRNA ratio than women carrying at least one copy of the G allele in the frontal cortex ( $P < 0.05$ ,  $1.13 \pm 0.03$  vs  $1.04 \pm 0.03$ , respectively) and almost significantly, in the cerebellum ( $P = 0.056$ ,  $0.99 \pm 0.06$  vs  $0.89 \pm 0.03$ , respectively). However, no effects of the rs3846662 SNP was found on HMGCR mRNA or protein levels, indicating that the increase proportion of FL variant does not translate into higher numbers of mRNA transcripts or higher protein levels. However, it could very well translate into higher activity levels since the catalytically active HMGCR is found as a tetramer<sup>29, 31</sup>. Indeed, while it is still unclear whether the  $\Delta 13$  HMGCR mRNA transcript is translated *in vivo* into proteins, its translation into inactive monomer proteins could lead to the formation of heterotetramers with reduced enzymatic activity<sup>32</sup>. Higher FL HMGCR mRNA ratio would therefore be associated with higher HMGCR activity despite unchanged HMGCR mRNA or protein levels. In any case, our finding of an increase FL HMGCR mRNA ratio in women carrying the AA genotype is unexpected. We offer two possible explanations for this finding.

Firstly, it has been suggested that the alternative splicing of HMGCR may exist primarily to correct small imbalances in cholesterol homeostasis, allowing the cell to dodge

the need for stimulation of a robust transcriptional response when cholesterol disequilibrium occurs <sup>211</sup>. Alternative splicing and rs3846662 would thus be expected to have a stronger impact on baseline lipid levels <sup>211</sup> and in normal conditions rather than in disease states. As such, the association between the AA genotype and increase FL *HMGCR* mRNA ratio observed in aging or AD subjects may not be related to its impact on *HMGCR* alternative splicing. In accordance with this hypothesis, a recent *in vivo* study of the impacts of rs3846662 on statin efficacy and lipids levels in familial hypercholesterolemia also reported increase FL *HMGCR* mRNA ratio/levels in women receiving statin and carrying the AA genotype (Leduc et al, 2015, submitted). Overall, these findings suggest that the effects mediated by the AA genotype in conditions deviating from physiological conditions may be independent from its impact on *HMGCR* alternative splicing (Leduc et al, 2015, submitted).

Secondly, because the significant increase in FL *HMGCR* mRNA ratio observed in women carrying the AA genotype would not survive Bonferroni correction, this finding might simply reflect spurious correlation arising from multiple statistical comparisons rather than true association. Simmons and colleagues also found no association between rs3846662 genotype and *HMGCR* mRNA prevalence in the brain, a finding they attributed to the confounding bias of cell type heterogeneity and differential expression of RNA splicing factors in the CNS <sup>40</sup>. However, since we quantified the *HMGCR* mRNA levels in brain regions with two very distinct neuronal to nonneuronal ratios, we should have been able to identify cell-type specific effects, if any. To explore whether the second assumption can explain the lack of association between the *HMGCR* A allele and  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA levels/ratio, we performed a literature search to assess the current status of HNRNPA1 (also known as hnRNP A1) expression in the brain. An immunocytochemistry study performed on several mouse tissues confirmed that HNRNPA1 abundance varies between cell types, with neurons displaying much stronger staining intensity than glial cells <sup>245</sup>. Mouse HNRNPA1 expression in glial and neuronal cells respectively equals and surpasses that observed in hepatocytes <sup>245</sup>. In accordance, immunocytochemistry analysis of normal human tissues suggests that HNRNPA1 expression is strong in some neurons, undetectable in glial cells, and moderate in hepatocytes <sup>246</sup>. More importantly, while there is little HNRNPA1 expression in normal human tissues <sup>246</sup>, HNRNPA1 expression is high in proliferating and transformed cells <sup>246, 247</sup>

as well as most cancer<sup>246, 248-251</sup>, and markedly reduced in senescent cells<sup>252, 253</sup> as well as in AD<sup>251, 254</sup>. In considering these results, we speculate that rs3846662 genotype may not be significantly functional in the brain, especially in older individuals suffering of AD. Indeed, even though the A allele engenders the preferential binding of HNRNPA1 to promotes exon 13 skipping<sup>30, 33</sup>, its effects may be canceled by the low levels of HNRNPA1 in the brain.

Next, since rs3846662 was initially thought to alleviate AD risk via its modulation of *HMGCR* alternative splicing, the molecular biology portion of this study was intended to explore whether *HMGCR* mRNA and protein levels correlated with AD pathological markers. More specifically, we were expecting higher  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio/levels to correlate with lower AD pathology. While we observed only a few correlations between *HMGCR* mRNA ratio/levels and AD biomarkers, the disparate findings between the two brains regions raise considerable interest. In the frontal cortex, we observed an unexpected correlation between increased  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio/levels and increased NFT counts (Spearman correlations 0.303\* and 0.265\*, respectively). In contrast, in the cerebellum, we observed a significant correlation between increased  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA ratio/levels and decreased A $\beta$ 42 levels. This dichotomy between the frontal cortex and cerebellum might reflect cell type-dependent effects of *HMGCR* or more likely, that the beneficial effects of *HMGCR* are dependent upon disease severity and progression. Indeed, at the very beginning of a disease process, portrayed here by the cerebellum that contains a much lower pathological burden, it might be beneficial for the cell to acquire its cholesterol through internalization of lipoproteins. However, as the disease progress, portrayed here by the frontal cortex that contains a considerable amount of pathology, it might then be more beneficial for the cell to be autonomous and be capable of efficiently synthesizing its own cholesterol molecule.

In line with this hypothesis, we observed that the increase in the proportion and numbers of  $\Delta 13$  *HMGCR* mRNA transcripts in the frontal cortex correlated consistently across all subgroups (except control) with higher *HMGCR* protein levels. Since *HMGCR* protein levels are increase by 200 fold following inhibition of its activity<sup>4</sup>, whether the observe increase in protein levels is an attempt for the cell to compensate for lower *HMGCR* activity levels in the brain remains to be determined. Interestingly, we observed a positive correlation

between increase HMGCR protein levels and increase NFT and SP, but only in the *APOE4* negative subgroup (Spearman correlations 0.473\* and 0.416\*, respectively). We have previously demonstrated that the *HMGCR* AA genotype do not modulate the *APOE4* risk in subjects affected by full-blown AD <sup>217</sup>. However, the AA genotype was shown to modulate *APOE4* risk in cognitively intact and mild cognitive impairment (MCI) subjects, to delay age of onset of AD and, to decrease the life-long accumulation of NFT and SP pathology in *APOE4* carriers <sup>217</sup>. The observation that HMGCR protein levels no longer modulate NFT/SP pathology in *APOE4* carriers might reflect the exhaustion of the HMGCR system in end-stage AD. The modulation of NFT/SP accumulation in *APOE4* carriers by the AA genotype reported previously <sup>217</sup> might occur in the early rather than later stages of the disease. Overall, this hypothesis is in line with the observation that for HMGCR inhibitors (statins) to reduce the risk of AD <sup>116-119</sup>, it must be taken during a critical period, for a certain length of time and years before the expected onset of the disease <sup>217</sup> otherwise, when used in subjects with an established diagnosis, statins offers no detectable benefits <sup>120</sup>.

In conclusion, data obtained *in vivo* from a cohort of autopsied AD and non demented control brain samples did not confirm the effects of the A allele at locus rs3846662 on *HMGCR* alternative splicing. The association between rs3846662 and AD may be more complicated than initially thought, involving in a complex web of pleiotropic effects, epistasis and gender interactions. While the beneficial effects of HMGCR might be brain cell-type and disease-progression dependent, our current results do not support an extensive role of local *HMGCR* splicing on AD pathogenesis. Given the high interindividual variability in the levels of AD biomarkers, replication of our findings in larger samples would be recommended. The use of postmortem brain tissues from subjects with different stages of AD and MCI as well as measurement of HMGCR activity should be considered in subsequent study. Finally, we remain convinced that it is still conceivable that the protective effects of rs3846662 might be mediate through vascular effects (such as arteriosclerosis). This hypothesis needs to be further investigated.



#### **4.4.7 Funding**

This study was supported by the Canadian Institute of Health Research (VL, JP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JP), the JL Levesque foundation (JP), the Canadian Stroke Network (VL) and the Leducq Fondation (RD).

## Chapitre 5 – Discussion générale

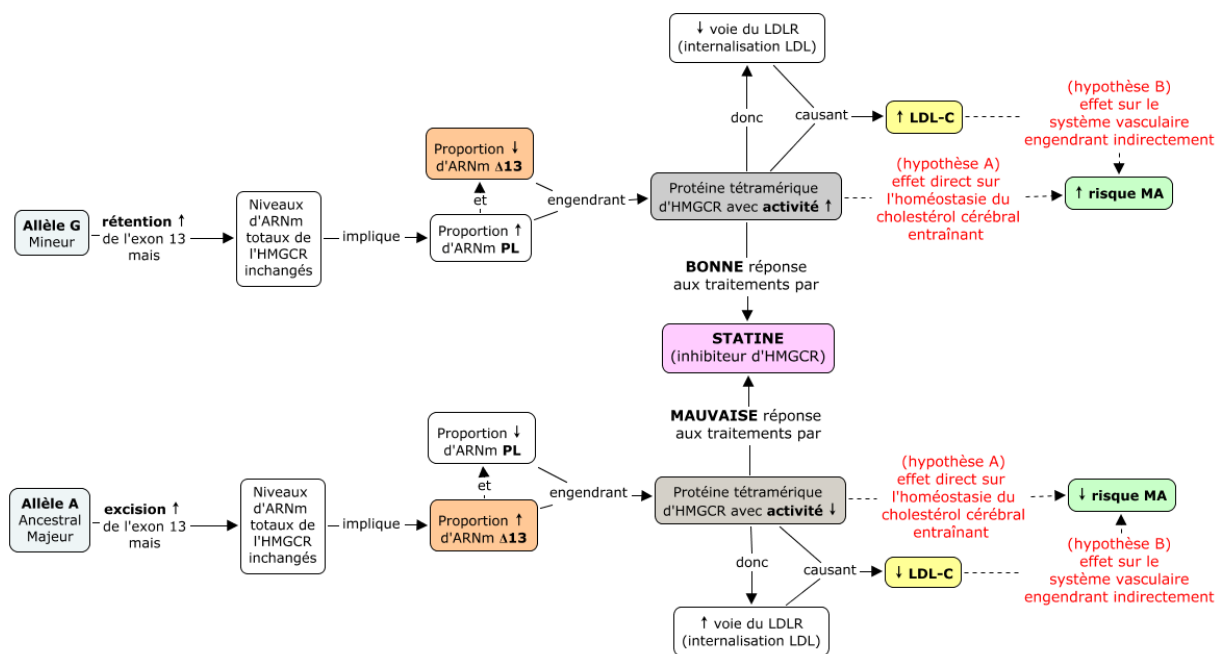
---

### 5.1 Sommaire et originalité de la thèse

L'HMGCR est une enzyme vedette qui a fait et continue à faire couler beaucoup d'encre. Elle est essentielle à la vie puisqu'elle régule la synthèse de cholestérol dans le corps humain, et elle est la cible des médicaments les plus prescrits au monde pour réduire le cholestérol sanguin : les statines. L'engouement suscité par la découverte que ces médicaments pouvaient, en plus de réduire le risque cardiovasculaire, réduire le risque de développer la MA de près de 70% <sup>116-119</sup> n'a eu d'égale que la déception qui s'en est suivie lorsque des essais cliniques rigoureux ont démontré l'absence d'amélioration ou de stabilisation de la maladie chez des patients atteints de la MA au stade modéré-sévère et traités par statines depuis au moins 6 mois <sup>120, 121</sup>. Pourtant, d'autres études observationnelles ont démontré que la prise régulière de statines sur plusieurs années, dans la décennie précédant l'arrivée attendue de la MA, était associée à une réduction de la pathologie neurofibrillaire, mais non celle liée aux plaques séniles de type amyloïde <sup>122, 123</sup>. Se pourrait-il que l'adage mentionné au chapitre 1 s'applique aux statines: vaut mieux les utiliser de façon préventive que curative?

Désirant approfondir cette question, nous nous sommes attardés au polymorphisme relativement fréquent localisé au locus rs3846662 de l'*HMGCR* puisque des études ont démontré son implication au niveau de l'épissage alternatif de l'ARNm de l'*HMGCR* <sup>7, 30, 33, 40</sup>. En effet, l'ARNm de l'*HMGCR* existe sous deux formes principales : le transcrit PL et le transcrit  $\Delta 13$  <sup>28</sup>. Puisque ce dernier transcrit conduirait à la production d'une HMGCR non fonctionnelle enzymatiquement <sup>30</sup>, une production physiologique accrue de ce transcrit  $\Delta 13$  chez un individu affecterait la structure quaternaire de l'enzyme et, serait l'équivalent de lui administrer une faible dose de statine depuis la naissance. Or, des études mentionnées ci-haut émergent le portrait suivant : les individus porteurs de l'allèle A au locus rs3846662 voient leur proportion d'ARNm  $\Delta 13$  augmenter dans le système périphérique <sup>7, 30, 33, 40</sup> (Figure 5.1). On peut donc s'attendre à ce que les individus porteurs de l'allèle A soient, d'une part, plus

résistants au traitement de statines et d'autre part, protégés contre la MA comparativement aux porteurs de l'allèle G (Figure 5.1).



**Figure 5.1: Impact respectif des allèles A ou G au locus rs3846662 de l'HMGR sur la proportion d'ARNm Δ13, l'activité enzymatique, les niveaux de LDL-C circulants et le risque de MA.** À ce jour, aucune étude n'a permis d'établir si la diminution du risque de MA résulterait d'un effet central (hypothèse A) ou vasculaire (hypothèse B). Cette figure découle des études réalisées par <sup>7, 30, 32, 33, 40, 194</sup>.

Dans cette thèse, nous avons cherché à corroborer cette hypothèse tout en contribuant à l'avancement des connaissances sur le polymorphisme rs3846662 et son impact sur les différents transcrits d'ARNm de l'HMGR. D'abord, puisque la presque totalité du travail réalisé jusqu'à présent sur l'HMGR et le polymorphisme rs3846662 furent réalisés *in vitro*, dans des lignées cellulaires périphériques immortalisées, nous nous sommes distingués en utilisant des systèmes *in vivo* pour notre étude (articles 4.2 à 4.4). Ensuite, puisque la majorité du travail effectué sur l'HMGR concerne le système vasculaire, nous nous sommes démarqués en incluant un volet SNC à notre étude (articles 4.2 et 4.4). De plus, afin de contribuer de façon originale à l'avancement des connaissances sur l'HMGR dans le système vasculaire, nous nous sommes intéressés à une population jusque-là inexplorée à ce niveau :

les individus atteints d'HF due à la délétion de >15kb du *LDLR* (article 4.3). Enfin, comme l'étude des niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* comporte certaines particularités méthodologiques qui n'avaient pas encore été investiguées en détails, particulièrement au niveau des tissus post-mortem cérébraux, nous avons débuté cette thèse par un article méthodologique (article 4.1).

## **5.2 Contributions spécifiques à l'avancement des connaissances**

### **5.2.1 Détermination des niveaux d'ARNm par quantification relative**

Dans le premier manuscrit présenté dans cette thèse (chapitre 4.1), nous avons débuté par la lecture de deux articles répertoriant plus de 700 gènes constitutifs<sup>170, 171</sup>. Nous avons épluché ces documents afin de sélectionner des gènes candidats appropriés pour la quantification relative d'ARNm de niveau d'expression faible à modérée dans le cortex frontal humain affecté par la MA. Nous avons privilégié les gènes qui ont déjà été utilisés par d'autres équipes pour étudier la MA<sup>157-159</sup>, et nous avons pris soin d'inclure quelques gènes de référence classiques, tels l'actine et le GAPDH. Nous avons ensuite utilisé trois algorithmes mathématiques, soit Normfinder<sup>154</sup>, Bestkeeper<sup>155</sup> et geNorm<sup>156</sup>, afin de sélectionner d'une part, les gènes constitutifs les plus robustement stables dans la MA et d'autre part, afin de déterminer le nombre de gènes le plus approprié à utiliser.

D'abord, on a pu constater que bien que la stabilité des gènes varie d'un algorithme mathématique à un autre, les meilleurs et les pires gènes de référence demeurent approximativement les mêmes. Ainsi, pour l'étude d'ARNm d'expression faible à modérée dans le cerveau humain affecté par la MA, tels les gènes de la paraoxonase ou de l'*HMGCR*, les gènes constitutifs à privilégier sont *UBE2D2*, *PPIA* et *GPS1*, alors que le gène de référence à éviter est celui de la bêta actine. En effet, tous ces gènes sont constitutifs et donc nécessaires à la survie de toutes cellules puisqu'ils sont impliqués au niveau de la dégradation des protéines (*UBE2D2*), de la communication cellulaire et du métabolisme (*PPIA*, *GPS1*) et de l'architecture cellulaire (*ACTB*). Leur niveau d'expression peut cependant varier dans

différentes conditions, particulièrement au cours d'une maladie. Dans un cerveau ravagé par la MA, on observe une perte neuronale considérable (> 80%) comparativement à un cerveau normal d'âge similaire. Il n'est donc pas très surprenant de constater que les gènes impliqués dans le cytosquelette cellulaire, tels la bêta-actine, ne soient pas exprimés de la même façon que dans un cerveau normal. Pour leur part, les gènes impliqués dans le système ubiquitine et dans la communication cellulaire semblent stables en présence d'une croissance cellulaire exponentielle puisqu'ils sont similairement exprimés dans les tissus fœtaux et adultes (UBE2D2 et GPS1)<sup>170</sup> ou encore, dans de multiples tissus avec un taux de renouvellement cellulaire très disparate (PPIA)<sup>172</sup>. Il est donc fort probable que ces derniers s'expriment de la même façon lors d'une décroissance cellulaire majeure, telle que lors de la perte neuronale massive engendrée par la MA. Ensuite, on a évalué grâce à l'outil geNorm le nombre de gènes de référence à utiliser pour bien capturer la variabilité intrinsèque de nos échantillons d'ARN. Bien que la variabilité de ceux-ci ne nécessite pas l'emploi de gènes de référence additionnels (variation par paires V3/4 de geNorm < 0.15), geNorm recommande en toutes circonstances un nombre minimal de deux gènes de référence. Puisque dans la pratique courante, la quantification relative d'ARNm s'effectue par rapport à un seul gène de référence, nous avons évalué si l'emploi d'un seul gène constitutif plutôt que deux modifiait considérablement les résultats. Il ressort de notre étude que les résultats générés suite à la normalisation par un ou deux gènes de référence sont similaires, mais que la significativité des différences observées peut varier selon le gène de référence choisi. En présence d'un faible taux de variabilité (variation par paires V2/3 de geNorm < 0.1), il nous apparaît acceptable de n'utiliser qu'un seul gène de référence dans nos études d'ARN extrait de cerveaux humains autopsiés. Enfin, cette étude a permis de mettre en lumière le fait que l'analyse statistique des résultats quantitatifs générés doit pouvoir permettre l'inclusion de variables confondantes comme le sexe. En effet, malgré un choix judicieux des gènes de référence, ceux-ci peuvent tout de même être influencés par ces variables, et il importe de pouvoir détecter une telle association afin de pouvoir interpréter correctement les niveaux d'ARNm de notre gène d'intérêt. En somme, cet article nous a permis d'élaborer une solide procédure nous permettant de sélectionner les meilleurs gènes de référence et la meilleure méthode statistique à employer pour toutes nos études subséquentes de quantification relative de l'ARNm, que celles-ci soient par chimie SYBR Green ou Taqman. Elle nous a permis de déterminer avec assurance que la

moyenne géométrique des gènes de référence *PPIA*, *HPRT1* and *GAPDH* est la combinaison la plus optimale pour l'étude de quantification relative de l'*HMGCR* dans l'HF, alors que l'emploi de *PPIA* est suffisant pour l'étude de l'*HMGCR* dans la MA.

### **5.2.2 Étude de l'HMGCR dans le système vasculaire et l'HF**

Dans le troisième manuscrit présenté dans cette thèse (chapitre 4.3), nous nous sommes intéressés aux individus souffrant d'HF due à la délétion de >15kb du *LDLR*. À cause de l'effet fondateur, cette population présente une grande homogénéité génétique (voir section 5.2.3 pour un rappel sur l'effet fondateur). De plus, puisque les individus ne possèdent qu'un allèle *LDLR* fonctionnel, la voie de biosynthèse du cholestérol régulée par l'*HMGCR* y est fort probablement davantage sollicitée. Ce faisant, nous nous attendions à ce que les niveaux de base de cholestérol ainsi que le pourcentage de variabilité de réponse au traitement de statines expliqués par le polymorphisme rs3846662 et les niveaux d'ARNm atteignent des niveaux plus élevés que ceux rapportés dans la population en générale. Notre étude indique que dans l'HF, les effets associés au polymorphisme rs3846662 se complexifient. Contrairement aux individus normaux (Figure 5.1), les porteurs du génotype AA atteints d'HF ont des niveaux basaux (i.e. avant traitement avec des agents hypolipidémiants) de TC et de LDL-C augmentés. Bien que nous n'ayons pu doser les niveaux d'ARNm basaux de l'*HMGCR*, il est fort probable que la voie de biosynthèse du cholestérol soit activée chez ces patients. Cette activation permettrait à la cellule de compenser pour le manque relatif de cholestérol intracellulaire engendré par la présence d'une protéine *HMGCR* moins active et d'une activité de la voie des *LDLR* réduite à 50% de sa capacité nominale. Cette hypothèse sous-entend non seulement une modification des niveaux totaux d'*HMGCR* mais également, une augmentation accrue de ces niveaux chez les porteurs du génotype AA comparativement aux porteurs de l'allèle G. Cette hypothèse permettrait d'expliquer plusieurs de nos résultats :

- i) les porteurs à la fois du génotype AA de l'*HMGCR* et de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'*APOE* ne voient pas leurs niveaux basaux de TC et de LDL-C augmenter car les porteurs de l'*APOE4* absorbent plus de cholestérol et en synthétisent moins<sup>229-231</sup>;

- ii) la voie de synthèse endogène du cholestérol étant amplifiée chez les femmes porteuses du génotype AA, sous traitement de statines, elles présentent un ratio et des niveaux d'ARNm PL augmentés comparativement aux porteuses de l'allèle G;
- iii) les femmes porteuses du génotype AA ont une réponse au traitement de statines diminuée puisque leur voie de synthèse endogène du cholestérol est intrinsèquement amplifiée comparativement aux porteuses de l'allèle G.

Toutefois, ce modèle ne permet pas d'expliquer complètement pourquoi certains de ces résultats ne sont observés que chez les femmes. La présence d'un site d'activation par l'estrogène (ERE, estrogene responsive element) dans la région du promoteur de l'*HMGCR* contribue certainement à ce phénomène puisqu'il permet de moduler positivement l'expression du gène avec des doses relativement physiologiques de l'hormone<sup>255</sup>. Davantage d'études sont nécessaires à ce niveau. De plus, comment le génotype AA pourrait-il amplifier la transcription du gène de l'*HMGCR* ? À cet effet, une étude récente a mis en lumière l'existence d'un polymorphisme (rs3761740) dans le promoteur du gène de l'*HMGCR* qui influence l'activation de sa transcription par SREBP<sup>256</sup>. Or, nous avons pu confirmer que ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison (probabilité de 0.97) avec le polymorphisme rs3846662 (chapitre 4.2)<sup>217</sup>. De cette façon, il est fort probable que ces deux polymorphismes agissent de concert dans la détermination des niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* dans l'HF. Notre étude aura permis de mettre en lumière que le modèle de l'impact des allèles A et G au locus rs3846662 présenté à la Figure 5.1 est incomplet et ne peut s'appliquer dans sa forme actuelle aux individus atteints d'HF. D'autres joueurs clés, dont le polymorphisme rs3761740, sont impliqués dans la détermination des niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* et devraient faire l'objet d'études plus poussées.

### **5.2.3 Étude de l'HMGCR dans le SNC et la MA**

Dans le deuxième manuscrit présenté dans cette thèse (chapitre 4.2), nous avons cherché à déterminer si le fait d'être porteur de l'allèle A au locus rs3846662 de l'*HMGCR* conférait une protection contre la MA. Pour un projet à saveur aussi génétique que le nôtre, il nous était primordial de débiter l'investigation de l'impact du polymorphisme rs3846662 dans

une population homogène génétiquement. Nous nous sommes donc tournés dans un premier temps vers la population fondatrice canadienne française du Québec. Cette population est constituée des descendants des quelques milliers de colons qui ont émigré de la France au 17<sup>e</sup> siècle <sup>145</sup> et est caractérisée par une hétérogénéité génétique réduite pour les maladies à hérédité mendélienne <sup>146</sup>.

On a découvert que, de façon tout à fait similaire à l'*APOE2*, la présence du génotype AA au locus rs3846662 réduit chez les femmes le risque de développer la MA d'environ 50%, et permet de retarder l'apparition des symptômes de la maladie d'environ 3.6 ans. Ce génotype, indéniablement protecteur chez les femmes, ne permet toutefois pas de diminuer le risque associé au fait d'être également porteur de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'*APOE*, le gène à risque le plus important jamais découvert pour la forme commune de la MA. Or, on a pu démontrer que les porteurs de l'*APOE4* voient leurs niveaux de plaques séniles et de DNF, deux marqueurs pathologiques qui s'accumulent au cours de la vie, s'amoinrir lorsqu'ils sont également porteurs du génotype AA. Nous nous sommes donc tournés vers la cohorte ADCS de patients atteints de DCL afin de vérifier si le génotype AA pouvait moduler le risque associé à l'*APOE4* chez ces individus dont le cerveau est moins ravagé par la maladie. On a pu constater que le génotype AA de l'*HMGCR* module de façon marquée le risque associé au fait d'être porteur de l'*APOE4*: le risque de conversion du DCL vers la MA chute de 76% à 27%, un taux similaire aux sujets DCL porteurs de l'*APOE3*, lorsque les porteurs de l'*APOE4* portent également le génotype AA. Cette diminution du risque de conversion vers la MA associé à l'*APOE4* chez les porteurs du génotype AA a finalement été corroborée dans une troisième population : la cohorte ADNI. L'ensemble de ces résultats novateurs vient appuyer autant les études qui démontrent une diminution du risque de la MA lorsque des patients normaux d'âge mûr présymptomatiques sont traités avec des statines <sup>116-119</sup>, que l'absence de stabilisation ou d'amélioration des symptômes de la maladie lorsque ce traitement est administré à des patients au stade Alzheimer <sup>120, 121</sup>. Afin de pouvoir réduire le risque de développement de la MA, les statines doivent donc être prises pendant une période critique, plusieurs années avant le début des symptômes de la maladie. Enfin, bien qu'un délai dans l'apparition des symptômes de la MA de 3.6 ans puisse paraître fort modeste, notons que des



simulations statistiques démontrent qu'un tel délai pourrait avoir des conséquences considérables quant au fardeau économique et sociétal que représente cette maladie. En effet, en 2006, on estimait la population mondiale atteinte de la MA à 26.6 millions, un nombre censé quadruplé d'ici 2050 pour atteindre 106.2 millions (1 individu sur 85 atteint de la MA)<sup>257</sup>. Or, on estime qu'un délai dans l'apparition des symptômes de la maladie de 2 ans pourrait réduire cette prévalence mondiale attendue de la MA de 22.8 millions<sup>257</sup>. En d'autres termes, si nous parvenions à transformer ces observations génétiques en cible thérapeutique, nous pourrions avoir un impact considérable non seulement sur la qualité de vie des gens à risque de développer la MA mais également, sur l'ensemble de la société.

Dans le quatrième article présenté dans cette thèse (chapitre 4.4), nous avons cherché à déterminer si les effets bénéfiques associés au polymorphisme rs3846662 pouvaient découler d'une action directe sur le métabolisme lipidique cérébral (Figure 5.1, hypothèse A). Nous avons d'abord tenté de démontrer que le polymorphisme rs3846662 influençait concrètement les niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* dans le cortex frontal et le cervelet, deux régions respectivement riches en cellules gliales et en neurones. Tout comme nous l'avons observé chez nos patients atteints d'HF, le génotype AA fut une fois de plus associé à une augmentation du ratio d'ARNm PL plutôt que d'ARNm  $\Delta 13$ . Les niveaux d'ARNm PL et d'ARNm totaux ne sont toutefois pas augmentés, indiquant que l'augmentation de la proportion d'ARNm PL n'est pas due à une activation accrue de la transcription. Vraisemblablement, cette augmentation du ratio d'ARNm PL ne pourrait s'expliquer que par une augmentation de la rétention de l'exon 13 chez les sujets porteurs du génotype AA. Ce résultat contre-intuitif nous a incité à investiguer si la ribonucléoprotéine affectée par l'allèle présent au locus rs3846662, la HNRNPA1, était bel et bien produite dans le cerveau. Bien que cette ribonucléoprotéine soit exprimée par les neurones<sup>245, 246</sup>, les niveaux de HNRNPA1 sont considérablement réduits dans la MA<sup>251, 254</sup> et le vieillissement<sup>252, 253</sup>. De cette façon, nous posons l'hypothèse que le polymorphisme rs3846662 de l'*HMGCR* n'est pas fonctionnel dans le cerveau vieillissant et de surcroît, affecté par la MA. L'augmentation du ratio d'ARNm PL obtenu chez les porteurs du génotype AA ne représenterait ainsi qu'une corrélation fallacieuse résultant de la réalisation de plusieurs analyses statistiques. D'ailleurs, la significativité de ce

résultat est perdue lorsqu'un facteur de correction Bonferroni est appliqué à nos analyses statistiques.

L'emploi de tissus cérébraux provenant de sujets âgés et de surcroît, décédés de la MA, ne représente donc pas le contexte idéal pour l'étude du polymorphisme rs3846662 dans le SNC. Toutefois, l'étude de régions du cerveau ne contenant pas le même niveau de pathologie nous a permis de découvrir que le ratio et les niveaux d'ARNm  $\Delta 13$  corrélaient, dans le cortex cérébral ravagé par la pathologie, avec une augmentation des niveaux de protéines HMGCR et de DNF, mais avec une diminution des niveaux d'A $\beta$ 42 dans le cervelet, une région très peu touchée par la pathologie Alzheimer. Cette dichotomie laisse présager que les effets bénéfiques d'une diminution de l'activité de l'HMGCR dans la MA pourraient dépendre du stade et de la sévérité de la maladie. Cette observation vient appuyer l'hypothèse voulant que pour pouvoir réduire le risque de développement de la MA, les statines doivent être prises pendant une période critique, plusieurs années avant le début des symptômes de la maladie. Quoiqu'il en soit, étant donné i), les faibles niveaux d'HNRNPA1 dans le SNC vieillissant et affecté par la MA; ii), le faible nombre d'associations entre les marqueurs pathologiques de la MA et les niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* et iii), l'absence d'association entre le génotype AA et une augmentation du ratio d'ARNm  $\Delta 13$ , il nous apparaît fortement probable que les effets bénéfiques de la prise de statines et du polymorphisme rs3846662 résultent d'un effet indirect sur le système vasculaire (Figure 5.1, hypothèse B). L'étude de tissus cérébraux plus jeunes et affectés par un stade moins avancé de maladie est toutefois nécessaire avant de pouvoir éliminer l'hypothèse que les effets bénéfiques des statines et du polymorphisme rs3846662 pourraient résulter d'une action directe et locale sur le système lipidique du SNC (Figure 5.1, hypothèse A).

## Chapitre 6 – Conclusions et projets futurs

---

Les conclusions tirées des quatre manuscrits présentés dans cette thèse nous aurons permis de contribuer significativement à l'avancement des connaissances sur l'HMGCR et son polymorphisme rs3846662. L'HMGCR est reconnue comme étant une protéine hautement régulée (chapitre 2). En plus d'être régulée par la phosphorylation, l'activité de l'HMGCR pourrait être influencée par le polymorphisme rs3846662 puisque l'allèle présent à ce locus influence l'épissage alternatif de l'*HMGCR*.

Dans l'HF, nous avons découvert que le génotype AA au locus rs3846662 corrèle avec des niveaux de base de TC et de LDL-C accrus chez les non porteurs de l'*APOE4*, et avec une résistance au traitement avec les statines chez la femme. La découverte que le génotype AA corrèle également avec des niveaux d'ARNm totaux augmentés chez la femme indique que ce polymorphisme pourrait également influencer la transcription par SREBP. Puisque les études mécanistiques effectuées par d'autres équipes de recherche n'ont jamais rapporté ce fait, nous posons l'hypothèse que cette augmentation de la transcription pourrait être due à un déséquilibre de liaison entre le locus rs3846662 et le locus rs3761740. Dans l'HF, ces deux polymorphismes pourraient agir de concert pour influencer les niveaux d'ARNm de l'*HMGCR* : cette hypothèse mérite d'être investiguée.

Dans la MA, nous avons découvert que le génotype AA au locus rs3846662 confère une protection contre la MA d'une intensité similaire à celle octroyée par l'*APOE2*. Particulièrement chez les femmes, on observe que les porteurs du génotype AA ont une diminution de leur risque de développer la MA et un âge d'apparition des symptômes de la maladie retardé. Chez les individus également porteur du gène à risque *APOE4*, le génotype AA diminue le risque de conversion du DCL vers la MA et l'accumulation des niveaux de plaques séniles et de DNF. Le constat que les niveaux d'HNRNPA1 diminuent avec l'âge et la MA, que le génotype AA ne corrèle pas avec le ratio d'ARNm  $\Delta 13$  et que les niveaux ou ratios d'ARNm de l'*HMGCR* corrèlent peu avec les différents marqueurs pathologiques de la MA ne sont pas en faveur de l'hypothèse voulant que les effets bénéfiques du rs3846662

résultent d'une action directe sur le système lipidique du SNC. L'étude de tissus cérébraux plus jeunes et affectés par un stade moins avancé de maladie est toutefois nécessaire avant de pouvoir éliminer cette dernière hypothèse.

Somme toute, bien que les résultats présentés dans cette thèse démontrent l'intérêt du locus rs3846662 de l'*HMGCR* pour la MA et l'HF, le niveau actuel de connaissances sur ce polymorphisme ne justifie pas son génotypage chez les patients afin de déterminer leur niveau de risque pour la MA ou leur potentiel de réponse au traitement avec les statines. Par contre, l'impact clinique associé à l'épissage alternatif de l'*HMGCR* nous apparaît d'un potentiel très élevé, et nous espérons que cette thèse pourra contribuer à stimuler la réalisation d'études génétiques et de méthylation de grande envergure sur l'*HMGCR*.

## Bibliographie

---

1. Gauthier, S. (1999) *Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease*. Martin Dunitz Ltd
2. Adlard, P.A., and Cummings, B.J. (2004) Alzheimer's disease--a sum greater than its parts? *Neurobiol Aging* 25, 725-733; discussion 743-726
3. Gagné, C., and Gaudet, D. (2007) *Les dyslipoprotéïnémies : l'approche clinique*. Lipimed communications
4. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430
5. Thompson, P.M., *et al.* (2003) Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23, 994-1005
6. Jeanteur, P., and Tazi, J. (2005) L'épissage alternatif : une nouvelle cible pharmacologique aux potentialités thérapeutiques très larges. *Bull. Acad. Natle Méd.* 189, 949-961
7. Yu, C.Y., *et al.* (2014) HNRNPA1 regulates HMGCR alternative splicing and modulates cellular cholesterol metabolism. *Hum Mol Genet* 23, 319-332
8. Gomez-Isla, T., *et al.* (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17-24
9. Espenshade, P.J., and Hughes, A.L. (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41, 401-427
10. Kamenetz, F., *et al.* (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937
11. Plant, L.D., *et al.* (2003) The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23, 5531-5535
12. Wu, J., *et al.* (1995) beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 6, 2409-2413
13. Wu, J., *et al.* (1995) beta-Amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol* 284, R1-3
14. Hardy, J., and Allsop, D. (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383-388
15. Gotz, J., *et al.* (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491-1495
16. Lewis, J., *et al.* (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491

17. Tanabe, Y., *et al.* (2000) Tau pathology in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC): biochemical and immunohistochemical investigation. *Neuroreport* 11, 2473-2477
18. Gotz, J., *et al.* (2004) Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci* 22, 453-465
19. Delacourte, A., *et al.* (2002) Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398-407
20. WHO (2015) The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
21. WHO (2015) Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
22. Canada, A.S.o. (2010) Rising tide: the impact of dementia on Canadian society. 65, Alzheimer Society of Canada
23. Canada, A.S.o. (2015) About dementia. Alzheimer Society of Canada <http://www.alzheimer.ca/en/About-dementia/Alzheimer-s-disease/Risk-factors>
24. Wollmer, M.A. (2010) Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801, 762-773
25. Hollingworth, P., *et al.* (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43, 429-435
26. Harold, D., *et al.* (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088-1093
27. Lambert, J.C., *et al.* (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094-1099
28. Johnson, J.M., *et al.* (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302, 2141-2144
29. Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2000) The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta* 1529, 9-18
30. Burkhardt, R., *et al.* (2008) Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2078-2084
31. Istvan, E.S., *et al.* (2000) Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J* 19, 819-830
32. Medina, M.W., and Krauss, R.M. (2009) The role of HMGCR alternative splicing in statin efficacy. *Trends Cardiovasc Med* 19, 173-177

33. Medina, M.W., *et al.* (2008) Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin. *Circulation* 118, 355-362
34. Ohashi, K., *et al.* (2003) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *J Biol Chem* 278, 42936-42941
35. Trapani, L., *et al.* (2012) Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic "power station". *World J Hepatol* 4, 184-190
36. Lang, T. (2007) SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol* 585, 693-698
37. Goldstein, J.L., *et al.* (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46
38. Xu, F., *et al.* (2005) Dual roles for cholesterol in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14551-14556
39. Voet, D., and Voet, J.G. (2004) *Biochemistry*. J. Wiley & Sons
40. Simmons, C.R., *et al.* (2011) Evaluation of the global association between cholesterol-associated polymorphisms and Alzheimer's disease suggests a role for rs3846662 and HMGCR splicing in disease risk. *Mol Neurodegener* 6, 62
41. Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45, 1375-1397
42. Mauch, D.H., *et al.* (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354-1357
43. Claudepierre, T., and Pfrieger, F.W. (2003) [New aspects of cholesterol in the central nervous system]. *Med Sci (Paris)* 19, 601-605
44. Yu, C., *et al.* (2010) Proposed mechanism for lipoprotein remodelling in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1801, 819-823
45. Brown, M.S., *et al.* (1973) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2162-2166
46. Saito, K., *et al.* (1997) Marked increases in concentrations of apolipoprotein in the cerebrospinal fluid of poliovirus-infected macaques: relations between apolipoprotein concentrations and severity of brain injury. *Biochem J* 321 ( Pt 1), 145-149
47. Goodrum, J.F. (1990) Cholesterol synthesis is down-regulated during regeneration of peripheral nerve. *J Neurochem* 54, 1709-1715
48. Goodrum, J.F. (1991) Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E. *J Neurochem* 56, 2082-2086

49. Poirier, J., *et al.* (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55, 81-90
50. Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12, 105-112
51. Jurevics, H., and Morell, P. (1995) Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem* 64, 895-901
52. Linton, M.F., *et al.* (1991) Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest* 88, 270-281
53. Pitas, R.E., *et al.* (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262, 14352-14360
54. Fagan, A.M., *et al.* (1999) Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J Biol Chem* 274, 30001-30007
55. Beffert, U., *et al.* (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 27, 119-142
56. Leduc, V., *et al.* (2011) Function and comorbidities of apolipoprotein e in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 974361
57. Grimm, M.O., *et al.* (2007) Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med* 13, 337-344
58. niveaux, L.c.à.t.l. (2015) LES PLAQUES AMYLOÏDES ET LA DÉGÉNÉRESCENCE NEUROFIBRILLAIRE. McGill University
59. Terry, R.D. (2006) Alzheimer's disease and the aging brain. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19, 125-128
60. Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172-1184
61. Hooper, N.M. (2005) Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans* 33, 335-338
62. Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20, 154-159
63. Scheuner, D., *et al.* (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870
64. Zigman, W.B., and Lott, I.T. (2007) Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13, 237-246



65. Olsson, A., *et al.* (2004) Marked increase of beta-amyloid(1-42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurol* 251, 870-876
66. Mochizuki, A., *et al.* (1996) Amyloid load and neural elements in Alzheimer's disease and nondemented individuals with high amyloid plaque density. *Exp Neurol* 142, 89-102
67. Thal, D.R., *et al.* (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791-1800
68. Delacourte, A., *et al.* (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158-1165
69. Iwata, N., *et al.* (2005) Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 108, 129-148
70. Gatz, M., *et al.* (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63, 168-174
71. Gottfries, C.G., *et al.* (1996) Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr* 8, 365-372
72. Svennerholm, L., and Gottfries, C.G. (1994) Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J Neurochem* 62, 1039-1047
73. Mulder, M., *et al.* (1998) Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, 198-203
74. Wallin, A., *et al.* (1989) Decreased myelin lipids in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta Neurol Scand* 80, 319-323
75. Mason, R.P., *et al.* (1992) Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol Aging* 13, 413-419
76. Refolo, L.M., *et al.* (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7, 321-331
77. Shie, F.S., *et al.* (2002) Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455-459
78. Fassbender, K., *et al.* (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5856-5861
79. Kojro, E., *et al.* (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5815-5820

80. Ehehalt, R., *et al.* (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123
81. Chyung, J.H., *et al.* (2005) Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280, 4383-4392
82. Runz, H., *et al.* (2002) Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci* 22, 1679-1689
83. Beffert, U., and Poirier, J. (1996) Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777, 166-174
84. Poirier, J., *et al.* (1995) Apolipoprotein E, synaptic plasticity and Alzheimer's disease. *Ann Med* 27, 663-670
85. Strittmatter, W.J., *et al.* (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981
86. Wisniewski, T., *et al.* (1993) Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 359-365
87. Beffert, U., *et al.* (1998) Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J Neurochem* 70, 1458-1466
88. Beffert, U., *et al.* (1999) Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 68, 181-185
89. Poirier, J., *et al.* (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342, 697-699
90. Farrer, L.A., *et al.* (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349-1356
91. Weisgraber, K.H., *et al.* (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 257, 2518-2521
92. Dong, L.M., *et al.* (1998) The carboxyl terminus in apolipoprotein E2 and the seven amino acid repeat in apolipoprotein E-Leiden: role in receptor-binding activity. *J Lipid Res* 39, 1173-1180
93. Weisgraber, K.H., *et al.* (1994) The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 5, 110-116

94. Mahley, R.W., *et al.* (1999) Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 40, 1933-1949
95. Weisgraber, K.H., *et al.* (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 265, 22453-22459
96. Dong, L.M., *et al.* (1994) Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem* 269, 22358-22365
97. Dong, L.M., and Weisgraber, K.H. (1996) Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 271, 19053-19057
98. Hatters, D.M., *et al.* (2005) Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms. *J Biol Chem* 280, 34288-34295
99. Morrow, J.A., *et al.* (2000) Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry* 39, 11657-11666
100. Acharya, P., *et al.* (2002) Comparison of the stabilities and unfolding pathways of human apolipoprotein E isoforms by differential scanning calorimetry and circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1584, 9-19
101. Clement-Collin, V., *et al.* (2006) The structure of human apolipoprotein E2, E3 and E4 in solution. 2. Multidomain organization correlates with the stability of apoE structure. *Biophys Chem* 119, 170-185
102. Utermann, G., *et al.* (1979) Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin Genet* 15, 63-72
103. Utermann, G. (1985) Apolipoprotein E mutants, hyperlipidemia and arteriosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 183, 173-188
104. Poirier, J. (2005) Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26, 355-361
105. Beffert, U., *et al.* (1999) Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res* 843, 87-94
106. LaDu, M.J., *et al.* (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269, 23403-23406
107. Kim, J., *et al.* (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303

108. Roses, A.D. (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47, 387-400
109. Poirier, J. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 924, 81-90
110. Petersen, R.C., *et al.* (2001) Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56, 1133-1142
111. Corder, E.H., *et al.* (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-184
112. Kehoe, P., *et al.* (1999) A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8, 237-245
113. Blacker, D., *et al.* (2003) Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet* 12, 23-32
114. Porcellini, E., *et al.* (2007) The hydroxy-methyl-glutaryl CoA reductase promoter polymorphism is associated with Alzheimer's risk and cognitive deterioration. *Neurosci Lett* 416, 66-70
115. Rodriguez-Rodriguez, E., *et al.* (2009) Interaction between HMGCR and ABCA1 cholesterol-related genes modulates Alzheimer's disease risk. *Brain Res* 1280, 166-171
116. Jick, H., *et al.* (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631
117. Rockwood, K., *et al.* (2002) Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 59, 223-227
118. Wolozin, B., *et al.* (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57, 1439-1443
119. Wolozin, B., *et al.* (2007) Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Med* 5, 20
120. Feldman, H.H., *et al.* (2010) Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease. LEADe. *Neurology* 74, 956-964
121. Arvanitakis, Z., and Knopman, D.S. (2010) Clinical trial efforts in Alzheimer disease. Why test statins? *Neurology* 74, 945-946
122. Riekse, R.G., *et al.* (2006) Effect of statins on Alzheimer's disease biomarkers in cerebrospinal fluid. *J Alzheimers Dis* 10, 399-406
123. Li, G., *et al.* (2007) Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* 69, 878-885

124. Amano, M., *et al.* (2003) Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem* 87, 780-790
125. Hanger, D.P., *et al.* (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147, 58-62
126. Mandelkow, E.M., *et al.* (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314, 315-321
127. Hooper, C., *et al.* (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104, 1433-1439
128. Pei, J.J., *et al.* (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1010-1019
129. Leduc, V., *et al.* (2010) APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*
130. Meek, T.H., *et al.* (2010) Western diet increases wheel running in mice selectively bred for high voluntary wheel running. *Int J Obes (Lond)* 34, 960-969
131. Shepherd, J. (2004) Lipids in health and disease. *Biochem Soc Trans* 32, 1051-1056
132. Crook, M. (2012) *Clinical biochemistry & metabolic medicine*. Hodder Arnold
133. Spady, D.K. (1999) Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 100, 576-578
134. Simon, M. (2009) Les apolipoprotéines & transports des lipides. <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/les-apolipoproteines-transports-des-lipides.html>
135. Friedewald, W.T., *et al.* (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18, 499-502
136. Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, 1160-1164
137. Chasman, D.I., *et al.* (2004) Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 291, 2821-2827
138. Shear, C.L., *et al.* (1992) Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results. Effect of patient characteristics on lovastatin-induced changes in plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Circulation* 85, 1293-1303

139. Hunt, D., *et al.* (2001) Benefits of pravastatin on cardiovascular events and mortality in older patients with coronary heart disease are equal to or exceed those seen in younger patients: Results from the LIPID trial. *Ann Intern Med* 134, 931-940
140. Simon, J.A., *et al.* (2006) Phenotypic predictors of response to simvastatin therapy among African-Americans and Caucasians: the Cholesterol and Pharmacogenetics (CAP) Study. *Am J Cardiol* 97, 843-850
141. Krauss, R.M., *et al.* (2008) Variation in the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene is associated with racial differences in low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin treatment. *Circulation* 117, 1537-1544
142. Chasman, D.I., *et al.* (2012) Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet* 5, 257-264
143. Hennen, G. (2001) *Endocrinologie*. De Boeck Supérieur
144. Davignon, J., and Roy, M. (1993) Familial hypercholesterolemia in French-Canadians: taking advantage of the presence of a "founder effect". *Am J Cardiol* 72, 6D-10D
145. Laberge, A.M., *et al.* (2005) Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet* 68, 287-301
146. Betard, C., *et al.* (1992) Molecular genetic evidence for a founder effect in familial hypercholesterolemia among French Canadians. *Hum Genet* 88, 529-536
147. Bettens, K., *et al.* (2010) Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet*
148. Bernier, L., *et al.* (2008) Two new large deletions in the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene not revealed by PCR-based molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197, 118-124
149. Hobbs, H.H., *et al.* (1987) Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 317, 734-737
150. Betard, C., *et al.* (1996) Influence of genetic variability in the nondeletion LDL-receptor allele on phenotypic variation in French-Canadian familial hypercholesterolemia heterozygotes sharing a 'null' LDL-receptor gene defect. *Atherosclerosis* 119, 43-55
151. Logan, J., *et al.* (2009) *Real-time PCR : current technology and applications*. Caister Academic Press
152. Chang, T.J., *et al.* (1998) Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 5, 469-471

153. Schroder, A.L., *et al.* (2009) Estrogen modulates expression of putative housekeeping genes in the mouse uterus. *Endocrine* 35, 211-219
154. Andersen, C.L., *et al.* (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250
155. Pfaffl, M.W., *et al.* (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515
156. Vandesompele, J., *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034
157. Gutala, R.V., and Reddy, P.H. (2004) The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods* 132, 101-107
158. Barrachina, M., *et al.* (2006) TaqMan PCR assay in the control of RNA normalization in human post-mortem brain tissue. *Neurochem Int* 49, 276-284
159. Coulson, D.T., *et al.* (2008) Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Mol Biol* 9, 46
160. Ceelen, L., *et al.* (2011) Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochem Pharmacol*
161. Kern, A., and Behl, C. (2009) The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1124-1132
162. Aviram, M., *et al.* (1998) Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 31, 39-45
163. Leduc, V., *et al.* (2009) Involvement of paraoxonase 1 genetic variants in Alzheimer's disease neuropathology. *Eur J Neurosci* 30, 1823-1830
164. Ng, C.J., *et al.* (2001) Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276, 44444-44449
165. Mackness, B., *et al.* (2010) Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* 62, 480-482
166. McKhann, G., *et al.* (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939-944

167. Khachaturian, Z.S. (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 42, 1097-1105
168. Hoerndli, F.J., *et al.* (2004) Reference genes identified in SH-SY5Y cells using custom-made gene arrays with validation by quantitative polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 335, 30-41
169. Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193
170. Warrington, J.A., *et al.* (2000) Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2, 143-147
171. Hsiao, L.L., *et al.* (2001) A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 7, 97-104
172. Nishimura, M., and Naito, S. (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20, 452-477
173. Pfaffl, M.W., *et al.* (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36
174. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25, 402-408
175. Lyahyai, J., *et al.* (2010) Effect of scrapie on the stability of housekeeping genes. *Anim Biotechnol* 21, 1-13
176. Gibson, G.E., *et al.* (2008) Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 221-232
177. Kalaria, R.N., *et al.* (2008) Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7, 812-826
178. Petersen, R.C., *et al.* (2005) Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 352, 2379-2388
179. Morris, J.C., *et al.* (2001) Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58, 397-405
180. Petersen, R.C., *et al.* (1995) Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *Jama* 273, 1274-1278
181. Petersen, R.C., *et al.* (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56, 303-308
182. Gatz, M., *et al.* (2005) Complete ascertainment of dementia in the Swedish Twin Registry: the HARMONY study. *Neurobiol Aging* 26, 439-447



183. Raiha, I., *et al.* (1997) Alzheimer's disease in twins. *Biomed Pharmacother* 51, 101-104
184. Corder, E.H., *et al.* (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923
185. Saunders, A.M., *et al.* (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472
186. Benjamin, R., *et al.* (1994) Protective effect of apoE epsilon 2 in Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 473
187. de Leon, M.J., *et al.* (2001) Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10966-10971
188. Carrasquillo, M.M., *et al.* (2010) Concordant association of insulin degrading enzyme gene (IDE) variants with IDE mRNA, Aβeta, and Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e8764
189. Shen, L., *et al.* (2010) Whole genome association study of brain-wide imaging phenotypes for identifying quantitative trait loci in MCI and AD: A study of the ADNI cohort. *Neuroimage* 53, 1051-1063
190. Ohm, T.G., *et al.* (2003) Cholesterol and tau protein--findings in Alzheimer's and Niemann Pick C's disease. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 2, S120-126
191. Hofman, A., *et al.* (1997) Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349, 151-154
192. Marchant, N.L., *et al.* (2013) The aging brain and cognition: contribution of vascular injury and abeta to mild cognitive dysfunction. *JAMA Neurol* 70, 488-495
193. Wollmer, M.A., *et al.* (2007) Association study of cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 8, 179-188
194. Aulchenko, Y.S., *et al.* (2009) Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 41, 47-55
195. Dea, D., Théroux, L., Legault, V., Leduc, V., Poirier, J. (2010) HMG-COA reductase as a risk factor and modulator of Alzheimer pathology. In *11<sup>th</sup> International Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders*, S191, Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association
196. Gagnon, A., *et al.* (2006) Transmission of migration propensity increases genetic divergence between populations. *Am J Phys Anthropol* 129, 630-636
197. Royo, J.L., *et al.* (2007) Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping. *Nat Protoc* 2, 1734-1739

198. Li, G., *et al.* (2004) Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology* 63, 1624-1628
199. Rea, T.D., *et al.* (2005) Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol* 62, 1047-1051
200. Haag, M.D., *et al.* (2009) Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 13-17
201. Bettermann, K., *et al.* (2011) Statins, risk of dementia, and cognitive function: secondary analysis of the ginkgo evaluation of memory study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 21, 436-444
202. Badimon, L., and Vilahur, G. (2012) LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 1254, 18-32
203. Jermendy, G., *et al.* (2011) Effect of genetic and environmental influences on cardiometabolic risk factors: a twin study. *Cardiovasc Diabetol* 10, 96
204. Heller, D.A., *et al.* (1993) Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 328, 1150-1156
205. Elder, S.J., *et al.* (2009) Genetic and environmental influences on factors associated with cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *J Lipid Res* 50, 1917-1926
206. Li, S., *et al.* (2013) Heritability of eleven metabolic phenotypes in Danish and Chinese twins: a cross-population comparison. *Obesity (Silver Spring)* 21, 1908-1914
207. Schmitz, G., *et al.* (2007) Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* 18, 164-173
208. Hiura, Y., *et al.* (2010) Association of the functional variant in the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase gene with low-density lipoprotein-cholesterol in Japanese. *Circ J* 74, 518-522
209. Lu, Y., *et al.* (2010) Exploring genetic determinants of plasma total cholesterol levels and their predictive value in a longitudinal study. *Atherosclerosis* 213, 200-205
210. Chung, J.Y., *et al.* (2012) Effect of HMGCR variant alleles on low-density lipoprotein cholesterol-lowering response to atorvastatin in healthy Korean subjects. *J Clin Pharmacol* 52, 339-346
211. Medina, M.W., *et al.* (2011) Coordinately regulated alternative splicing of genes involved in cholesterol biosynthesis and uptake. *PLoS One* 6, e19420
212. Marais, A.D. (2004) Familial hypercholesterolaemia. *Clin Biochem Rev* 25, 49-68
213. Hobbs, H.H., *et al.* (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24, 133-170

214. Roy, M., *et al.* (1995) Impact of a common mutation of the LDL receptor gene, in French-Canadian patients with familial hypercholesterolemia, on means, variances and correlations among traits of lipid metabolism. *Clin Genet* 47, 59-67
215. Ferrieres, J., *et al.* (1994) Apolipoprotein E polymorphism and heterozygous familial hypercholesterolemia. Sex-specific effects. *Arterioscler Thromb* 14, 1553-1560
216. Carmena, R., *et al.* (1993) The response to lovastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia is modulated by apolipoprotein E polymorphism. *Metabolism* 42, 895-901
217. Leduc, V., *et al.* (2014) HMGCR is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to Alzheimer's disease in a three cohorts study. *Mol Psychiatry*
218. Saavedra, Y.G., *et al.* (2014) PCSK9 R46L, Lower LDL, and Cardiovascular Disease Risk in Familial Hypercholesterolemia: A Cross-Sectional Cohort Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2700-2705
219. Ma, Y.H., *et al.* (1989) Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet* 36, 219-228
220. Leduc, V., *et al.* (2011) Normalization of gene expression using SYBR green qPCR: a case for paraoxonase 1 and 2 in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Methods* 200, 14-19
221. Ferrieres, J., *et al.* (1995) Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation. *Circulation* 92, 290-295
222. O'Malley, J.P., and Illingworth, D.R. (1990) The influence of apolipoprotein E phenotype on the response to lovastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 39, 150-154
223. De Knijff, P., *et al.* (1990) Influence of apo E polymorphism on the response to simvastatin treatment in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 83, 89-97
224. Dallongeville, J., *et al.* (1991) Apolipoprotein E polymorphism association with lipoprotein profile in endogenous hypertriglyceridemia and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 11, 272-278
225. Innerarity, T.L., *et al.* (1983) The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J Biol Chem* 258, 12341-12347
226. Yamamoto, T., *et al.* (2008) Apolipoprotein E isoform-specific binding to the low-density lipoprotein receptor. *Anal Biochem* 372, 222-226

227. Nestruck, A.C., *et al.* (1987) Apolipoprotein E polymorphism and plasma cholesterol response to probucol. *Metabolism* 36, 743-747
228. Kwiterovich, P.O.J. (2012) *The Johns Hopkins textbook of dyslipidemia*. Lippincott Williams & Wilkins
229. Kesaniemi, Y.A., *et al.* (1987) Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 80, 578-581
230. Sarkkinen, E., *et al.* (1998) Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid response to the separate modification of dietary fat and dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr* 68, 1215-1222
231. O'Neill, F.H., *et al.* (2001) Determinants of variable response to statin treatment in patients with refractory familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 832-837
232. Ma, L., *et al.* (2012) Knowledge-driven analysis identifies a gene-gene interaction affecting high-density lipoprotein cholesterol levels in multi-ethnic populations. *PLoS Genet* 8, e1002714
233. Wolf, J.B., *et al.* (2000) *Epistasis and the evolutionary process*. Oxford University Press
234. Mode, A., and Gustafsson, J.A. (2006) Sex and the liver - a journey through five decades. *Drug Metab Rev* 38, 197-207
235. Gazzo, P., *et al.* (2012) Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev* 64, 102-146
236. Chouker, A., *et al.* (2004) Estimation of liver size for liver transplantation: the impact of age and gender. *Liver Transpl* 10, 678-685
237. Gelman, A., and Weakliem, D. (2009) Of beauty, sex, and power. *American Scientist* 97, 310-316
238. Kapur, N.K., and Musunuru, K. (2008) Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 4, 341-353
239. Naoumova, R.P., *et al.* (1996) Plasma mevalonic acid, an index of cholesterol synthesis in vivo, and responsiveness to HMG-CoA reductase inhibitors in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 119, 203-213
240. Azevedo, F.A., *et al.* (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513, 532-541
241. Etienne, P., *et al.* (1986) Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease. *Neuroscience* 19, 1279-1291

242. Spies, P.E., *et al.* (2013) Alzheimer biomarkers and clinical Alzheimer disease were not associated with increased cerebrovascular disease in a memory clinic population. *Curr Alzheimer Res* 11, 40-46
243. Khatoun, S., *et al.* (1992) Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59, 750-753
244. Verdile, G., *et al.* (2004) Protein markers for Alzheimer disease in the frontal cortex and cerebellum. *Neurology* 63, 1385-1392
245. Kamma, H., *et al.* (1995) Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res* 221, 187-196
246. Patry, C., *et al.* (2003) Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res* 63, 7679-7688
247. Biamonti, G., *et al.* (1993) Human hnRNP protein A1 gene expression. Structural and functional characterization of the promoter. *J Mol Biol* 230, 77-89
248. Boukakis, G., *et al.* (2010) Deregulated expression of hnRNP A/B proteins in human non-small cell lung cancer: parallel assessment of protein and mRNA levels in paired tumour/non-tumour tissues. *BMC Cancer* 10, 434
249. Ushigome, M., *et al.* (2005) Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol* 26, 635-640
250. Pino, I., *et al.* (2003) Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* 41, 131-143
251. Jean-Philippe, J., *et al.* (2013) hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci* 14, 18999-19024
252. Hubbard, K., *et al.* (1995) Alteration of DNA and RNA binding activity of human telomere binding proteins occurs during cellular senescence. *Exp Cell Res* 218, 241-247
253. Shimada, N., *et al.* (2009) p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts. *RNA Biol* 6, 293-304
254. Berson, A., *et al.* (2013) Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol Med* 4, 730-742
255. Meng, Y., *et al.* (2015) High Maternal Serum Estradiol Levels Induce Dyslipidemia in Human Newborns via a Hepatic HMGCR Estrogen Response Element. *Sci Rep* 5, 10086

256. Keller, L., *et al.* (2010) A functional polymorphism in the HMGCR promoter affects transcriptional activity but not the risk for Alzheimer disease in Swedish populations. *Brain Res* 1344, 185-191
257. Brookmeyer, R., *et al.* (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3, 186-191

# Annexe 1 – Curriculum vitae abrégé

---

## Formation académique et bourses reçues

<b>MD/Ph.D. sciences biomédicales</b> , université de Montréal	2011 à ce jour
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bourse MD/Ph.D. (IRSC)</li><li>• Bourse du Canadian Stroke Network</li></ul>	
<b>Ph.D. neurosciences</b> , université McGill (transféré en sciences biomédicales)	2008-2011
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bourse d'études supérieures du Canada - bourse au doctorat (<i>IRSC</i>)</li><li>• Bourse au doctorat (<i>FRSQ et Société Alzheimer Canada</i>)</li><li>• Bourse de stage international (<i>FRSQ</i>)</li><li>• Bourse de recrutement de l'université McGill</li></ul>	
<b>Certificat en développement de produits pharmaceutiques</b> , université Laval	2008-2009
<b>M.Sc. sciences neurologiques</b> , université McGill	2005-2008
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bourse d'études supérieures du Canada - Bourse à la maîtrise (IRSC)</li><li>• Bourse de recrutement Max Stern de l'université McGill</li></ul>	
<b>B.Sc. biochimie</b> , UQAM	2002-2005
<ul style="list-style-type: none"><li>• Médaille académique d'argent du Gouverneur général du Canada</li><li>• Bourse de premier cycle du CRSNG</li><li>• Bourses Thi Tam Huynh, Meloche Monnex et Boehringer Ingelheim</li><li>• Bourses de recrutement des universités de Montréal et de Sherbrooke</li></ul>	
<b>Technicienne en Biotechnologies (DEC)</b> , Collège Ahuntsic	1998-2002

## Expériences de recherche

<b>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire</b> (Nice/France) Dr Frédéric Checlerc	Hiver 2009
<b>Prometic BioSciences Inc.</b> (Montréal) Dr Lyne Gagnon	Étés 2002, 2003, 2004
<b>UQAM</b> (Montréal) Dr Diana Averill	Hiver 2004
<b>INRS Institut Armand Frappier</b> (Laval) Dr Monique Lacroix	Été 2001

## **Expériences connexes de bénévolat**

<b>BioTech Annecto</b> Hôtesse lors des soirées de réseautage entre professionnels	2010-2013
<b>Société Alzheimer de Montréal</b> Bénévolat au centre d'activité de Lachine	2010-2012
<b>Groupe d'intérêt en médecine familiale de l'UdeM</b> Membre du comité organisateur des soupers mentorat	2011-2012

## **Publications scientifiques**

### **Articles pubmed**

- **Leduc V**, Bourque L, Poirier J & Dufour R (2016) Role of rs3846662 and HMGCR alternative splicing in statin efficacy and baseline lipid levels in familial hypercholesterolemia. *Pharmacogenet Genomics*, Jan; 26 (1) :1-11.
- **Leduc V**, Theroux L, Dea D, Dufour R & Poirier J (2015) Effects of rs3846662 variants on HMGCR mRNA and protein levels and on markers of Alzheimer's disease pathology. *J Mol Neurosci.*, Nov 5 (Epub ahead of print).
- **Leduc V**, De Beaumont L, Thérroux L, Dea D, Aisen P, Petersen RC; the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Dufour R, Poirier J. (2015) HMGCR is a genetic modifier for risk, age of onset and MCI conversion to Alzheimer's disease in a three cohorts study. *Mol Psychiatry*, Jul; 20 (7) : 867-73.
- **Leduc V**, Legault V, Dea D and Poirier J (2011) Normalization of gene expression using SYBR green qPCR: A Case for Paraoxonase 1 and 2 in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Methods*. 200(1): 14-19.
- **Leduc V**, Domenger D, De Beaumont L, Lalonde D, Bélanger-Jasmin S and Poirier J (2011) Function and Comorbidities of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*. Article ID 974361, 22 pages
- **Leduc V**, Bélanger-Jasmin S, and Poirier J (2010) APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 16(10): 469-477.
- **Leduc V**, Thérroux L, Dea D, Robitaille Y, and Poirier J (2009) Involvement of paraoxonase 1 genetic variants in Alzheimer's disease neuropathology. *Eur J Neurosci*. 30(9): 1823-1830
- **Leduc V**, and Poirier J (2008) Polymorphisms at the PON1 L55M and Q192R loci affect the pathophysiology of Alzheimer's disease: emphasis on the cholinergic system and beta-amyloid levels. *Neurodegenerative Dis*. 5: 225-227.

### **Livre**

- **Leduc V** (2010) Exploring Alzheimer's disease etiology, Genetic markers of neurodegeneration: a role for paraoxonase 1 in Alzheimer's disease? VDM Verlag Dr. Müller Aktiengesellschaft & Co. KG, 96p, ISBN 978-3-639-27399-1.