

2m11.3441.3

Université de Montréal

Implication de la convertase NARC-1 / PCSK9 au cours de la différenciation neuroectodermale

par
Steve Poirier

Programmes de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences
en Biologie Moléculaire

Mai, 2006

© Steve Poirier, 2006



QH

506

054

206

V.035

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Implication de la convertase NARC-1 / PCSK9
au cours de la différenciation neuroectodermale

présenté par :
Steve Poirier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michel Bouvier, président-rapporteur
Dr. Nabil G. Seidah, directeur de recherche
Dr. Majambu Mbikay, examinateur externe

Résumé

Récemment, plusieurs mutations naturelles pour la convertase de proprotéines NARC-1/PCSK9 furent directement associées à une forme d'hyper- et d'hypocholestérolémie familiale résultant en un gain ou une perte de fonction, respectivement. Il fut démontré que l'action de NARC-1/PCSK9 est d'augmenter la dégradation, indirectement et par un mécanisme inconnu, du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR), qui est responsable de la clairance du cholestérol contenu dans les particules LDL (LDL-C). Par hybridation *in situ*, nous avons observé que NARC-1/PCSK9 est fortement exprimée dans le foie, l'intestin, le rein ainsi que dans des centres à forte activité neurogénique (télencéphale, cervelet et bulbe olfactif). Puisque le rôle de cette convertase dans le système nerveux central (SNC) demeure méconnu, nous avons donc étudié le rôle de NARC-1/PCSK9 lors de la différenciation neuroectodermale des cellules P19. Par PCR en temps réel, nous avons observé une forte augmentation transitoire du messenger NARC-1/PCSK9 dans les premiers jours de différenciation suivie d'une forte répression. Pour ce qui est des convertases SKI-1 et Furine, on a remarqué que leurs niveaux d'expression sont plutôt constants tandis que PC5/6 et PC2 sont plutôt exprimées dans les jours concordant avec le phénotype différencié. Bien qu'il fût rapporté que le facteur de transcription cholestérogénique SREBP-2 régule la transcription de la convertase NARC-1/PCSK9 et que celle-ci dégrade le LDLR, lors de la différenciation neuroectodermale des P19, SREBP-2 ne semble pas réguler NARC-1/PCSK9 et les niveaux protéiques du LDLR demeurent inchangés. Lorsque nous avons atténué l'ARNm de NARC-1/PCSK9 chez le poisson zèbre, nous avons observé une désorganisation généralisée du SNC culminant à la létalité embryonnaire. Cette étude suggère donc que la convertase NARC-1/PCSK9 possède une fonction distincte dans le SNC que celle présente dans le métabolisme du cholestérol.

Mots-clés : NARC-1/PCSK9; convertase de proprotéines; neurogenèse; différenciation neuronale; HMG-CoA reductase, LDLR, cholestérol; SREBP; zebrafish; morpholino; QPCR; acide all-*trans* rétinoïque; cellules P19.

Abstract

NARC-1/PCSK9 is a proprotein convertase recently described to play a major role in cholesterol homeostasis through enhanced degradation of the LDL receptor (LDLR) and possibly neurogenesis. Herein, we investigated the neurogenic potential of this proteinase by quantitative RT-PCR analysis of its mRNA expression profile during neuronal differentiation by all-*trans* retinoic acid of the mouse pluripotent P19 cells. We observed a unique expression pattern, with NARC-1/PCSK9 mRNA levels peaking at day 2 of differentiation and falling off thereafter. This pattern was not regulated by the cholesterologenic transcription factor SREBP-2, which normally upregulates NARC-1/PCSK9 levels in liver. Furthermore, in P19 cells the protein level of the endogenous LDLR was unaffected. This agrees with the unique expression pattern of NARC-1/PCSK9 in the central nervous system (CNS), including the cerebellum, where the LDLR is not significantly expressed. Whole mount *in situ* hybridization in zebrafish revealed that a similar pattern of expression to mouse NARC-1/PCSK9 both in CNS and periphery. Knockdown of its mRNA in zebrafish resulted in a general disorganization of the cerebellar neurons and loss of hindbrain-midbrain boundaries, leading to embryonic death at 96h post fertilization. These data support a novel role for NARC-1/PCSK9 in neurons, distinct from cholesterologenic organs such as liver.

Keywords : NARC-1/PCSK9; proprotein convertase; neurogenesis; neuronal differentiation; HMG-CoA reductase, LDLR, cholesterol; SREBP; zebrafish; morpholino; QPCR; all-*trans* retinoic acid; P19 cells.

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 STRUCTURE ET FONCTION DES CONVERTASES DE PROPROTÉINES.....	1
1.1.1 Homologie et structure moléculaire des convertases de proprotéines.....	1
1.1.2 Le prosegment et le mécanisme d'activation.....	9
1.1.3 Spécificité enzymatique des convertases de proprotéines.....	15
1.1.4 Distribution tissulaire et localisation cellulaire.....	26
1.1.5 Ablations géniques (Knockout) des PCs et pathologies.....	28
1.2 NARC-1/PCSK9 (NEURAL APOPTOSIS-REGULATED CONVERTASE-1/PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN 9)	33
1.2.1 Structure et fonction de NARC-1/PCSK9	33
1.2.2 Implication de NARC-1/PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol.....	35
1.2.3 Régulation transcriptionnelle de NARC-1/PCSK9	36
1.2.4 Rôle de NARC-1/PCSK9 au cours de la neurogenèse	38
1.3 LES CELLULES DE CARCINOMES EMBRYONNAIRES P19 COMME MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION NEURONALE.....	38
1.4 DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE	42
CHAPITRE II : MANUSCRIT :	44
CHAPITRE III : DISCUSSION	94
CONCLUSION	107
BIBLIOGRAPHIE	108

Liste des tableaux

TABLEAU I:	20
TABLEAU II:	30

Liste des figures

FIGURE 1 :	4
FIGURE 2 :	5
FIGURE 3 :	19
FIGURE 4 :	21
FIGURE 5 :	23
FIGURE 6 :	24
FIGURE 7 :	39
FIGURE 8 :	40
FIGURE 9 :	I
FIGURE 10 :	II
FIGURE 11 :	III
FIGURE 12 :	IV
FIGURE 13 :	V
FIGURE 14 :	VI

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Nabil Seidah pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que le Dre. Annik Prat. Je suis tout particulièrement reconnaissant pour la confiance et l'intérêt qu'ils ont porté à ce projet. Je tiens aussi à souligner l'appui du Dre. Joanne Paquin et de celui d'Ann Chamberland. Finalement, je remercie tous les gens du laboratoire pour leur contribution à mon épanouissement personnel et professionnel.

Chapitre I : Introduction

1.1 Structure et fonction des convertases de proprotéines

1.1.1 Homologie et structure moléculaire des convertases de proprotéines

Les protéases sont des enzymes impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques, notamment dans le développement embryonnaire, la reproduction, la défense immunitaire ainsi que dans de nombreuses pathologies telles que les maladies infectieuses, les désordres neurologiques et le cancer. Une étude comparative des génomes humain et murin a permis de chiffrer respectivement les diverses protéases à 553 et 628 et de les classer, de manière caractéristique, ces enzymes qui constituent en soient le dégradome. On retrouve cinq types de protéases répertoriées en deux groupes : le premier groupe, « *aspartique* » et « *métallo* », utilise une molécule d'eau comme nucléophile pour attaquer le lien peptidique du substrat. À titre d'exemple, la *signal peptide peptidase* (SPP), qui est une protéase aspartique, catalyse la coupure intramembranaire du peptide signal des protéines entrant dans la voie sécrétoire cellulaire. Pour les métalloprotéases, on retrouve notamment les MMPs (*matrix metalloproteinases*) ainsi que les ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) qui sont impliquées respectivement dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans le relargage de protéines membranaires dans le milieu extracellulaire comme des facteurs de croissance, des cytokines et des récepteurs.^{1,2} Pour ce qui est du deuxième groupe, ce sont des enzymes qui utilisent directement un de leurs acides aminés lors des réactions protéolytiques soit des protéases à cystéine, thréonine ou sérine.³ Tout d'abord, dans la classe des protéases

à cystéine, on retrouve les caspases qui sont des enzymes clés dans la mort programmée cellulaire par apoptose.⁴ La famille des γ -glutamyl transférases, qui catabolisent le glutathion en acide glutamique, font partie des protéases à thréonine.³ Les proprotéines convertases (PCs), qui font partie intégrante de cette ouvrage, sont des protéases à sérine responsables de la protéolyse de nombreux précurseurs (hormones, glycoprotéines virales, récepteurs, etc.)⁵

Au début des années quatre-vingt, une souche mutante de la levure *Saccharomyces cerevisiae* fut identifiée de par son incapacité à produire deux peptides biologiquement actifs à partir de précurseurs protéiques soit : le facteur de conjugaison α et la toxine *killer* 2. Le gène responsable de la coupure et par le fait même de l'activation de ces molécules fut identifié par complémentation génétique et fut nommé *Kex2* (*killer expression 2*). Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire de 812 acides aminés. Cette protéine possède la capacité de couper des précurseurs protéiques à des sites dibasiques (*i.e.* Lys-Arg et/ou Arg-Arg) avec l'aide de certains acides aminés soit un acide aspartique (Asp), une histidine (His) et une sérine (Ser) qui constituent la triade catalytique.^{6,7} Chose intéressante, lorsque *Kex2* fut exprimée dans des cellules de mammifères, celle-ci est capable de couper divers précurseurs dont la proinsuline et la pro-opiomélanocortine (POMC) permettant ainsi de sécréter des formes matures pour ces hormones dont l'insuline, la gamma-lipotropine et la β -endorphine (1-31), respectivement.⁸ Subséquemment, ces observations ont conduit à la découverte de l'homologue du gène *Kex2* chez les mammifères soit le gène *fur* qui possède environ 50% de similitude avec cette molécule ancestrale.⁹ Le gène *fur* code pour une convertase de proprotéines

transmembranaire appelée communément Furine. Celle-ci possède les mêmes caractéristiques que l'endoprotéase Kex2 en ce qui attrait aux coupures de précurseurs à des sites dibasiques. Ensuite, ceci a permis d'identifier et de mettre en évidence, par analogie avec le gène *fur*, deux autres membres de la famille des convertases de proprotéines soit PC1 et PC2. Chez les mammifères, les convertases PC1 et PC2 sont responsables de la coupure du précurseur POMC à différents sites basiques libérant ainsi plusieurs hormones biologiquement actives. Dans l'hypophyse, on retrouve principalement la convertase PC1 dans la partie antérieure où la POMC est coupée en adénocorticotropine (ACTH) et en β -lipotropine (β -LPH). Dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse et de l'hypothalamus (voir Figure 4, p.20), c'est plutôt PC2 qui fonctionne séquentiellement par rapport à PC1 en coupant la POMC de nouveau pour libérer l' α -mélanotropine (α -MSH) et la β -endorphine (β -END).¹⁰ Outre le précurseur POMC, il fut aussi démontré que PC1 et PC2 coupent d'autres précurseurs dont la proinsuline dans les cellules β du pancréas produisant ainsi la forme active de cette hormone.¹¹

Depuis, on connaît neuf membres de la famille des convertases de proprotéines qui font parties de la famille des subtilases et qui sont regroupés selon leurs homologies avec des protéases ancestrales. Tout d'abord, on dénombre sept convertases propres à la sous-famille *subtilisin/kexin-like* soit la Furine, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6, PC7 qui possèdent des motifs de coupures dibasiques. SKI-1/S1P, le huitième membre, est une convertase de la sous-famille de la *pyrolysin* qui possède un motif de reconnaissance hydrophobique qui sera discuté ultérieurement. La neuvième, NARC-1/PCSK9 fait plutôt partie de la famille associée à la *protéinase K* (voir Fig.1, p.4).

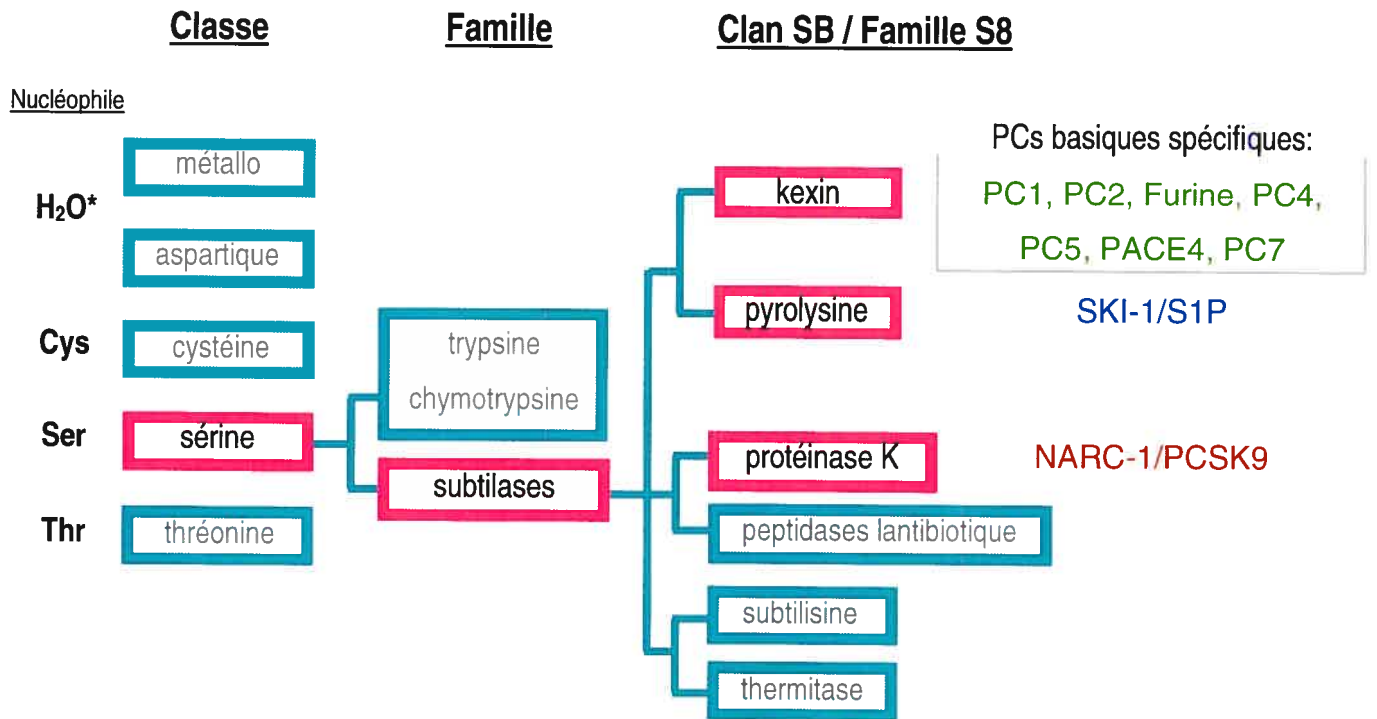


Figure 1: Arbre phylogénique des convertases de proprotéines basé sur l'alignement des domaines catalytiques.

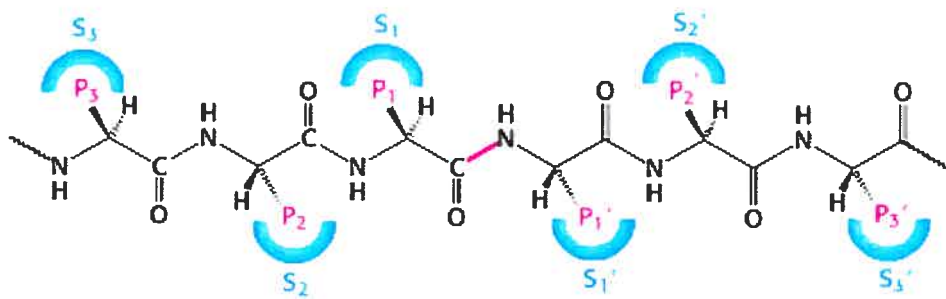


Figure 2 : Nomenclature des résidus impliqués dans la coupure de molécules précurseurs par les convertases de proprotéines. Le lien peptidique illustré en rose est le site de coupure désignant ainsi les résidus avoisinants soit en nombres primes (i.e. P1') en partant de l'extrémité N-terminale du nouveau peptide et les nombres entier à partir de l'extrémité du C-terminale. Les demi sphères illustrent les résidus propres à l'enzyme qui participent à l'interaction avec le substrat.

Les convertases de proprotéines comportent plusieurs domaines leurs conférant une structure moléculaire propre. Premièrement, en région N-terminal, on retrouve le peptide signal qui est suivi d'une prorégion, d'un domaine catalytique, d'un domaine P et d'une région C-terminale qui est souvent riche en cystéines et histidines. Le peptide signal, propre aux protéines de la voie sécrétoire, est une région composée de résidus à caractère hydrophobique qui permet aux protéines nouvellement synthétisées de quitter le cytosol et d'entrer dans le réticulum endoplasmique.

La prorégion des convertases de proprotéines sert au bon repliement de l'enzyme en modulant temporairement l'activité enzymatique, puisque celle-ci demeure liée au domaine catalytique jusqu'à ce que les conditions et les lieux propices soient rencontrés. Comme discuté précédemment, on retrouve, dans le noyau de l'enzyme, une triade catalytique fortement conservée composée d'un acide aspartique, d'une histidine et d'une sérine. En plus de ces acides aminés essentiels, les résidus avoisinants, à l'intérieur de la pochette enzymatique, imposent un certain environnement spécifique qui est propre à chacune des convertases. Dans la pochette enzymatique, on retrouve aussi une asparagine qui est très importante pour l'activité des convertases. Cette asparagine fait partie intégrante de la poche de l'oxyanion qui, lors de l'état de transition de l'enzyme avec le substrat, participe à la formation d'un intermédiaire tétraédrique. Cette poche sert donc d'environnement stabilisateur pour la charge négative qui est portée par l'oxygène du carbonyle. Cette stabilisation, possible grâce à la formation d'un pont hydrogène engendré par la chaîne latérale de l'asparagine, est d'une grande importance dans l'équilibre électrostatique de l'enzyme pour une pleine activité.¹² Chose intéressante, dans la

pochette enzymatique de la convertase PC2, l'asparagine de la poche de l'oxyanion est remplacée par un acide aspartique. Il fut suggéré que cette particularité pourrait être expliquée de par son unique capacité à lier 7B2, qui est à la fois une protéine chaperonne et inhibitrice spécifique pour cette convertase.¹³

Ensuite, on retrouve le domaine P qui est une région située immédiatement après la pochette enzymatique. Cette région est aussi très importante pour le bon repliement et l'activation intramoléculaire du zymogène dans le réticulum endoplasmique. Il fut démontré que l'absence de ce domaine ralentissait considérablement la coupure autocatalytique des convertases et par conséquent, le relâchement de la prorégion. La plupart des convertases, à l'exception de PC7, possèdent une séquence en acides aminés conservée au milieu de leur domaine P soit **RRGDL**. Cette région contient une séquence canonique de liaison aux intégrines **RGD**. Des études, par mutagenèse dirigée, ont montré que le mutant **RGE**, dans le domaine P de PC1, diminuait fortement son autoactivation dans le réticulum endoplasmique ce qui, engendre un mauvais adressage subcellulaire de cette convertase vers la voie de sécrétion constitutive plutôt que dans les granules de sécrétion où elle réside normalement.¹⁴

Suite au domaine P, on retrouve une région C-terminale qui varie beaucoup au sein des convertases. PC1 et PC2 présentent des profils d'hélices amphipatiques en C-terminale qui seraient impliquées dans leurs adressages vers les granules de sécrétion.¹⁵ Pour les convertase Furine, PACE4 et PC5, elles contiennent plutôt des domaines riches en cystéines selon un motif répété (**C-X₉₋₁₆-C-X₂-C-X₃-C-X₂-C-X₅₋₇-C-X₂-C-X₈₋₁₅-C-X₃**)

allant de 2 à 22 fois. Les fonctions biologiques de ces domaines demeurent encore très peu connues bien qu'il fut rapporté que pour PC5, ce domaine participe à la stabilisation de sa pochette catalytique et que pour la Furine, ce domaine est plutôt impliqué dans le relargage dans le milieu extracellulaire de cette convertase.^{16,17} Il fut aussi rapporté que l'isoforme PC5A (épissage alternatif de l'ARNm de PC5) ainsi que PACE4, qui sont des convertases sécrétées dans le milieu extracellulaire, peuvent être retenues à la surface cellulaire par leurs domaines riche en cystéine.¹⁸

L'équipe de Than et *coll.* a récemment publiée une étude portant sur les diverses structures tridimensionnelles des convertases basés sur les cristaux obtenus à partir des formes solubles de la Furine et de Kex2.¹⁹ Ils ont observé que dans la famille des PCs, PC4 possède une très forte similitude avec la Furine tandis que PC7 est plutôt structurellement différente. Dans le domaine catalytique des convertases, on retrouve un feuillet β hautement tordu composé de sept brins parallèles et d'un brin anti-parallèle. Ce feuillet est bordé par cinq hélices α adjacentes et deux périphériques ainsi que deux petites boucles β en épingle à cheveux. La chaîne polypeptidique du domaine catalytique de la Furine est interconnectée par deux ponts disulfures reliant entre eux les résidus Cys₂₁₁-Cys₃₆₀ et Cys₃₀₃-Cys₃₃₃. Il est fort bien documenté que l'activité des convertases dépend la concentration en ions hydrogène (pH) et calcium. Il fut remarqué que les deux sites de liaison aux ions calciques sont plutôt similaires au sein de la famille des PCs. On dénote aussi que le noyau du domaine catalytique est majoritairement composé de résidus hydrophobes, à l'exception de quelques résidus polaires. Outre le site de glycosylation connu pour la Furine à la position Asn₄₄₀, tous les autres sites potentiels de

glycosylation pour toutes les PCs sont situés au dessus du domaine catalytique, ce qui ne devrait pas interférer avec leurs capacités à lier des substrats et ce indépendamment de leurs tailles.¹⁹ On remarque aussi, à partir des structures moléculaires, que les domaines P sont relativement identiques d'une PC à l'autre. Ce qui appuie certaines études qui démontrent que lorsque les différents domaines P étaient interchangeés entre les différentes convertases, ces protéines chimériques présentaient la même activité enzymatique que leurs formes natives.²⁰ Comparativement aux domaines catalytiques et aux domaines P, les prorégions sont celles qui présentent de grandes variabilités au niveau de leurs structures bien que leurs topologies semblent être relativement semblables.²¹

1.1.2 Le prosegment et le mécanisme d'activation

Les protéines néo-synthétisées de la voie sécrétoire subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont d'une importance capitale pour l'acquisition de leurs structures et fonctions propres (ponts disulfures, glycosylations, sulfatations, coupures, etc.). Tout d'abord, la formation de ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique est générée par des enzymes nommées PDI (*protein disulfide isomérases*). Ces enzymes s'assurent de la bonne orchestration des liaisons entre les cystéines présentes dans la protéine native. Pour ce qui est de la glycosylation, qui consiste en l'ajout de chaînes d'hydrates de carbone, on retrouve deux types et ce dépendamment des résidus de la protéine qui est impliqués soit: la o-glycosylation

(thréonine, tyrosine et sérine) ou la N-glycosylation (lysine et asparagine). Ces modifications sont très importantes puisqu'elles augmentent d'une part la solubilité des protéines et d'autre part, elles participent aux mécanismes de contrôle de qualité des protéines néo-synthétisées dans la voie sécrétoire. L'ajout d'oligosaccharides (N-glycosylation) s'effectue selon le site d'attachement (Asn-Xaa-Ser/Thr) par l'oligosaccharyltransférase. Ensuite, les chaînes d'oligosaccharides subissent une déglycosylation par les glycosidases *glsI* et *glsII* où les protéines monoglycosylées sont reconnues par deux lectines soit : la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT), qui jouent des rôles de chaperonnes moléculaires et de contrôle de la qualité des protéines du RE, assurant exclusivement l'exportation de protéines natives bien repliées vers le golgi. Ce cycle de liaison avec la cascade CNX/CRT permet donc le bon repliement et l'oligomérisation de glycoprotéines naissantes, prévenant leurs agrégations et leurs dégradations prématurées.²² Cette surveillance, dictée par les différents arrangements de glycosylation, détermine donc l'aptitude des protéines à voyager vers le golgi par l'intermédiaire des vésicules de type COP1 (*coat protein complexes*). À l'intérieur du RE, la concentration en protéines peut atteindre 100 g/L ($\approx 1-2$ mM). Il va de soi qu'un système de vérification est de mise pour s'assurer de l'intégrité des protéines nouvellement synthétisées. Lorsque des protéines résident longtemps dans le RE et ne parviennent pas à se replier correctement, celles-ci sont exportées vers la voie de dégradation par le protéasome.²³ Ce mécanisme, nommé ERAD (*endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation*), suscite l'action de la mannosidase I qui, en retirant un mannose de la chaîne d'oligosaccharides, permet la liaison des protéines mal repliées à la protéine EDEM cibler ensuite au complexe Sec61. Par l'intermédiaire de la particule 19S, le

complexe Sec61 permet la rétrotranslocation de la protéine vers le cytosol qui, par la suite, est polyubiquitinée pour ensuite être dégradée par le protéasome. Chose intéressante, chez la levure, il fut démontré que les niveaux de l'enzyme clé dans la synthèse du cholestérol, l'*HMG-CoA reductase*, sont essentiellement régulés par un contrôle de la dégradation par le mécanisme ERAD et ce, indépendamment de son repliement. Cette régulation permet donc de moduler, par boucle rétroactive, la quantité de cholestérol produite par la cellule.²⁴

Outre les modifications post-traductionnelles mentionnées ci-haut, les protéines de la voie sécrétoire sont contraintes à d'autres modifications post-traductionnelles dont l'action des convertases de proprotéines. Les PCs sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique sous forme de zymogènes inactifs nommés préproprotéines convertases. Tout d'abord, comme la plupart des protéines de la voie sécrétoire, elles contiennent, en N-terminal, un peptide signal qui les cible vers le réticulum endoplasmique. Dès le début de la traduction de l'ARNm, une protéine nommée la *signal recognition particule* (SRP) se lie au peptide signal naissant du ribosome. Le complexe ainsi formé, s'attache de manière GTP-dépendante à son récepteur, qui ancré dans la membrane, permet le transport de la protéine à travers la membrane du réticulum (translocon).²⁵ Le peptide signal est ensuite retiré par une enzyme, nommée la *signal peptidase*, qui coupe la chaîne peptidique naissante à l'intérieur même de la membrane, libérant ainsi la protéine néo-synthétisée dans la lumière du réticulum endoplasmique.²⁶

Séquentiellement au peptide signal, on retrouve une séquence nommée prorégion propres aux membres de la famille des convertases de proprotéines. Celle-ci possède plusieurs rôles importants dans l'intégrité, le transport et la fonction enzymatique des convertases. La prorégion participe principalement au bon repliement du domaine catalytique qui dès lors de la synthèse de la convertase dans le réticulum, elle demeure étroitement liée au domaine catalytique empêchant ainsi l'activation précoce de proprotéines (hormones, récepteurs, glycoprotéines virales, etc.). Pour illustrer l'importance de la prorégion et le mécanisme d'autoactivation général des convertases de proprotéines, nous utiliserons la convertase Furine comme modèle. Il est important de noter que l'activation des convertases se fait en plusieurs étapes succinctes et que la participation intrinsèque de l'enzyme est primordiale. Les convertases utilisent leurs propres spécificités de coupures pour rencontrer leur premier substrat : leurs propres prorégions. Une fois la synthèse complétée dans le RE, la Furine procède à la première coupure de sa prorégion au site consensus –Arg-Thr-Lys-Arg₁₀₇↓- dans un environnement à pH neutre. Cette étape déterminante s'effectue très rapidement en un $t_{1/2}$ de 10 minutes et la prorégion demeure attachée au domaine catalytique, ce qui maintient l'enzyme sous forme inhibée. Suite à la première coupure, l'enzyme est donc catégorisée comme étant fonctionnelle et peut donc être transportée vers le réseau golgien. La prorégion est ensuite autocoupée de nouveau au site –Arg₇₀-Gly-Val-Thr-Lys-Arg₇₅↓ et ce, selon une dynamique beaucoup plus lente soit un $t_{1/2} < 2$ heures. Cette deuxième coupure autocatalytique confère une certaine fragilité à l'interaction entre la prorégion et l'enzyme. En effet, lors du trafic de la Furine et de sa prorégion dans la voie sécrétoire, on remarque que les changements constitutifs d'environnement (l'augmentation de la concentration en ions

calciques et la diminution du pH) engendrent le détachement de la prorégion, ce qui permet à la Furine d'acquérir sa pleine activité sur d'autres proprotéines présentes dans le réseau trans-golgien, les endosomes et/ou le milieu extracellulaire.²⁷

Pour illustrer l'importance de la prorégion comme chaperonne intramoléculaire, une étude a démontré qu'une mutation dans la prorégion de la subtilisine E à la position 48, modifiant une isoleucine pour une valine (I48V), altérerait la conformation de l'enzyme et par conséquent son activité. En comparaison avec la subtilisine E non mutée, cette mutation ponctuelle provoque plusieurs changements dans la structure secondaire de l'enzyme ce qui affecte la thermostabilité ainsi que la spécificité de l'enzyme envers les substrats.²⁸ En guise de comparaison, des études ont montré que des mutations, dans la prorégion de la Furine (I60A et H66A), favorisent une augmentation de la dégradation par le protéasome dû à un mauvais repliement de l'enzyme et que d'autres mutations (W34A et F67A) empêchent l'autoactivation de l'enzyme. Par contre, ces mutants possèdent l'habileté catalytique pour couper des précurseurs en *trans* tel le facteur Von Willebrand, suggérant que ces mutations permettent le bon repliement du domaine catalytique mais la prorégion ne possède plus son potentiel inhibiteur. Ceci suggère que certains résidus dans la prorégion de la Furine (Ile₆₀ et His₆₆) seraient principalement impliqués dans le repliement et la liaison de la prorégion à l'interface du domaine catalytique, alors que le Trp₃₄ et la Phe₆₇ seraient plutôt en cause dans le maintien de l'environnement hydrophobe de la prorégion elle-même.²¹

Suite à ces nombreuses observations sur le mécanisme d'autoactivation de convertases, plusieurs équipes ont utilisé ces principes pour développer des stratégies d'inhibition sur ces enzymes ce qui présente un très grand intérêt notamment dans le développement de cibles thérapeutiques anticancéreuses. En effet, il fut démontré qu'une baisse d'activité des PCs peut réduire le risque de développement de tumeurs malignes et de métastases, en diminuant l'activation de certains substrats dont les métalloprotéases (MMPs), les facteurs de croissance, certaines molécules d'adhésion, etc.²⁹ À partir de protéines recombinantes purifiées codant pour les prorégions de Furine et PC7, une étude a démontré qu'il était possible d'inhiber la coupure *in vitro* du peptide fluorogénique pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA (pERTKR-MCA) qui représente un substrat type pour évaluer l'activité enzymatique des convertases dibasiques. De plus, lorsque des plasmides codant pour ces prorégions furent transfectés dans des cellules, celles-ci sont capables de diminuer l'activité des convertases et de réduire l'activation de précurseurs protéiques comme la glycoprotéine gp160 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Étonnamment, le prosegment de la Furine (pFurine) possède aussi un pouvoir inhibiteur sur les autres PCs et ce selon l'ordre suivant : PC5 > Furine > PC7 > PACE4 > Kexine. Effectivement, la pFurine, inhibe PC5-A ($IC_{50} = 0.4nM$) à une concentration 10X supérieure à la Furine elle-même ($IC_{50} = 4nM$). Il devient donc important de spécifier que l'utilisation de prodomaines, pour des applications thérapeutiques, nécessite plus de raffinements puisque ceux-ci peuvent inhiber non-spécifiquement d'autres PCs. Outre l'utilisation de prorégions comme inhibiteur, il est possible d'employer divers peptides synthétiques dont le décanoïl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhyle cétone (dec-RVKR-cmk) qui sont désignés pour interagir avec le site catalytique des convertases basiques. Cet

inhibiteur compétitif est donc capable de déplacer la prorégion et de lier, avec une grande affinité et de manière covalente, le site actif et ainsi d'agir en tant qu'une molécule suicide pour l'enzyme.³⁰

1.1.3 Spécificité enzymatique des convertases de proprotéines

Outre leurs prorégions, les convertases possèdent aussi la capacité de couper divers proprotéines présentes dans la voie sécrétoire. Tout d'abord, il est important de bien définir la nomenclature utilisée pour déterminer les sites de coupure par les convertases de proprotéines. Une fois que le site de coupure sur la chaîne peptidique du substrat est prédit et/ou connu, ceci devient alors le point central des deux produits peptidiques qui seront générés. À partir de ce site, on nomme, par ordre croissant (P_1 , P_2 , P_3 , ..., etc.), les résidus avoisinants dont la chaîne peptidique commence en C-terminale de la coupure. Pour ce qui est de la chaîne dont les résidus commencent en N-terminale, on procède de la même façon en y ajoutant la mention prime i.e. P_1' , P_2' , P_3' , etc. Par complémentarité, on représente les résidus de la convertase qui participent à l'interaction avec le substrat en utilisant la même logique mais en utilisant des demi-sphères pour illustrer les acides aminés concernés (désigné par la lettre S; voir Figure 2, p.5).

On retrouve parmi les substrats des convertases de proprotéines de nombreux précurseurs protéiques comme par exemple des hormones, des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance, des récepteurs membranaires, des molécules d'adhésion, des

facteurs de transcription, etc. Outre ces précurseurs cellulaires, les convertases de proprotéines sont aussi impliquées dans l'activation de glycoprotéines de pathogènes tels le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), l'hémagglutinine du virus de la grippe aviaire ainsi qu'une toxine de l'Anthrax.³¹⁻³³

Sept des convertases de proprotéines soit la Furine, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 et PC7 possèdent une spécificité enzymatique pour un et/ou une paire de résidus basiques. Le motif typique de ces PCs est **Arg/Lys-(X)_n-Arg** où n = 0, 2, 4, 6 et X est n'importe quel acide aminé à l'exception de la Cys. (Fig.3, p.18) Quelques-uns des précurseurs qui sont coupés à un ou des sites dibasiques sont représentés sous forme d'un tableau à la page 14. Comme illustré dans ce tableau, on catégorise les différentes spécificités de coupure selon 3 différents types. Les précurseurs de type I sont préférentiellement coupés par la Furine et/ou PC7 selon des motifs : **[R-X_n-(K/R)-R]**. Les convertases PC1 et PC2, qui sont essentiellement localisées dans les granules de sécrétions des cellules endocrines, reconnaissent plutôt des précurseurs dits de type II aux sites : **[(K/R)-(K/R)]**. Les types III sont des protéines qui sont coupées à un site présentant une simple arginine : **[R]**. Pour la convertase PC5A, il fut démontré que cette enzyme est majoritairement impliquée dans l'activation des précurseurs de types IV **[P2'=K/R]** dont la pro-MIS (*Mullerian inhibiting substance*) dans les cellules de Sertoli.³⁴

Suite à la coupure par les PCs, les résidus basiques exposés en C-terminal sont retirés par une carboxypeptidase. Ensuite, si l'on retrouve un résidu glycine suite à l'action de la carboxypeptidase, une enzyme nommée PAM (*peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase*) peut catalyser l'amidation de ce résidu. Cette cascade de modifications

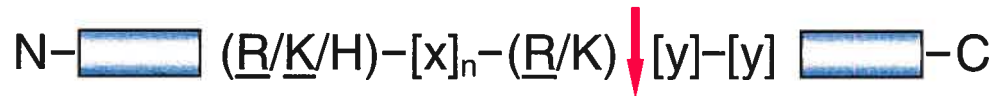
post-traductionnelles est donc nécessaire pour conférer une pleine activité aux hormones générées.^{29,34-36} Dans l'hypophyse, on retrouve le précurseur pro-opimélanocortine (POMC) qui, lorsque coupée par les convertases PC1 et/ou PC2, génère diverses hormones et ce selon le type cellulaire. En effet, dans les corticotropes, la POMC est coupée par PC1 une première fois pour donner l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), qui lorsque coupée de nouveau par PC1, celle-ci génère l'hormone β -lipotropique (β -LPH) et le fragment 16-K. Par contre, dans les mélanotropes, l'ACTH est plutôt coupée par PC2 pour libérer l' α -MSH (*alpha-melanocyte-stimulating hormone*). Chose intéressante, la convertase PC2 est plutôt impliquée dans les coupures dites tardives i.e. en aval de PC1 comme par exemple, l'hormone β -LPH qui peut aussi être coupée par PC2 pour générer la β -endorphine (β -EDN).³⁷ (voir Fig.4, p.20)

PC1 et PC2 sont des enzymes de la voie sécrétoire régulée qui sont principalement localisées dans les granules de sécrétion. Il fut démontré que la modulation de l'activité de PC2 dépend de la protéine 7B2 qui possède un rôle de chaperonne moléculaire et d'inhibiteur sur la convertase PC2. Dans le RE, 7B2 est attachée à proPC2 et maintient l'enzyme inactive. Lorsque ce complexe est transporté vers le réseau golgien, 7B2 est tout d'abord coupé par la Furine et/ou PACE4 ce qui permet de libérer la partie N-terminale de 7B2 et pour la portion C-Terminale (CT), celle-ci demeure attaché à l'enzyme. Dans les granules de sécrétion immatures, qui constituent l'environnement propice, le CT de 7B2 est coupé une seconde fois et ce par PC2, ce qui permet le relâchement total de 7B2 permettant ainsi à PC2 d'obtenir sa pleine activité. Ensuite, ce n'est que dans les granules de sécrétion matures que proPC2 s'autoactive et peut, par

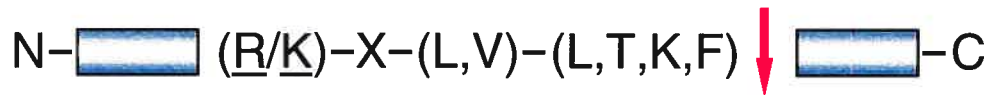
conséquent, couper des prohormones en *trans*.³⁸ Pour sa part, la convertase PC1 s'autoactive plutôt dans le RE, ce qui lui concède la possibilité d'activer des précurseurs de manière précoce par rapport à PC2 et ce depuis les granules de sécrétion immatures.³⁹ La protéine 7B2 est donc très importante pour l'activation de précurseurs, puisqu'elle permet de moduler l'activation de PC2 et permet, par le fait même, à la convertase PC1 d'agir dans d'autres compartiments cellulaires. Ce mécanisme permet donc à ces deux convertases d'agir de concert dans l'activation de précurseurs et ce, selon un temps et un lieu approprié dicté par les compartiments intracellulaires (*i.e.* pH, Ca²⁺).

Puisque les spécificités et les contextes physiologiques des convertases de proprotéines à motifs basiques sont maintenant bien connus, il s'avérait donc très pertinent de développer des astuces pour inhiber spécifiquement ces PCs. Pour ce faire, il est possible d'utiliser diverses variantes de l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT), qui fait partie de la famille des serpinines (*serine protease inhibitor*) qui agissent en tant que substrats suicides pour les convertases. En effet, il est possible de modifier ingénieusement la séquence de la boucle d'activité (RLS) de l' α_1 -AT (Ala₃₅₅-Ile-Pro-Met₃₅₈) par la séquence Arg₃₅₅-Ile-Pro-Arg₃₅₈ nommée l' α_1 -PDX. La grande spécificité de cette protéine en vers les convertases à motifs basiques s'avère donc être un puissant inhibiteur. Effectivement, il fut démontré que l'expression de l' α_1 -PDX dans des cellules inhibe la Furine avec un IC₅₀ de 0.6nM ce qui, par conséquent, bloque la coupure de la glycoprotéine gp160 du VIH-1 par cette convertase. De plus, cette étude a démontré que l' α_1 -PDX n'affecte pas l'activité de d'autres enzymes dont l'élastase et la thrombine.⁴⁰ Une autre variante de l' α_1 -AT (Ala₃₄₉-

Motifs dibasiques



SKI-1/S1P



NARC-1/PCSK9



n = 0, 2, 4 ou 6

x = tous les aa sauf Cys

y = tous les aa

Figure 3 : Spécificité de coupure des convertases de proprotéines

Precursor Protein	Cleavage Site Sequence										
Type I precursors	P6	P5	P4	P3	P2	P1		P1'	P2'		
[R-X-(K/R)-R]	[X-	X-	R-	X-	K/R-	R	↓	X-	X]		
Pro-βNGF	Thr-His-Arg-Ser-Lys-Arg						↓	Ser-Ser			
Leptin pro-receptor	Gln-Val-Arg-Glu-Lys-Arg						↓	Leu-Asp			
Integrin α6	Asn-Ser-Arg-Lys-Lys-Arg						↓	Glu-Ile			
HIV-1 gp160	Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg						↓	Ala-Val			
Pro-fertilin α	Gln-Ser-Arg-Met-Arg-Arg						↓	Ala-Ala			
Pro-7B2	Glu-Arg-Arg-Lys-Arg-Arg						↓	Ser-Val			
Type II precursors	P6	P5	P4	P3	P2	P1		P1'	P2'		
[(K/R)-(K/R)]	[X-	X-	X-	X-	K/R-	R	↓	X-	X]		
POMC (αMSH/CLIP)	Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg						↓	Arg-Pro			
(γLPH/βEnd)	Pro-Pro-Lys-Asp-Lys-Arg						↓	Tyr-Gly			
Pro-Insulin (B/C chain)	Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg						↓	Glu-Ala			
(C/A chain)	Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg						↓	Gly-Ile			
Pro-Renin	Ser-Gln-Pro-Met-Lys-Arg						↓	Leu-Thr			
PACAP-RP	Ala-Pro-Leu-Thr-Lys-Arg						↓	His-Ser			
Integrin α4	His-Val-Ile-Ser-Lys-Arg						↓	Ser-Thr			
Pro-fertilin β	Ser-Cys-Lys-Leu-Lys-Arg						↓	Arg-Gly			
Type III precursors	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	
[Single R]	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	X-	X	R	↓	X-	X]
Pro-Dynorphin (C-peptide)	Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg								↓	Ser-Gln	
Pro-ANF	Arg-Ala-Leu-Leu-Thr-Ala-Pro-Arg								↓	Ser-Leu	
Pro-Somatostatin (SS-28)	Glu-Met-Arg-Leu-Glu-Leu-Gln-Arg								↓	Ser-Ala	
Pro-IGF-I	Leu-Lys-Pro-Thr-Lys-Ala-Ala-Arg								↓	Ser-Ile	
Pro-IGF-II	Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu-Arg								↓	Asp-Val	
Pro-EGF (N-terminal)	Glu-Asp-Gly-His-His-Leu-Asp-Arg								↓	Asn-Ser	
Pro-EGF (C-terminal)	Asp-Leu-Arg-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg								↓	His-Ala	
Type IV precursors	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	
[P2'= R/K]	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	R/K	↓	X	-R/K
PACAP-RP	Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg								↓	Tyr-Lys	
Pro-Mullerian Inhibiting Substance	Glu-Gly-Arg-Gly-Arg-Ala-Gly-Arg								↓	Ser-Lys	
Pro-Glucagon	Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg								↓	Asn-Arg	
Pro-IGF-II	Glu-Ala-Phe-Arg-Glu-Ala-Lys-Arg								↓	His-Arg	
Pro-PTP-μ receptor	Val-Glu-Glu-Glu-Arg-Pro-Arg-Arg								↓	Thr-Lys	

Tableau tiré de Seidah *et al.*, 1998

Tableau I: Classification des proprotéines basée sur leurs motifs basiques au site de coupure

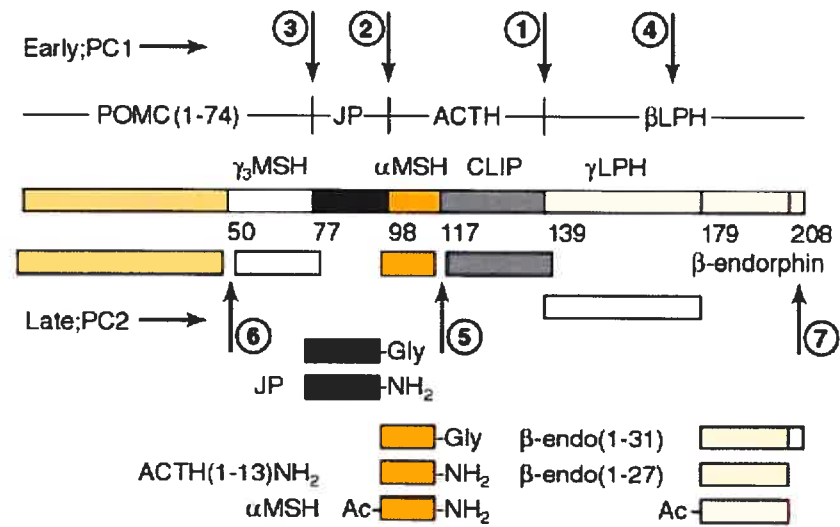


Figure 4 : Protéolyse du précurseur pro-opimélanocortine par PC1 et PC2

Val-Arg-Arg₃₅₂) fut designé pour inhiber plus spécifiquement la Furine et PC5 et n'affectant pas la convertase PACE4.⁴¹

Récemment, une équipe a découvert une nouvelle serpine (Spn4A), chez *Drosophila Melanogaster*, qui possède un site consensus Arg^{P4}-Arg-Lys-Arg^{P1} dans sa boucle d'activité et qui démontre un énorme pouvoir inhibiteur sur la Furine avec un K_i de 13pM et un K_{ass} de $3.2 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$.⁴² De plus, une nouvelle protéine, l'*inter-alpha-inhibitor protein* (IaIP), qui est normalement retrouvée dans le plasma, a démontrée qu'elle possédait aussi une activité inhibitrice sur la Furine en empêchant entre autre l'activation par coupure de la toxine PA (*protective antigen*) de l'Anthrax limitant ainsi sa toxicité.⁴³

Outre les sept convertases aux motifs basiques, la famille des convertase présente un huitième membre soit SKI-1/S1P qui est plus distinct et qui possède plutôt une homologie avec la pyrolysine au niveau ancestral. Cette convertase possède une spécificité enzymatique particulière pour la coupure de molécules précurseurs selon le motif consensus suivant : **Arg/Lys-X-hydrophobique-Z** où Z est préférentiellement une Leu ou une Thr excluant par contre, les acides aminés suivants: Val, Pro, Glu, Asp, ou Cys.^{44,45} (voir Fig.3, p.18) Tout comme les autres PCs, SKI-1/S1P coupe des proprotéines à des sites précis comme par exemple la proBDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), la prosomatostatine et la glycoprotéine du virus de la fièvre hémorragique du *Crimean-Congo*. Fait particulier, contrairement aux autres PCs, SKI-1/S1P est une convertase qui est impliquée dans l'activation des facteurs de transcription notamment dans la régulation des gènes reliés au métabolisme du cholestérol et des lipides via les SREBPs (*sterol*

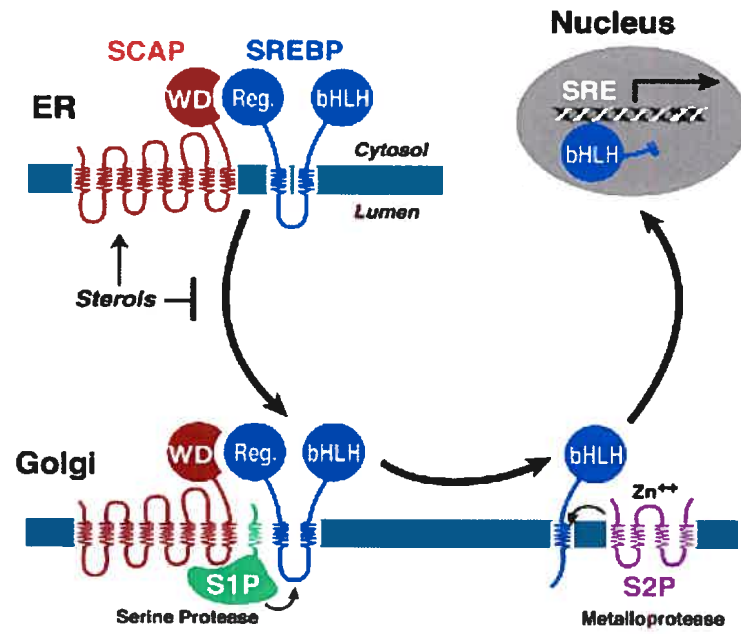


Figure 5 : Cascade d'activation des SREBPs par SKI-1/S1P et S2P

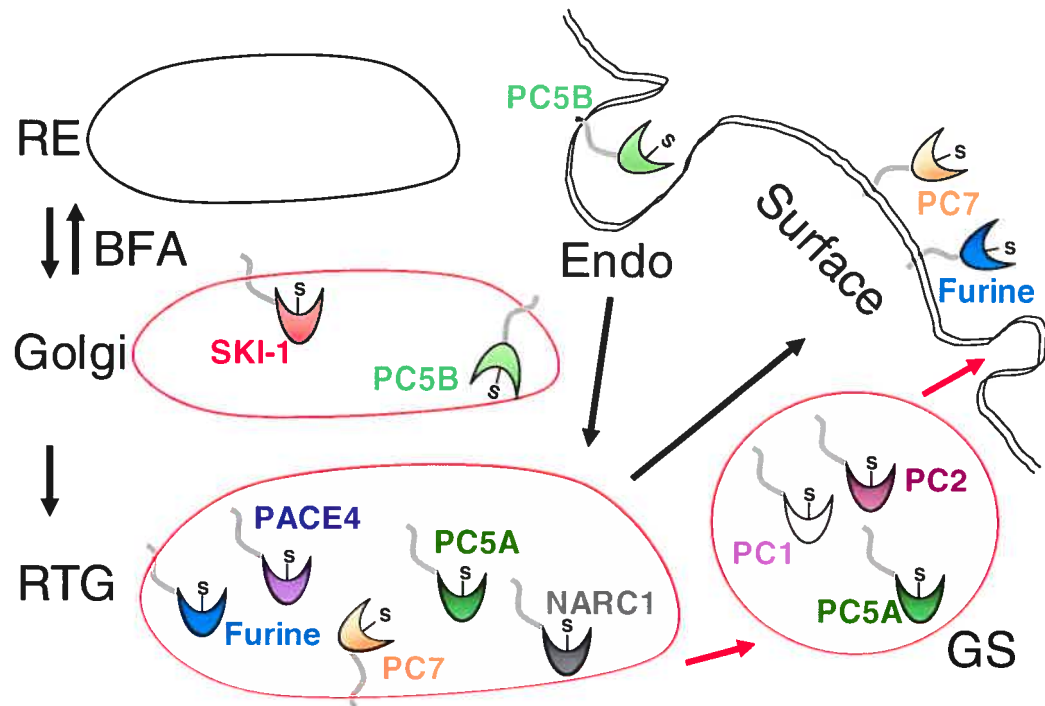


Figure 6: Localisation cellulaire des convertases de proprotéines. RE : réticulum endoplasmique; BFA : Brefeldin A; RTG : réseau trans-golgien; Endo : endosomes; GS : granules de sécretion.

regulatory element-binding protein) et aussi dans la réponse aux protéines mal repliées dans le RE en activant notamment les facteurs de transcription ATF6 (*activating transcription factor 6*) et OASIS.^{35,46,47} Pour bien illustrer le mécanisme par lequel SKI-1/S1P active des facteurs de transcription, qui résident dans la voie sécrétoire, nous allons utiliser le modèle des SREBPs. Brièvement, lorsque la cellule est en besoin de cholestérol, une protéine nommée Insig (*insulin-induced protein*), qui dans les conditions normales retient le complexe SREBP/SCAP dans le RE, se détache de SCAP (*SREBP cleavage activating protein*; voir Fig.5, p.23). Ce détachement permet donc le transport du complexe SREBP/SCAP vers l'appareil de golgi via les vésicules de transport COPII. Un fois arrivé dans le golgi, le facteur SREBP rencontre la convertase SKI-1/S1P, qui procède à une première coupure au site RSVL₅₂₂↓S en formant ainsi deux fragments distincts. Ensuite, une deuxième protéase nommée S2P coupe séquentiellement à SKI-1/S1P au site DRSRILL₄₈₄↓C et ce à l'intérieur même de la membrane du golgi ce qui libère une portion N-terminale. Ce fragment est donc transloqué vers le noyau, ce qui provoque l'activation des nombreux gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, des acides gras et de la recapture du cholestérol extracellulaire dont le récepteur aux LDL (LDLR; voir Fig.5, p.23).⁴⁸⁻⁵⁰ Une étude a démontré que différents variants de l' α_1 -AT, cette fois-ci plus spécifique pour la convertase SKI-1/S1P (α_1 -AT-RRVL₃₅₈ et α_1 -AT-RRYL₃₅₈), peuvent être utilisés en tant qu'inhibiteurs. En effet, l'emploi de ces constructions a démontré que l'activation de SREBP-2 et d'ATF6 ainsi que la coupure du précurseur PDGF-A et de la glycoprotéine du virus de la fièvre hémorragique *Crimean-Congo* étaient de beaucoup diminuée.⁴⁶

NARC-1/PCSK9, qui est la plus récente convertase identifiée et qui l'objet de cet ouvrage, est une sérine protéase calcium indépendante avoisinant la protéinase K au niveau ancestrale. Comme la convertase SKI-1/S1P, elle possède une spécificité de coupure autocatalytique aussi atypique soit : $SSV^{P4}FAQ\downarrow SIP^{P3'}$ où la Val en position P4 et la Pro en P3' sont cruciaux.^{51,52} (Fig3, p.18) Actuellement, aucun substrat ne fut identifié pour NARC-1/PCSK9 bien que l'on connaisse sa particularité autocatalytique.⁵¹ Chose intéressante, plusieurs mutations furent rapportées dans la partie codante de ce gène (S127R, F216L, D374Y) chez des patients hypercholestérolémiques. De plus, il fut aussi démontré que la présence d'un allèle tronquée pour NARC-1/PCSK9 (Y142X, C679X) provoque une hypocholestérolémie familiale.⁵³⁻⁵⁵ Une étude structure/fonction a démontrée que les mutants naturels S127R et D374Y illustrent une réduction de 50-60% et de $\geq 98\%$ sur l'autoactivation catalytique du zymogène et que le mutant F216L n'affecte par l'activité de l'enzyme.⁵¹

1.1.4 Distribution tissulaire et localisation cellulaire

Bien que les PCs soient essentiellement localisées dans la voie sécrétoire régulée et constitutive, leurs distributions cellulaires varient d'une convertase à l'autre. En effet, on retrouve PC1, PC2 et PC5A (isoforme soluble de PC5) dans les granules de sécrétion tandis que pour la Furine, PC5B (isoforme transmembranaire de PC5) et PC7, elles se retrouvent plutôt à la surface membranaire. Cette particularité s'explique par le fait que ces convertases possèdent des structures transmembranaire de type I (Fig.6, p.24). Outre sa

localisation à la surface cellulaire, la Furine est aussi endocytée grâce à la participation de plusieurs acides aminés dont les résidus YKGL₇₆₅, le dipeptide LI₇₆₀ et la Phe₇₉₀ située dans la queue cytoplasmique de celle-ci. Ces résidus sont donc nécessaires à la liaison de la Furine à la sous-unité $\mu 2$ de l'adaptateur AP-2, ce qui permet l'incorporation de la Furine dans les endosomes précoces.^{27,56}

Pour ce qui est de la distribution tissulaire des convertases de proprotéines, on dénote que certaines sont exprimées de manière complémentaire (dans les mêmes tissus) et que d'autres sont plutôt restrictives. PC1 et PC2 sont des convertases retrouvées principalement dans les cellules neuronales (hypophyse), le système endocrinien (i.e. pancréas) ainsi que dans l'intestin.⁵⁷⁻⁵⁹ Les convertases Furine, PC5, PACE4, PC7 et SKI-1/S1P sont plutôt exprimées de manière ubiquitaire. Par contre, la Furine est très abondante dans le foie et la rate alors que PC7 est plutôt riche dans le thymus et le colon. Chose intéressante, on remarque que la Furine, PC5, et PC7 sont aussi fortement exprimées dans les cellules vasculaires prolifératives du muscle lisse dans l'aorte de rat.⁶⁰ Pour sa part, PC4 est strictement localisée dans les tissus germinaux, spécialement dans les testicules et tout particulièrement dans les spermatocytes et les spermatides arrondis.⁶¹ Des études d'expression ontogénique ont démontré un profil d'expression particulier pour la convertase NARC-1/PCSK9. En effet, son apparition débute au jour embryonnaire E9 dans le foie de souris et cette forte expression est maintenue chez l'adulte. De plus, NARC-1/PCSK9 est exprimée de manière transitoire dans le système nerveux central (SNC) soit dans télencéphale (E12-13) suivi du cervelet (E17-P20) et aussi dans le bulbe olfactif chez l'adulte. Durant l'embryogenèse, on remarque aussi sa

présence dans la peau, le rein et le petit intestin au jour E15. Outre son expression transitoire dans le SNC, elle présente également une régulation transcriptionnelle transitoire dans le rein soit au jour P6, où elle est strictement exprimée dans le cortex suivi séquentiellement d'une expression plus restrictif dans la médulla rénale chez l'adulte. De plus, dans le cervelet adulte, on retrouve une expression marquée dans les cellules de la couche granulaire externe (EGL) ainsi que dans l'extension rostrale du pédoncule olfactif (RE-OP). Il est à remarquer que NARC-1/PCSK9 est exprimée dans des régions où l'on observe une différenciation cellulaire de cellules souches multipotentes, ce qui suggère que NARC-1/PCSK9 est possiblement impliquée au cours de la neurogenèse, la néphrogenèse et l'hépatogenèse.⁵²

1.1.5 Ablations géniques (*Knockout*) des PCs et pathologies

Au fil des années, de nombreuses études ont permis d'approfondir nos connaissances sur les convertases de proprotéines notamment sur leurs mécanismes d'activations, leurs spécificités enzymatiques, leurs distributions cellulaires et tissulaires ainsi que leurs différents substrats. Elles ont été impliquées dans une variété de pathologies dont les infections virales, le cancer et les maladies neurodégénératives ce qui leur confère davantage d'importance pour d'éventuelles applications cliniques. D'ailleurs, une molécule présente dans l'hypothalamus de rat nommée proCART (*cocaine and amphetamine-regulated transcript*), qui coupée par PC1 et PC2, fut directement impliquée dans l'anorexie en agissant sur les circuits neuronaux contrôlant l'appétit en

contrebalançant l'effet dicté par le neuropeptide Y.^{62,63} Il s'avère donc important de bien comprendre l'effet systémique d'un potentiel inhibiteur des convertases de proprotéines. Pour ce faire, plusieurs équipes ont générés différentes souris dont le gène codant pour différentes convertases fut retiré soit de manière ubiquitaire ou tissus spécifiques par l'utilisation de technique communément appelée souris *knockout* (KO).⁶⁴ (Tableau II, p.25)

Premièrement, l'ablation génique de la Furine provoque une létalité au stade embryonnaire entre E10.5-11.5. Ces souris présentent des défauts majeurs dans la fermeture ventrale de l'embryon, la fusion du tube cardiaque et la rotation du cœur ainsi qu'une vascularisation du sac vitellin anormale. La Furine semble donc être primordiale au cours de l'embryogenèse ce qui peut être expliqué par la réduction de l'activation de précurseurs important dont Nodal, qui est impliqué dans la spécification des axes et le maintien de l'intégrité embryonnaire.⁶⁵ Pour définir le rôle de la Furine dans différents organes, l'équipe de Creemers *et coll.* a effectué l'ablation génique de la Furine et ce exclusivement dans le foie. Ils ont donc échappé à la létalité embryonnaire et ils n'ont observé aucune différence significative quant à la morphologie du foie et à l'activation de nombreux substrats connus pour la Furine dont l'albumine, l'intégrine α_5 , la LRP (*lipoproteinreceptor-related*) *protein*), la vitronectine ainsi que l' α_1 -microglobuline. Ce qui suggère que, dans le foie, il existe une redondance avec les autres PCs dans l'activation de précurseurs. Chose qui s'avère intéressante pour un futur traitement de pathologies locales dont le cancer et les infections virales. Cependant, une inhibition combinatoire est de mise pour contrecarrer les autres convertases.⁶⁶ Pour ce qui est de PC1, il fut remarqué que l'ablation complète de ce gène démontre plusieurs déficits quant à la

PC	Tissue distribution	Cellular compartment	Null phenotype
Furin	Ubiquitous	TGN, endosomal system, cell surface	Embryonic lethality at e10.5–11.5. Ventral closure defects. Failure to undergo axial rotation. Abnormal yolk sac vasculature. Failure of chorioallantoic fusion.
PC1 (mouse model a)	Neuroendocrine	Dense-core secretory granules	Pre- and postnatal lethality. Dwarfism. Chronic mild diarrhea.
PC1 (mouse model b)	Neuroendocrine	Dense-core secretory granules	Embryonic lethality
PC1 patients	Neuroendocrine	Dense-core secretory granules	Obesity. Impaired glucose homeostasis and gastrointestinal function. Hypogonadotropic hypogonadism. Hypocortisolism.
PC2	Neuroendocrine	Dense-core secretory granules	Retarded growth post partum. Hypoglycemia Endocrine peptide processing defects.
PC4	Germ cell	Not determined	Reduced fertility.
PACE4	Ubiquitous	TGN, cell surface	Phenotype is variable including: Some embryonic lethality at e13.5–15.5. Heart defects. Situs defects. Craniofacial defects.
PC5/6A	Ubiquitous	TGN, dense-core secretory granule	No knockout available
PC5/6B	Ubiquitous	TGN, endosomal system, cell surface	Embryonic death
LPC	Ubiquitous	TGN, endosomal system, cell surface	No phenotype reported.

Tableau modifié de: Taylor,N.A., Van De Ven,W.J. & Creemers,J.W. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J.* 17, 1215-1227 (2003).

Tableau II: Phénotypes des souris KO et patients pour les différentes PCs

coupure et l'activation prohormones et ce dans différents tissus : l'hormone de croissance (GHRH; hypothalamus), l'ACTH à partir de la proopiomélanocortine (hypophyse), la proinsuline (pancréas) ainsi que le proglucagon en glucagon 1 et 2 dans l'intestin. Bien que ces souris soient normales à la naissance, elles possèdent un retard de croissance de 60% à la 10ème semaine ce qui fut aussi constaté chez les souris dont on avait retiré le gène codant le récepteur à l'hormone de croissance.⁶⁷ Corollairement au modèle de souris *KO* pour *PC1*, des patients ayant une mutation dysfonctionnelle sur un allèle du gène *PC1* démontrent une enfance obèse, un hypocortisolisme et une diminution de leurs fonctions gastro-intestinales.⁶⁸ À titre de comparaison, des souris *KO* pour *PC2* présentent une hypoglycémie chronique due à la forte réduction de l'activation du proglucagon. Une diminution de la coupure du précurseur prosomatostatine et de la proinsuline dans le pancréas fut aussi observée de plus qu'une réduction de la neurotensine et neuromédine N de 15 et 50% respectivement dans le cerveau.^{69,70}

L'ablation de *PACE4* démontre plutôt une dysfonction dans l'établissement de l'axe antéropostérieur et de la symétrie gauche/droite qui se produit au cours du développement embryonnaire chez la souris. En effet, il fut démontré que *PACE4* et la Furine activent différents précurseurs de la famille des TGF- β , dont Nodal et BMP, qui sont critiques dans la formation de l'axe G/D. Par conséquent, ces souris montrent des anomalies au niveau de leurs symétries embryonnaires ainsi que des malformations craniofaciales.

L'ablation génique de *PC5B* engendre aussi la létalité embryonnaire au alentour de E10.5-11.5. Bien que l'on possède très peu de détails explicatifs, on remarque que *PC5*

est fortement exprimée (E7.5-11.5) dans l'embryon et ce tout spécialement dans l'endoderme extraembryonnaire, dans le sac vitellin ainsi qu'au sein du bourgeonnement des membres.⁶⁴

La distribution tissulaire de PC4 dans les organes reproducteurs suggère que cette convertase pourrait être utilisée à des fins contraceptives. En effet, les souris déficientes pour PC4 ont démontrées une forte diminution de fertilité.⁷¹ Cette réduction peut être expliquée par la protéine PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) qui est localisé dans le cap de l'acrosome des spermatozoïdes, et qui fut démontré comme étant activée par PC4.⁷²

Deux modèles d'ablation génique de convertases furent directement impliqués dans le métabolisme du cholestérol soit pour SKI-1/S1P et NARC-1/PCSK9. Il est largement documenté que SKI-1/S1P joue un rôle clé dans la cascade d'activation des SREBPs qui une fois transloqués au noyau, activent de nombreux gènes cibles dans la synthèse du cholestérol. Puisque l'ablation générale de SKI-1/S1P est létale, ce gène fut donc spécifiquement retiré dans le foie où on dénote une forte diminution de l'activation des SREBPs ainsi qu'une réduction de 75% de la synthèse de *novus* cholestérol et des acides gras dans les hépatocytes.⁷³ Chose intéressante, l'équipe de Scheel *et coll.* a effectué une étude où ils ont démontré que l'atténuation génique de SKI-1/S1P chez le poisson zèbre provoque des défauts de la matrice cartilagineuse ainsi que des irrégularités dans la structure des chondrocytes. Ils ont aussi démontré que ces malformations étaient reliées à la cascade S1P/S2P mais indépendante de SCAP. Ces observations suggèrent donc que SKI-1/S1P possède un rôle dans les tissus cartilagineux

et ce de manière indépendante à la cascade connue de cette enzyme sur le métabolisme du cholestérol ouvrant par le fait même une nouvelle voie d'exploration.⁷⁴

Récemment, il fut montré que l'ablation de la convertase NARC-1/PCSK9 cause une augmentation de niveaux de LDLR (*low density lipoprotein receptor*) dans le foie et tout particulièrement à la surface des hépatocytes. Cette hausse provoque donc une augmentation de la captation des particules LDL-C ce qui engendre une réduction considérable du taux de cholestérol plasmatique allant de 96 mg/dL à 46 mg/dL. Par la fait même, ils ont traité les souris NARC-1/PCSK9 KO avec des statines (inhibiteurs de la synthèse de *novo* cholestérol) et ont observé un effet synergique sur la réduction des niveaux de cholestérol.⁷⁵ Ce qui suggère qu'un inhibiteur spécifique pour la convertase NARC-1/PCSK9 pourrait être utilisé de concert avec les statines pour réduire davantage les niveaux de LDL-C et ce tout particulièrement chez des patients hypercholestérolémiques.⁷⁶

1.2 NARC-1/PCSK9 (*neural apoptosis-regulated convertase-1/protein convertase subtilisin/kexin like 9*)

1.2.1 Structure et fonction de NARC-1/PCSK9

NARC-1 (*neural apoptosis-regulated convertase-1*) fut clonée par deux compagnies pharmaceutiques distinctes d'une part par une analyse générale de gènes

exprimés dans la voie sécrétoire et d'autre part dans des cultures primaires de neurones du cervelet induites en apoptose.⁵² Par analogie de séquences, utilisant des oligonucléotides dégénérés comparable à la séquence du domaine catalytique conservé de SKI-1/S1P, l'équipe du Dr. Seidah a pu identifier la convertase NARC-1/PCSK9 dans les bases de données génomiques.⁵² Au niveau ancestral, elle possède ~42% d'homologie avec la famille de la protéinase K. Elle est synthétisée sous forme de zymogène qui est coupée autocatalytiquement dans le RE au site SVFAQ₁₅₂↓SIPWN et qui est ensuite sécrétée avec sa prorégion dans le milieu extracellulaire.^{52,77} Cette spécificité de coupure est très unique puisque l'on retrouve en P1 un acide aminé polaire suivi de résidus hydrophobes en P2, P3 et P4. À titre de comparaison, les convertases préfèrent en P1/P2 un ou des résidus basiques (Arg et/ou Lys) à l'exception de SKI-1/S1P, qui préfère des résidus hydrophobes près du site de coupure bien qu'elle nécessite une Arg/Lys en P4. Les résidus Val, Gln et Pro semblent être importants pour l'autoactivation de NARC-1/PCSK9 suggérant entre autre qu'une structure en épingle à cheveux est nécessaire en P3'. Bien qu'elle ne possède pas de domaine P, la région C-terminale riche en résidus cystéine et histidine est aussi très importante pour l'activité autocatalytique.^{51,52} Outre les différentes mutations naturelles identifiées pour cette convertase, une étude a montré que des mutations dans la prorégion (Y78A, V80A, V80L, L82P, M126A, P138Y et V149A) peut empêcher la sécrétion de NARC-1/PCSK9 dans le milieu extracellulaire et ce, par un mauvais repliement du domaine catalytique.⁵¹ Bien que l'on ne connaisse pas encore de substrat(s) pour NARC-1/PCSK9, l'analyse structure/fonction nous permet de mieux comprendre la spécificité et la sensibilité de l'enzyme à diverses mutations.

1.2.2 Implication de NARC-1/PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol

Au milieu des années soixante-dix, Brown et Goldstein identifièrent que des mutations dans le locus du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) étaient responsables d'une forme d'hypercholestérolémie familiale (FH).⁷⁸ À la fin des années quatre-vingt, d'autres mutations, cette fois-ci dans l'apolipoprotéine B (apoB) qui est l'élément principal des particules LDL-C, permirent d'identifier un second locus pour la FH. Chose intéressante, on soupçonnait chez des patients hypercholestérolémiques un troisième locus puisqu'ils ne présentaient aucune mutation pour les gènes de l'apoB et du LDLR.⁷⁹ Ce n'est que tout récemment que des mutations répertoriées dans le gène de NARC-1/PCSK9 (S127R, F216L, D374Y, N157K) furent étroitement liées à un troisième locus impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale.^{53,55,80} Ces mutations ont démontrées un gain de fonction enzymatique pour la convertase NARC-1/PCSK9 qui sera expliqué plus tard.^{81,82} À l'opposé, des mutations (Y142X et C679X) chez des patients afro-américains, qui présentent des formes tronquées de NARC-1/PCSK9, démontrent une baisse de ~40% du cholestérol circulant donc ici d'une perte de fonction.⁵⁴ Suite à l'identification de NARC-1/PCSK9 comme étant impliqué dans l'hypercholestérolémie, un premier candidat est venu faire surface : le LDLR.

Pour définir le rôle de NARC-1/PCSK9 sur le métabolisme du cholestérol, l'équipe de Breslow *et coll.* a effectué une étude de surexpression, par l'intermédiaire d'adénovirus recombinant codant pour la convertase NARC-1/PCSK9. Dans ces souris infectées, ils ont observé que NARC-1/PCSK9 favorise la dégradation du LDLR, ce qui explique en partie le

gain de fonction et ce qui coïncide, à l'inverse, avec les résultats chez les souris mutantes (KO) où on dénote une hausse des niveaux de LDLR accompagnée d'une baisse du LDL-C circulant.⁸³ Pour mieux définir le mécanisme entourant cette dégradation, une étude a démontrée que l'action de NARC-1/PCSK9 sur le LDLR se produit dans un compartiment post-réticulum endoplasmique et que ce phénomène ne se produit pas dans le protéasome et que cela n'implique pas des enzymes lysosomiales à cystéine, des protéases à acide aspartique ainsi que des métalloprotéases.⁸³ Il fut suggéré que la dégradation du LDLR, par la convertase NARC-1/PCSK9, s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine intermédiaire qui pourrait moduler l'activité de NARC-1/PCSK9 et ce dans des compartiments cellulaires acides tel les endosomes tardifs.⁸⁴ Bien que l'action de NARC-1/PCSK9 sur le LDLR soit maintenant bien documentée, le mécanisme demeure inconnu.

1.2.3 Régulation transcriptionnelle de NARC-1/PCSK9

NARC-1/PCSK9 et PC5/6 sont des convertases hautement régulées au niveau transcriptionnel.⁵² Récemment, deux équipes ont analysé, à l'aide de biopuces, les différents gènes pouvant être régulés par les SREBPs (*sterol regulated element binding protein*) pour pouvoir ainsi dresser une liste des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. La première approche utilisée fut celle d'une diète riche en cholestérol où l'on s'attend à une diminution de l'activité des SREBPs puisque ces souris sont en présence d'un excès de cholestérol. En effet, les gènes cholestérogéniques tel le LDLR et l'HMG-

CoA reductase (enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol) furent régulés à la baisse ainsi que le gène codant pour la convertase NARC-1/PCSK9.⁸⁵ De plus, une deuxième étude réalisée à partir de souris déficientes pour les différents SREBPs où ils ont généré, à partir de ces souris, différentes souris transgéniques pour les facteurs de transcription SREBP-1a et SREBP-2. Cette étude a démontré que la convertase NARC-1/PCSK9 est régulée à la hausse dans le foie de souris transgénique pour le facteur SREBP-2 et ce conjointement avec la transcription de d'autres gènes cholestérogéniques.⁸⁶ Une autre étude, utilisant cette fois-ci des lignées cellulaires et cultures primaires d'hépatocytes, avait aussi démontré, par QPCR en temps réel, que NARC-1/PCSK9 est régulée par SREBP-2.⁷⁵ Puisqu'on sait que le facteur de transcription cholestérogénique SREBP-2 régule à la hausse les niveaux d'ARNm codant pour NARC-1/PCSK9 et le LDLR, et que cette convertase favorise la dégradation de ce dernier, il est donc logique de penser que la régulation de NARC-1/PCSK9 pourrait servir de régulateur post-transcriptionnel sur les niveaux protéiques du LDLR. En effet, il fut longtemps remarqué que l'augmentation des niveaux d'ARNm du LDLR n'était pas toujours accompagnée d'une hausse de la protéine correspondante, ce qui peut être maintenant expliqué par une dégradation exercée par NARC-1/PCSK9. (Voir Fig.7, p.38) Il devient donc très pertinent de développer un inhibiteur spécifique pour NARC-1/PCSK9 qui, en combinaison avec des statines, pourrait être utilisé pour traiter des patients hypercholestérolémiques. Effectivement, à l'aide de souris déficientes pour NARC-1/PCSK9, il fut démontré que lorsque traitées avec des statines, ces souris dénotent une réduction plus importante du cholestérol plasmatique (40.8 mg/dL) comparativement à des souris simplement traitées aux statines (71 mg/dL).⁷⁶

1.2.4 Rôle de NARC-1/PCSK9 au cours de la neurogenèse

Jusqu'à présent, la seule fonction connue pour la convertase NARC-1/PCSK9 est sa capacité d'augmenter la dégradation du LDLR. Il est à remarquer que le profil d'expression de NARC-1/PCSK9 démontre une présence très marquée dans le foie et l'intestin qui sont en soi des tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Chose intéressante, NARC-1/PCSK9 est aussi exprimée dans des régions où l'on retrouve une forte activité neurogénique notamment dans le bulbe olfactif, dans le cervelet de même que transitoirement dans le télencéphale au jour embryonnaire e12.⁵² (Fig.8, p.39) Chose intéressante, une étude a démontré que la surexpression de NARC-1/PCSK9 dans des cultures primaires neuronales, provenant du télencéphale au jour embryonnaire e13.5, favorise la neurogenèse.⁵² Cette étude porte donc sur le rôle de la convertase de proprotéines NARC-1/PCSK9 au cours du développement du CNS ce permettra d'approfondir les connaissances sur cette fascinante enzyme et ce dans un tout autre contexte biologique que celui des hépatocytes.

1.3 Les cellules de carcinomes embryonnaires P19 comme modèle de différenciation neuronale

Pour définir le rôle de NARC-1/PCSK9 au cours de la neurogenèse, il faut tout d'abord choisir un modèle de différenciation neuronale représentatif. Les P19 sont des

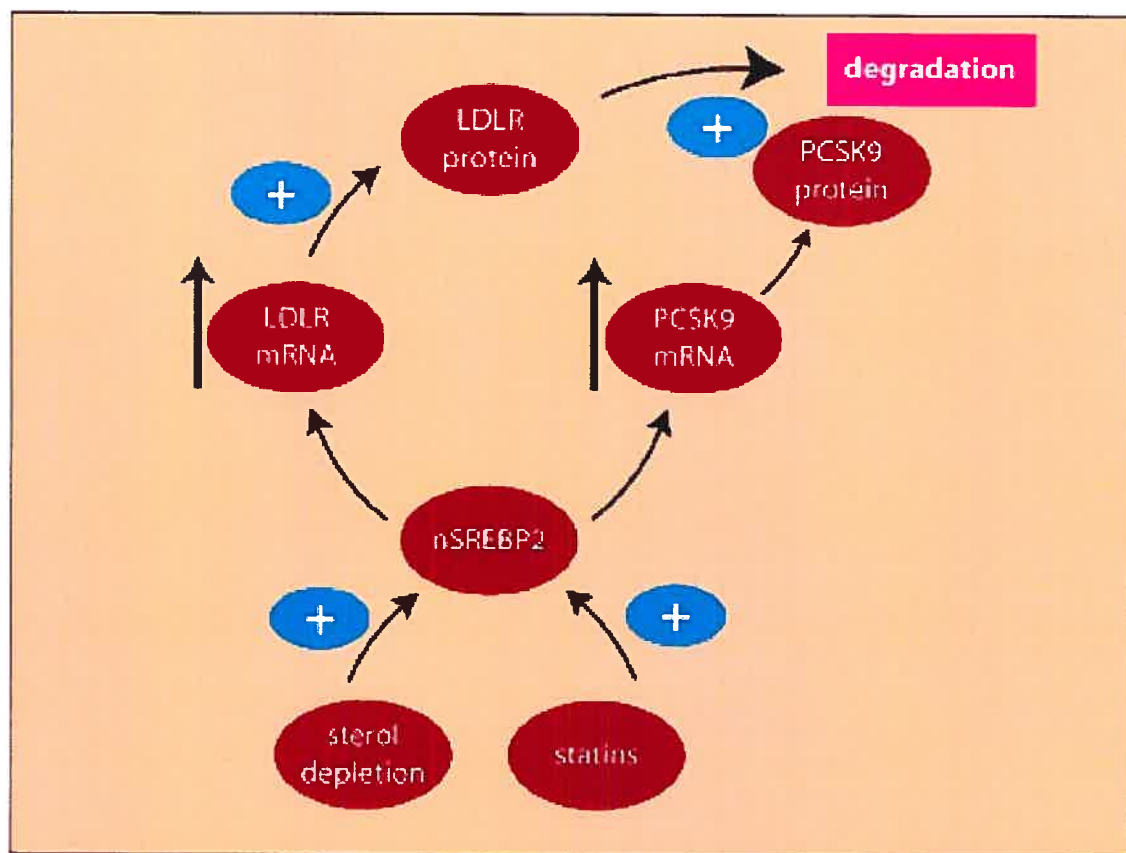


Image tirée de : Attie et al., (2005) Cell Metab, 290-2.

Figure 7 : Régulation post-traductionnelle du LDLR par NARC-1/PCSK9

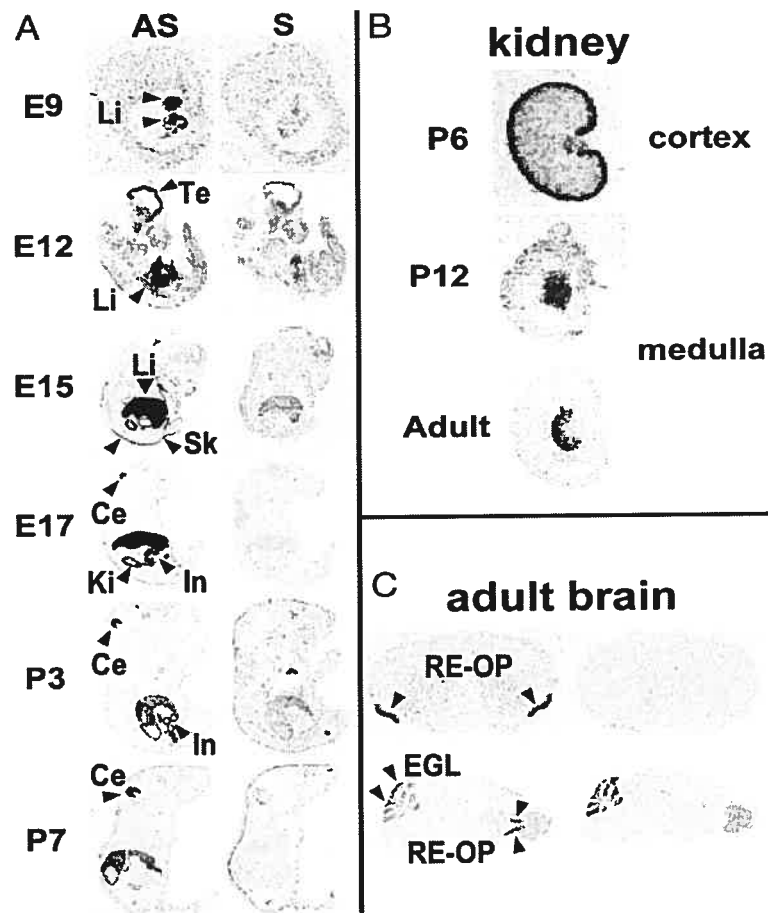


Image tirée de: Seidah, N.G. et al., (2003) PNAS 928-933.

Figure 8: Étude ontogénique chez la souris de NARC-1/PCSK9 par hybridation in situ.

cellules pluripotentes issues de carcinomes embryonnaires qui possèdent la capacité de se différencier, selon différents traitements, en différents types cellulaires dont des cardiomyocytes des neurones. En effet, suite à un traitement à l'acide *all-trans* rétinoïque (AR), les P19 sont induites à une différenciation dite neuroectodermale générant majoritairement des neurones ainsi que des astrocytes et des oligodendrocytes.⁸⁷ Les neurones ainsi dérivés possèdent plusieurs caractéristiques très voisines du proencéphale (*hindbrain*) de par leurs propriétés synaptiques. Une étude de transplantation de neurones, dérivés des P19, dans un striatum de rat a démontré qu'elles acquièrent des propriétés de neurotransmission et qu'elles répondent à des stimuli électriques. De plus, elles ont développées une sensibilité à divers neurotransmetteurs dont l'acide gamma-aminobutyrique, la glycine ainsi que le glutamate.⁸⁷ Les cellules P19 possèdent tous les éléments de réponse à l'acide rétinoïque dont le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur aux rétinoïdes X (RXR). Chacune des familles contiennent trois types soit : α , β et γ . Ces récepteurs sont donc étroitement liés avec l'activation d'une série de gènes impliqués dans la différenciation des P19. Fait intéressant, les cellules non différenciées possèdent très peu de RAR α et RAR β et lorsque traitées à l'AR, les niveaux de RAR α augmente rapidement alors que ceux du RAR γ sont plutôt réprimés.⁸⁸ Lorsque ces cellules sont cultivées en agrégats mais sans traitement à l'AR, on remarque particulièrement une différenciation du type endodermale où l'on observe plusieurs cellules marquées à la kératine.⁸⁹ Jusqu'à présent, aucune donnée ne fut recensée quant à l'implication de NARC-1/PCSK9 au cours de la différenciation neuronale des cellules P19. De plus, la littérature possède très peu d'informations quant aux rôles possibles du cholestérol au cours du développement du SNC bien qu'une étude a démontré que le

messenger codant pour le LDLR ainsi que la protéine HMG-CoA reductase augmentait dans le phénotype neuronal.^{90,91}

1.4 Description du projet de recherche

Jusqu'à maintenant, aucun substrat ne fut découvert pour cette enzyme et plusieurs publications d'envergure ont démontrées que le rôle de NARC-1/PCSK9 est d'accroître la dégradation du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR). Outre son implication dans le métabolisme du cholestérol, on connaît très peu de chose sur cette convertase dans d'autres contextes physiologiques. Puisque cette enzyme est exprimée dans le SNC au cours du développement embryonnaire, nous avons donc décidé de porter cette étude sur le rôle de la convertase NARC-1/PCSK9 dans ce contexte physiologique bien précis. Pour ce faire, nous avons utilisé les cellules P19 qui sont des carcinomes embryonnaires bien caractérisés, qui sous l'action d'acide rétinoïque, se différencient en neurones. Nous avons aussi porté cette étude en étudiant l'impact de l'atténuation génique, chez le poisson zèbre, de NARC-1/PCSK9 sur le développement du SNC.

Objectifs :

- 1- Valider le modèle de différenciation neuronale P19 à l'aide de marqueurs neuronaux.
- 2- Analyser, par PCR en temps réel, les profils d'expression des différentes convertases dont plus spécifiquement NARC-1/PCSK9.
- 3- Étudier la régulation des gènes cholestérogéniques dans les cellules P19 et vérifier si profil similaire à celui de la convertase NARC-1/PCSK9.
- 4- Évaluer le rôle de NARC-1/PCSK9 sur la dégradation du LDLR durant la différenciation neuronale.
- 5- Définir l'impact de l'absence de NARC-1/PCSK9 sur la neurogenèse utilisant une approche d'interférence à l'ARN.

Chapitre II : Manuscrit

Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system

Steve Poirier,* Annik Prat,* Edwige Marcinkiewicz,* Joanne Paquin,[†]
Babykumari P. Chitramuthu,[‡] David Baranowski,[‡] Benoit Cadieux,[‡]
Hugh P.J. Bennett[‡] and Nabil G. Seidah*

*Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave West, Montreal, Quebec, H2W 1R7, Canada.

[†]Laboratoire de Neuroendocrinologie Développementale, Département de Chimie et de Biochimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8, Canada.

[‡]Endocrine Laboratory, Royal Victoria Hospital and McGill University Health Centre Research Institute, 687 Pine Ave. West, Montreal, Quebec, H3A 1A1, Canada.

Running title: NARC-1/PCSK9 and neural development

Address correspondence and reprint requests to Nabil G. Seidah, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave West, Montreal, QC, H2W 1R7, Canada.

Telephone: 987-5609; Fax: ¹ 987-5542; [REDACTED]

Keywords: Cholesterol, NARC-1/PCSK9, neurogenesis, P19 cells, proprotein convertase, zebrafish.

Abbreviations: aa, amino acid; CNS, central nervous system; HMG-CoA reductase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-coenzyme A (CoA) reductase; ISH, *in situ* hybridization; LDLR, low density lipoprotein receptor; MO, morpholino oligonucleotide; NARC-1/PCSK9, neural apoptosis regulated convertase-1/protein convertase subtilisin-kexin like-9; PC, proprotein convertase; QPCR, quantitative polymerase chain reaction; RA, retinoic acid; SREBP, sterol regulatory element binding protein.

ABSTRACT

NARC-1/PCSK9 (neural apoptosis regulated convertase-1/proprotein convertase subtilisin-kexin like-9) is a proprotein convertase (PC) recently described to play a major role in cholesterol homeostasis through enhanced degradation of the LDL receptor (LDLR) and possibly in neural development. Herein, we investigated the potential involvement of this proteinase in the development of the central nervous system (CNS) using as models the mouse embryonal pluripotent P19 cells and the zebrafish. Time course quantitative RT-PCR analyses were performed following retinoic acid (RA)-induced neuroectodermal differentiation of P19 cells. Accordingly, the mRNA levels of NARC-1/PCSK9 peaked at day 2 of differentiation and fell off thereafter. In contrast, the expression of the proprotein convertases SKI-1/S1P (subtilisin kexin isozyme 1/site 1 protease) and Furin was unaffected by RA, while that of PC5/6 and PC2 increased within and/or after the first 4 days of the differentiation period, respectively. This pattern was not affected by the cholesterologenic transcription factor SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein-2), which normally upregulates NARC-1/PCSK9 mRNA levels in liver. Furthermore, in P19 cells, RA-treatment did not affect the protein level of the endogenous LDLR. This agrees with the unique expression pattern of NARC-1/PCSK9 in the rodent CNS, including the cerebellum, where the LDLR is not significantly expressed. Whole mount *in situ* hybridization revealed that the pattern of expression of zebrafish (zf) NARC-1/PCSK9 is similar to that of mouse both in CNS and periphery. Specific knockdown of zf-NARC-1/PCSK9 mRNA resulted in a general disorganization of cerebellar neurons and loss of hindbrain-midbrain

boundaries, leading to embryonic death at ~96h post fertilization. These data support a novel role for NARC-1/PCSK9 in CNS development, distinct from that in cholesterologenic organs such as liver.

The mammalian proprotein convertases constitute a family of 9 serine proteinases related to bacterial subtilisin. These include the 7 basic-amino acid (aa) specific convertases known as PC1/3, PC2, Furin, PC4, PACE4, PC5/6, and PC7^{2,3}, and two proteinases cleaving at non-basic residues, namely SKI-1/S1P^{4,5} and NARC-1/PCSK9^{6,7}. These proteinases are implicated in the limited proteolysis of precursors of secretory proteins that participate in several biological functions such as development, reproduction, immune response and in numerous pathologies, e.g., neurological disorders, infectious diseases, cancer and dyslipidemias⁸⁻¹⁷.

The proprotein convertase NARC-1 “neural apoptosis-regulated convertase-1”^{18,19}, also known as PCSK9²⁰, was recently characterized and shown to be highly expressed in liver and small intestine. Human point mutations within the NARC-1/PCSK9 coding sequence were reported to be directly associated with either familial hypercholesterolemia in many countries²¹⁻²⁶ or familial hypocholesterolemia in black African and American populations^{27,28} likely resulting from gain and loss of function, respectively²⁹. So far, the only known function of NARC-1/PCSK9 is its ability to enhance the degradation of the LDLR within an acidic compartment³⁰⁻³², through an unknown mechanism³³.

Independently, two groups used microarray technology to study mRNAs that are regulated by cholesterol, or by the sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), and observed that hepatic rodent NARC-1/PCSK9 expression is

upregulated in SREBP-2 transgenic mice ³⁴ and downregulated by diet induced excess circulating cholesterol ³⁵. Recent data from our group demonstrated that NARC-1/PCSK9 mRNA levels are upregulated in hepatocyte-derived human HepG2 cells and primary hepatocytes by the HMG-CoA reductase inhibitors “statins”, but not by the LXR agonist 22-hydroxycholesterol, nor by the RXR agonist 9-*cis*-retinoic acid ³⁶. This process can be reversed by mevalonate treatment, in agreement with the implication of SREBP-2 in the upregulation of NARC-1/PCSK9 ³⁷. In contrast to that of NARC-1/PCSK9, the expression of SKI-1/S1P is not sensitive to cholesterol, despite being a key protease, which together with the metalloprotease S2P, activate the formation of the nuclear form of SREBPs ^{38,39}.

During development and in adulthood, NARC-1/PCSK9 is expressed in liver and small intestine, two regenerating organs implicated in cholesterol metabolism. By comparison, NARC-1/PCSK9 is only transiently expressed in cortical cells of the kidney and in specific brain regions where active neurogenesis takes place. These include the telencephalon, rostral extension of the olfactory epithelium and the cerebellum ⁴⁰. Whether expression in the latter organs is also controlled by cholesterol is unknown. Overexpression of NARC-1/PCSK9 cDNA in primary neurons isolated from telencephalon at embryonic day 12 (E12), suggested that this enzyme can enhance neurogenesis of progenitor brain telencephalic cells ⁴¹. In order to understand the neural function of NARC-1/PCSK9, we undertook the analysis of its expression in the pluripotent mouse P19 embryonal carcinoma cells, which are well suited for studies related to neuroectodermal cell development and

maturation. These cells can be efficiently induced to differentiate in culture into neurons and astroglia by combining cell aggregation and brief treatment with *all trans*-retinoic acid (RA) ^{42,43}.

Our data revealed that low levels of NARC-1/PCSK9 mRNA were detected in naive P19 cells. Upon neuroectodermal induction of P19 cells by RA, NARC-1/PCSK9 transcripts were induced ~7 fold with a maximum at day 2 of the RA treatment, followed by repression to levels below those of naive P19 cells. These findings suggested that early, transient induction, of NARC-1/PCSK9 mRNA may be needed to modulate neurogenesis/gliogenesis, reminiscent of its expression in telencephalon ⁴⁴. However, different from liver, in P19 cells NARC-1/PCSK9 mRNA does not seem to be significantly regulated by SREBP-2 and its upregulation does not affect the protein level of the endogenous LDLR.

We further extended our data towards the realm of a whole animal, using the model zebrafish (zf; *Danio rerio*). As in mouse, zf-NARC-1/PCSK9 is well expressed in the developing liver and intestine, as well as in cortical neurons and cerebellar granules where continued neurogenesis occurs. Specific knockdown of zf-NARC-1/PCSK9 mRNA in zebrafish embryos using morpholino antisense oligonucleotide technology led to the loss of the central nervous system (CNS) structures, such as the midbrain and hindbrain, and culminated in lethality at ~3-4 days post fertilization.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and neuroectodermal differentiation

Undifferentiated P19 embryonal carcinoma cells were maintained at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in modified minimum Eagle's medium (α-MEM; Invitrogen-GIBCO, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera, Etobicoke, ON, Canada), penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 µg/ml; GIBCO) and passaged every 48h. To allow aggregate formation, 1 x 10⁶ cells were cultured in 100 mm² bacterial-grade dishes (Fisher, Nepean, ON, Canada) in α-MEM supplemented with 5% FBS and 5% donor bovine serum (Cansera). The neuroectodermal differentiation of these cells was then induced by a 4-day treatment (in quadruplicate, n=4) or not (control, n=3) with 500 nM of *all-trans* retinoic acid (RA; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), with a medium renewal after 2 days. Aggregates were then dissociated to single cells with 0.025% trypsin-1mM EDTA (Invitrogen-GIBCO) and cells were replated 1:4 in the absence of RA on gelatinized-coated tissues culture dishes in 10 ml of Neurobasal medium containing B27 supplement, Glutamax and antibiotics (all products from Invitrogen-GIBCO). Medium was replenished after 3 days and cells were maintained until day 10. At selected days, cells were washed 3 x in phosphate buffer saline (PBS) and pelleted for further analysis.

Immunocytochemistry of P19 cells

For immunocytochemistry, we used monoclonal antibodies (mAb) at a dilution of 1/50 of either the neuronal nuclei (NeuN; Chemicon International, Temecula, CA) or glial fibrillary acidic protein (GFAP; Sigma-Aldrich), as markers of neurons and

glia, respectively. Accordingly, naive P19 cells or those cultivated up to day 10 with or without RA induction were successively fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized with 0.1% triton X-100/PBS, incubated with 150 mM Glycine/PBS for 5 min, blocked with 1% BSA/PBS (Sigma-Aldrich) for 30 min, and then incubated overnight with each mAb at 4°C. Immunoreactivity was revealed with a goat anti-mouse Alexa Fluor®555 (Invitrogen-Molecular Probes) at a 1/200 dilution in PBS for 45 min, rinsing and then stabilizing the fluorophore with a solution of 5% Dabco by weight (Sigma-Aldrich) in 90% glycerol/10% PBS. Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss Axiovert S100 tv microscope.

RNA preparation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) from undifferentiated P19, P19 aggregates and P19-derived neurons according to the recommendations of the manufacturer. Total RNA integrity was verified by 1% ethidium bromide-stained agarose gel according to predominant ribosomal RNA bands. Nucleic acid purification was measured by A_{260}/A_{280} and values of 1.6 to 2.0 were considered as pure preparations. Typically, 250 ng of total RNA was used for cDNA generation in a total volume of 20 μ l using the SuperScript II reverse transcriptase, 25 μ g/ml oligo (dT)₁₂₋₁₈, 0.5 mM 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates and 40 U of RNaseOUT, all products were used according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR (QPCR)

All primers (Invitrogen) were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) to produce amplicons that overlap exonic splicing junctions to avoid genomic DNA amplification (Table 1). All designed primers were submitted to BLAST databases to verify specificity. Optimization was evaluated using the Stratagene MX4000 multiplex quantitative PCR (QPCR) instrument and software. Optimal primer concentrations and cDNA standard curves were obtained for each target gene. From standard curves, the same concentration was used for QPCR amplification. All samples were submitted to two independent PCR reactions: one for the normalizing ribosomal protein S16 and the other for the gene of interest, each in triplicates, as reported ⁴⁵. Each reaction was in a final volume of 25 μ l using QuantiTec SYBR green PCR master mix from Qiagen (Mississauga, ON, Canada) in a thermal profile of an activation step (15 minutes at 95°C) followed by 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C and 30 seconds at 72°C. Relative mRNA levels for every sample were quantified using the C_t approach (fluorescence threshold), normalized with S16 expression as an endogenous RNA standard and calibrated by setting the control (day 0) at 1. The data shown correspond to representative experiments, in which P19 cells were treated (n=4) or untreated (n=3) with RA.

Western blot analysis

Cells were washed 3 x in PBS and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v)

sodium dodecyl sulfate) with a Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Proteins were separated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto HyBond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The blots were incubated for 1h in TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 10% non-fat dry milk. PC2 (Cter: 529-637; ⁴⁶, LDLR (Abcam, Cambridge, MA, USA), neural adhesion L1 ⁴⁷ or β -actin (Sigma-Aldrich) antibodies were diluted 1:1000, 1:2500, 1:2000 and 1:1000 respectively in the same buffer. After 2 h incubation at room temperature, membranes were washed and reincubated 1 h with either donkey anti-rabbit-HRP for PC2 and β -actin detection (1:5000; Amersham Biosciences) or rabbit anti-chicken-HRP for LDLR detection (1:5000; Abcam). Blots were probed using by ECL plus kit (Amersham Biosciences).

***In situ* hybridization (ISH) in mouse**

For ISH, mouse sense and antisense cRNA probes coding for mouse NARC-1/PCSK9 [nts. 1197-2090] ⁴⁸ and mouse LDLR [nts. 1800-2565; accession # BC019207] were labeled with [³⁵S]UTP and [³⁵S]CTP (1,250 Ci/mmol; Amersham), to obtain high specific activities of ~1000 Ci/mmol. Eight to ten μ m whole C1 mouse cryosections obtained at day 1 after birth (P1) from unperfused mice were fixed for 1h in 4% formaldehyde and hybridized overnight at 55°C as described ^{49,50}. For autoradiography, the sections were dipped in photographic emulsion

(NTB-2, Kodak), exposed for 6-12 days, developed in D19 solution (Kodak), and stained with hematoxylin.

ISH in zebrafish

In order to prevent the appearance of melanin pigmentation, embryos at approximately 18-24 hours post-fertilization (hpf) were grown in egg water supplemented with 0.003% of tyrosinase inhibitor 1-phenyl-2-thiourea (phenylthiocarbamide P-5272, Sigma). Staged embryos were manually dechorionated and fixed for 2 hours at room temperature or overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/PBS. After several washes in PBS, embryos were stored in 100% methanol until needed.

For riboprobe synthesis, a 1,323 bp PCR fragment of the zf-NARC-1/PCSK9 cDNA comprising the initiator methionine (nts 388-1710; Fig. S3) was cloned into pCR 2.1-TOPO, excised with *EcoRI* and subcloned into pBluescript II. For antisense and sense riboprobe synthesis, T3 and T7 RNA polymerases were used after linearization of the plasmid with *SmaI* and *HindIII*, respectively. In all stages examined, both sense and antisense probes were analyzed. Whole-mount ISH with digoxigenin-labeled RNA probes and antibody staining were essentially done according to the Schulte-Merker *et al.* (1992) and Thisse *et al.* (1993) at a hybridization temperature of 70°C. Stained whole-mount embryos were mounted in glycerol and visualized under a Leica MZFLIII stereomicroscope. Pictures were taken with a Leica DC350F camera.

Zebrafish NARC-1/PCSK9 antibody production and Western blots

A 14mer peptide (S₁₄₄IPWNLQRVLQNK₁₅₆C) corresponding to the predicted N-terminal 144-156 sequence of mature zf-NARC-1/PCSK9 following cleavage of the propeptide (Fig. S3) was synthesized with an additional cysteine residue at the carboxyl terminus using solid-phase chemistry (Peptide Synthesis Facility of the Sheldon Biotechnology Centre, McGill University). The peptide was coupled through the C-terminal cysteine residue to keyhole limpet hemocyanin and a polyclonal antibody was raised in rabbit by immunization with the conjugate. The antiserum was purified prior to use by a peptide affinity column.

Single zebrafish embryos at 24 hpf were solubilized in 30 µl of 2X Laemmli buffer (125 mM Tris (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 0.01% 2-mercaptoethanol), heated at 96°C for 10 min, and centrifuged in a Microfuge (13,000g) for 15 min. Proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and blotted onto HyBond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham). The blot was blocked with 0.5% membrane blocking agent (Amersham) overnight at 4°C and incubated with primary antisera zf-NARC-1/PCSK9 which was diluted to 1:4,000 in 0.25% membrane blocking agent (Amersham) /PBST (0.01 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 1.4 M NaCl, 0.03 M KCl pH 7.4 containing 0.1% Tween-20) for 1h at room temperature followed by three washes in PBST. The membrane was then incubated with donkey anti-rabbit-HRP secondary antibody, (Amersham) diluted to 1:4,000 in PBST followed by six washes with PBST. The blot was developed by ECL with monitoring for

chemiluminescence according to the manufacturer's instructions and developed using Hyperfilm (Amersham). The membrane was then stripped by incubating at 60°C for 30 min in stripping buffer (65 mM Tris pH 6.7, 2% SDS) and probed for actin using anti-actin antibody (Sigma) diluted at 1:500 for 1h at room temperature. After three washes with PBST, the membrane was incubated with Goat Anti-mouse HRP (Calbiochem) secondary antibody at 1:4,000 dilution, for 1h at RT. The blot was developed for chemiluminescence as outlined above.

Zebrafish maintenance and morpholino-oligonucleotide microinjection

Adult zebrafish were obtained from Scientific Hatcheries (Huntington Beach, CA, USA) and maintained within a controlled light/dark cycle at 28.5°C⁵¹. Embryos were developed under identical conditions in water containing 0.006% Instant Ocean salts. Morpholino oligonucleotides (MO) were obtained from Gene Tools, Inc. and diluted to 5 ng/nL in Danieaux buffer (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5.0 mM Hepes pH 7.6) containing 0.1% phenol red⁵². Approximately 2 nL (10 ng MO) was injected into the yolk of 1- to 2-cell stage embryos using a PLI-100 microinjection system (Harvard Apparatus, St. Laurent, QC, Canada). Phenotypic observation and documentation were accomplished using a Leica DC300F digital camera connected to a Leica MZFLIII stereomicroscope (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canada). Morpholino sequences were: MO1, 5' GACGCTTCTCATTCTCTGTGCTTTC 3'; five base-pair mismatch, MO1-mm, 5' GAgGCTTgTCATTgTCTcTGgTTTC 3'; and negative scramble control, Ctrl, 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'.

RESULTS

Neuroectodermal differentiation of P19 cells and the neuroendocrine convertase PC2

Herein we used the pluripotent P19 cell line as a model to study whether NARC-1/PCSK9 was associated with neuroectodermal induction and/or differentiation. Accordingly, P19 cells were induced to differentiate into neuroectodermal derivatives following aggregation in the presence of 500 nM RA (days 0-4). Upon dissociation of the aggregates, the induced cells were cultured for another 6 days (days 5-10) as adherent monolayers in the absence of RA, resulting in neurite outgrowth (already visible at day 7; *not shown*) extending from neuronal cells (see arrows in left panels of Fig. 1). In order to assess the extent of neuronal (NeuN positive) *versus* glial (GFAP-positive) differentiation induced by RA, we labeled the cells with mAbs against these markers. The data revealed that at day 10 post RA treatment the cells are >95% expressing NeuN, while <5% express GFAP (Fig. 1), both being induced by RA treatment (Fig. 1 and supplemental Fig. S1). Therefore, we conclude that the morphological purity of the RA-treated cell population at day 10 is mostly (>95%) composed of neuronal cells. To follow the neural differentiation process, we also used the neuroendocrine proprotein convertase PC2⁵³⁻⁵⁵ as a marker. This convertase is responsible for the processing of numerous precursors of polypeptide hormones within secretory granules, such as pro-opiomelanocortin⁵⁶, pro-enkephalin⁵⁷, pro-somatostatin⁵⁸ and pro-dynorphin⁵⁹. Its precursor proPC2 (~74 kDa) is autocatalytically processed within secretory granules into

mature PC2 (~67 kDa)⁶⁰. Thus, both the mRNA expression level of PC2 (QPCR; Fig. 2a) and the extent of its zymogen processing (Western blotting; Fig. 2b) were expected to increase upon neuroectodermal differentiation. Indeed, treatment with RA resulted in a ~350-fold upregulation of PC2 mRNA at day 10 (as compared to the control at day 0), whereas in the absence of RA only a ~30-fold increase was observed (Fig. 2a). Western blot analysis confirmed these data since both proPC2 and PC2 are upregulated and further showed that the PC2/proPC2 ratio reached a maximum (≥ 0.55) at days 8-10 (Fig. 2b), which is in accord with a more favorable neuroendocrine environment for the autocatalytic zymogen processing of proPC2 into PC2 at these late stages. A similar upregulation of the neurofilament M protein was also observed (*not shown*).

Uniqueness of the NARC-1/PCSK9 expression profile during neuroectodermal differentiation of P19 cells

The mRNA expression profile of NARC-1/PCSK9 was very different from that of PC2 (Fig. 3). A maximum expression level (~7 fold) was attained at day 2 during RA exposure, and then abruptly decreased to reach levels ~3-5-fold below those of undifferentiated P19 cells from day 3 onwards up to day 10. This repression occurring after the aggregation period was also observed in the absence of RA treatment, suggesting that it may be related to P19 cells handling and/or culture conditions. Retinoic acid and not cell aggregation caused the transient upregulation of NARC-1/PCSK9 since aggregation in absence of RA coincided with the convertase downregulation at day 2 (Fig. 3). Neuroectodermal cell derivatives are

also obtained when the 4 day-RA treatment is applied on cell monolayers instead of aggregates, but the proportion of neurons in the differentiated populations is decreased, while fibroblastic-like cells are abundant⁶¹. For comparison, RA was incubated with either adherent or suspended P19 cells for 4 days, and then the cells replated at the end of day 4 and cultured until day 10. Morphological analysis at day 10 revealed ~50% less neuritic extensions in the adherent cell protocol *versus* the suspension/aggregate one. Furthermore, PC2 mRNA upregulation was less pronounced in the adherent P19 cells protocol (~150-fold increase; *not shown*). Nevertheless, the peak of NARC-1/PCSK9 mRNA expression observed at day 2 during RA treatment of suspended P19 aggregates was also obtained when the 4-day RA treatment was applied to adherent P19 cells (*not shown*). Thus, RA can induce the expression of NARC-1/PCSK9 in both adherent and suspended P19 cells. Unfortunately, using a polyclonal antibody raised against mouse NARC-1/PCSK9 (Nassouri, N. and Seidah N.G., *unpublished data*) Western blots or biosynthetic analyses were not sensitive enough for the detection of endogenous NARC-1/PCSK9 protein expression in P19 cells before and after RA treatment (*not shown*). Therefore, we are unable at the present time to define the fate of NARC-1/PCSK9-positive cells that are induced by RA treatment, and whether they will differentiate into glia or neurons at days 6-10. In contrast to what observed in P19 cells, the upregulation of NARC-1/PCSK9 by RA treatment was not detected in adherent HepG2 cells (shown in supplemental Fig. S2), indicating either that the RA effect is indirect or that P19 cells contain an extra factor(s) absent from HepG2 cells.

In a similar fashion, we analyzed the mRNA profile of the regulated proprotein convertase PC5/6 and those of the constitutively expressed ubiquitous convertases Furin and SKI-1/S1P⁶². While Furin and SKI-1/S1P did not exhibit significant quantitative variations in their profiles throughout the differentiation program, PC5/6 showed a similar profile to that of PC2, increasing gradually and reaching a maximum at day 10 (~14-fold). Interestingly, we consistently observed the presence of a peak of PC5/6 expression (~4-fold increase) at day 2.

Analysis of the cholesterologenic genes HMG-CoA reductase and LDLR

Since NARC-1/PCSK9 was shown to be downregulated by cholesterol in the liver⁶³, likely through the decreased activation of SREBP-2, it was of interest to test whether the observed NARC-1/PCSK9 upregulation in P19 cells following RA treatment (Fig. 3) was concomitant with that of cholesterologenic genes. However, mRNA levels of SREBP-2 were not significantly affected by the RA treatment (*not shown*). Furthermore, the expression profile of HMG-CoA reductase, a key limiting enzyme involved in cholesterol synthesis that is strongly upregulated by active SREBP-2⁶⁴, was very different from that of NARC-1/PCSK9 (Fig. 4a). It reached a plateau at days 9-10, but did not significantly peak at day 2, the time at which NARC-1/PCSK9 mRNA levels are maximal (Fig. 3). This indicated that in P19 cells the RA-induced upregulation of NARC-1/PCSK9 mRNA at day 2 likely implicates another regulatory mechanism.

NARC-1/PCSK9 is known to enhance the degradation of the LDLR⁶⁵, via an indirect mechanism⁶⁶ and in a cell- and tissue-specific manner⁶⁷. As expected

from the data obtained for HMG-CoA reductase, QPCR analysis revealed that the mRNA levels of the LDLR were not significantly altered by RA treatment (*not shown*). In addition, the peak of NARC-1/PCSK9 expression at day 2 did not affect LDLR protein levels, as analyzed by Western blotting (done in triplicate at days 0 to 4; Fig. 4b). NARC-1/PCSK9 may thus fulfill other function(s) in these cells. Accordingly, comparative ISH analysis of NARC-1/PCSK9 and LDLR mRNAs in a whole mouse at postnatal day 1 (P1; Fig. 4c) revealed that, aside from liver and intestine where both mRNAs were abundant and co-localized, their expression were unique. Thus, the LDLR was largely distributed, with noticeable hot spots of expression in thymus, teeth, spinal and dorsal root ganglia and trigeminal nerve. In contrast, NARC-1/PCSK9 was only detected in few tissues other than liver and intestine, including cerebellar neurons⁶⁸ where the LDLR is not prominent (Fig. 4c).

Cloning and developmental expression of NARC-1/PCSK9 in zebrafish

Several attempts to knockdown the NARC-1/PCSK9 mRNA in P19 cells using various siRNAs and transfection conditions failed to decrease efficiently the level of endogenous NARC-1/PCSK9 mRNA at day 2, the time of maximal expression, even though we obtained a ~60% reduction at day 0 (*not shown*). Accordingly, we decided to test the *in vivo* implication of NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system using antisense morpholino-oligonucleotide knockdown approaches in the zebrafish. Alignment of human and rodent NARC-1/PCSK9 cDNAs with the zebrafish genome allowed us to identify a zebrafish orthologue

using a combination of Ensembl and UCSC annotations. The Ensembl gene from nts 162,004-191,952 coding for zf-NARC-1/PCSK9 can be found at: http://www.ensembl.org/Danio_rerio/geneview?gene=ENSDARG00000037996;db=core. The UCSC zebrafish 5606 bp annotation was found on chromosome 7, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgid=60551137&hgt.right1=+%3E+&position=chr7%3A14772303-14775302>. Thus, a single NARC-1/PCSK9 gene was detected in the zebrafish genome, exhibiting a 68% protein identity within the catalytic subunit to its mouse orthologue. The complete assembled sequence of zf-NARC-1/PCSK9, together with its predicted signal peptide and post-translational modifications are shown in supplemental Fig. S3.

Based on this sequence information, we analyzed by RT-PCR the developmental expression of zf-NARC-1/PCSK9 (Fig. 5a). The data showed that zf-NARC-1/PCSK9 transcripts were detectable at the 3-somites stage coinciding with the onset of cell fate acquisition within proneural domains (neurogenesis = 3-5 somites stage)^{51,69,70}. Using ISH with a 1,323 base zf-NARC-1/PCSK9-specific cRNA probe (Fig. S3), we analyzed the expression of this convertase at the 6-somites stage (Fig. 5b) and 4-5 days post fertilization (dpf) periods (Fig. 5c). The data showed that at 12h post fertilization (hpf; 6-somites) zf-NARC-1/PCSK9 was ubiquitously expressed throughout the epiblast with higher levels within the presumptive notochord. At 4-5 dpf the enzyme was highly expressed in liver and intestine, as in mouse and rat⁷¹. Within the neural network, it was found in centers of continued neurogenesis such as cortical and intracranial neurons and cerebellar granule cell

precursors (Fig. 5c). Thus, NARC-1/PCSK9 is expressed in specialized neurogenic centers in both zebrafish and mammals.

Knockdown of NARC-1/PCSK9 in zebrafish

We next used the technology of morpholino oligonucleotide-based translation inhibition of NARC-1/PCSK9 using the zebrafish as a model of vertebrate development. From the deduced assembled sequence of zf-NARC-1/PCSK9 mRNA, we identified a unique sequence comprising the initiator methionine which was used to synthesize a morpholino-antisense oligonucleotide (MO1) (Fig. S3). In order to avoid non-specific gene targeting, we performed blast analyses of zebrafish genomic sequences and confirmed the uniqueness of the chosen MO1. Furthermore, to test the specificity of the morpholino oligonucleotides we generated an affinity purified polyclonal antibody against the N-terminal 144-156 peptide sequence of the catalytic subunit of zf-NARC-1/PCSK9 of sequence S₁₄₄IPWNLQRVLQNK₁₅₆ (Fig. S3; see methods). Using this antibody we performed Western blots of single embryos and showed that while injection of MO1 reduced the protein level of endogenous zf-NARC-1/PCSK9 by ~60%, the other two control morpholino- oligonucleotides including an MO1 5-base pair mismatch (MO1-mm) and a standard scramble control (Scramble) had no effect (Fig. 6a). Amazingly, injection of MO1 in zebrafish eggs resulted in CNS degeneration with high penetrance (Fig. 6b), as compared to the MO1-mm and Scramble control morpholino oligonucleotides, which yielded much decreased phenotypic penetrance or normal CNS development, respectively (Fig. 6b). At 24 hpf a small

cleft, presumed to be the hindbrain represented the only discernable CNS architecture within morphant embryos (Figs. 6c,d). By 48 hpf abnormal neurogenesis continued creating multiple neural chambers in an anterior-posterior orientation (Figs. 6e,f). These defects culminated in lethality between 48 and 96 hpf (Figs. 6g,h). Therefore, these data suggest that in zebrafish *zf-NARC-1/PCSK9* is an essential gene.

Discussion

Initial studies showed that *NARC-1/PCSK9* is transiently expressed during embryonic development in neurogenic centers such as those in the telencephalon and cerebellum, and that it is no longer expressed in mature CNS neurons of rodents ⁷². In this work we undertook the study of the possible role of this convertase in neuroectodermal differentiation using P19 cells and zebrafish as models. The data revealed that upon RA induction of P19 cells leading to neurons and glial cells, *NARC-1/PCSK9* mRNA levels peak at day 2 and fall off thereafter, a profile quite different from that of the other convertases (Fig. 3). This suggested that *NARC-1/PCSK9* may have a unique role at the onset of the neuronal/neuroectodermal differentiation process. Interestingly, a minor but statistically significant peak of *PC5/6* mRNA at day 2 was also observed, reminiscent of the co-upregulation of *NARC-1/PCSK9* and *PC5/6* during liver regeneration following partial hepatectomy in rat ⁷³. Thus, it may well be that both

NARC-1/PCSK9 and PC5/6 may play complementary and/or additive roles in the pre-differentiation period.

We next attempted to uncover the mechanism behind the upregulation of NARC-1/PCSK9 at day 2 in P19 cells. This effect is only observed following RA treatment of either adherent cells or aggregated cells in suspension, but not in untreated controls. Accordingly, we deduced that the aggregation step is not responsible for the observed upregulation, but rather that RA is the inducing agent. In the nucleus, the RA signal is transduced by binding to a heterodimeric pair of retinoid receptors (RAR/RXR)⁷⁴. Since HepG2 cells, which express both receptors⁷⁵, when treated with RA do not upregulate the NARC-1/PCSK9 transcripts (Fig. S2), it is likely that the effect of RA in P19 cells is indirect, possibly by activating intervening proteins or transcription factors⁷⁶, which may then upregulate NARC-1/PCSK9 mRNA levels. Furthermore, no apparent RA-responsive element (RARE) could be identified in the proximal ~2 kb of the mouse and human *PCSK9* promoters (*not shown*).

Since NARC-1/PCSK9 transcription is highly upregulated by SREBP-2^{77,78}, we next turned our attention to the effect of RA on SREBP-2 transcription, revealing that it is unchanged during the differentiation program (*not shown*). However, since it is mostly the nuclear nSREBP-2 protein that is the active ingredient, it was plausible that the activation of the Golgi form of SREBP-2 into its nuclear form nSREBP-2 by the concerted action of SKI-1/S1P and S2P⁷⁹ may be limiting. Our data reveal that the transcription of SKI-1/S1P is not regulated by RA in P19 cells (Fig. 3). Furthermore, the mRNA levels of the limiting HMG-CoA reductase, which

critically depends on nSREBP-2 activity, only increased from days 5-10, indicating that nSREBP-2 is not the key NARC-1/PCSK9 transcription factor at day 2 (Fig. 3). We cannot at the present time eliminate the possibility that the peak observed at day 2 may be due to an enhanced specific stabilization of NARC-1/PCSK9 mRNA, possibly via specific interactions with its 5' UTR, as was the case of insulin, PC1 and PC2 mRNAs at high glucose levels⁸⁰, rather than due to direct transcriptional activation. However, this mechanism will have to be quite restrictive since the mRNA levels of the cholesterologenic genes HMG-CoA reductase, LDLR, SKI-1/S1P, SREBP-2 did not peak at day 2.

The only attributable function of NARC-1/PCSK9 is the enhancing of the degradation of the LDLR in liver and hepatocyte-derived cell lines⁸¹⁻⁸⁴. However, the mechanism behind this effect is not understood, as it does not seem to result from a direct cleavage of the LDLR by NARC-1/PCSK9 in an acidic compartment⁸⁵. This would suggest that in liver NARC-1/PCSK9 may activate and/or change the trafficking of another protein(s) that would be responsible for the degradation of the LDLR. Since the protein level of the LDLR in P19 cells treated with RA did not change from days 0-4 (Fig. 4b), even though NARC-1/PCSK9 was upregulated at day 2, this indicates that the cellular conditions in P19 cells may not be appropriate for LDLR enhanced degradation by NARC-1/PCSK9. This led us to conclude that similar to CHO cells⁸⁶, the NARC-1/PCSK9-induced enhanced degradation of the LDLR is not efficient in P19 cells, and that NARC-1/PCSK9 may have other function(s) in these cells. Indeed, comparative ISH of NARC-1/PCSK9 and LDLR in consecutive sections of a whole mouse on the first day after birth (P1) revealed

both distinct and overlapping expression patterns (Fig. 4c). Thus, while both mRNAs co-localize in liver, intestine and kidney, the high expression of NARC-1/PCSK9 in cerebellum does not coincide with that of the LDLR, which is generally not rich in the CNS. Therefore, NARC-1/PCSK9 may have new functions in nervous system, possibly related to neurogenesis, among others⁸⁷. This may involve the NARC-1/PCSK9 enhanced degradation of other receptor types or proteins during development of the cerebellum and telencephalon.

We therefore decided to study such function(s) within the realm of a whole animal such as the zebrafish, which represents a well-studied experimental model since it develops externally with optical clarity. These qualities, together with antisense-based translation inhibition techniques, allow for visual phenotypic assessment of targeted gene “knockdown”. Mining of zebrafish genomic databases allowed us to put together a complete primary structure of zf-NARC-1/PCSK9 (Fig. S3). The deduced sequence predicts a 667 aa proprotein with a 22 aa signal peptide (aa 1-22), and a 121 aa pro-segment (aa 23-143), resulting in a 525 aa mature protein. The zymogen activation site predicted at SSIFAQ¹⁴³↓SIPWN is very similar to that found in human and mouse, with the only conservative variation of zebrafish Ile¹⁴⁰ to Val in mammals. Noticeably, we also deduced the possible presence of an extra-N-glycosylation site within the pro-segment of zf-NARC-1/PCSK9 (Asn⁷⁵) that is not found in mammalian orthologs. Finally, the C-terminal Cys/His rich domain of zf-NARC-1/PCSK9 is similar to that found in the human and mouse sequences, with the presence of two CysCys-X₆-Cys motifs.

We have utilized morpholino oligonucleotides to selectively inhibit zf-NARC-1/PCSK9 translation (Fig. 6), to create morphant phenotypes and to document the resulting visible morphological defects. Based on murine NARC-1/PCSK9 gene expression patterns⁸⁸ it was predicted that defects would be associated with neural and/or hepatic/intestinal/renal organogenesis. In the zebrafish, neurogenesis begins post-gastrulation (approximately 10 hpf) with the formation of the neural plate, a conserved vertebrate structure. The neural plate then undergoes anterior-posterior patterning during segmentation, creating visible regionalized structures by 24 hpf⁸⁹. Hepatic cell fate specification from the presumptive anterior endoderm begins at approximately 16-18 hpf prior to primitive gut tube formation⁹⁰. However the liver only acquires a histologically distinct architecture at 34 hpf⁹¹. At 24 hpf, embryos injected with MO1 display defective neurogenesis (Fig. 6d) as compared to wild-type (Fig. 6c). This includes absence of tectum (red arrow), midbrain-hindbrain boundary (arrow head), as well as decreased hindbrain architecture (black arrow and asterisk) (Figs. 6c,d). Comparison of wild-type (Fig. 6e) and MO1 injected (Fig. 6f) embryos at 48 hpf indicates the presence of further abnormalities in neural development. The observed overall neural degeneration is followed by regionalization at 48 hpf into several chambers of unknown identity (Fig. 6f). The knockdown of zf-NARC-1/PCSK9 expression resulted in an ~60% decreased protein levels, but not complete loss of protein (Fig. 6a). The specific phenotypes observed suggest that in zebrafish neurogenesis is highly sensitive to altered NARC-1/PCSK9 expression. This is reminiscent of the effects observed in human NARC-1/PCSK9

heterozygote missense mutations (50% loss of function) resulting in familial hypocholesterolemia^{92,93}. It remains unclear whether hepatic specification or liver organogenesis is affected in the zf-NARC-1/PCSK9 morphants at this time, demanding further investigation via marker-gene *in situ* and histological analysis.

The refractile (as opposed to transparent) appearance of neural tissue in morphants is a hallmark of cell death, particularly associated with neural degeneration and was used to initially identify neuron survival mutants in large-scale zebrafish chemical mutagenesis screens⁹⁴. Although not visibly evident, apoptosis is an essential component of normal neurogenesis, whereby neuronal pathways form via axonal extension in a “first-come-first-served” basis requiring redundant projections to undergo programmed cell-death⁹⁵. The close association between differentiation and apoptosis during neurogenesis may confer increased sensitivity to cellular alterations particularly those affecting cell cycle and metabolism⁹⁶. Interestingly, the known autosomal dominant natural human NARC-1/PCSK9 mutations resulting in hypercholesterolemia places this gene within such a metabolic context⁹⁷⁻¹⁰⁰.

While this work was in progress, the complete knockout of NARC-1/PCSK9 in mouse was reported¹⁰¹. The latter work confirmed earlier studies showing that NARC-1/PCSK9 enhances the degradation of the LDLR, and hence its loss would result in higher hepatic LDLR levels¹⁰²⁻¹⁰⁴. Nevertheless, it was astonishing to find out that in mouse the loss of NARC-1/PCSK9 expression does not result in a lethal phenotype¹⁰⁵, as is the case in zebrafish (this work).

The association of NARC-1/PCSK9 with the LDLR degradation is insufficient to explain the zebrafish morphant defects, since LDLR (-/-) mice are viable ¹⁰⁶, suggesting that this proprotein convertase embodies biological activities beyond LDLR homeostasis, as also evidenced by its expression in brain areas lacking the LDLR (Fig. 4c). Nevertheless, differences do exist between the mouse and zebrafish, including the absence of placenta and external embryonic growth in the fish. In this context, a recent study on Veph showed that the knockdown of this transiently expressed CNS protein in neurogenesis centers, results in a lethal phenotype in zebrafish but not in Veph (-/-) mice ¹⁰⁷. Death in developing zebrafish lacking Veph transcripts seems to follow defects in midbrain-hindbrain boundary and otic vesicle formation. A similar phenotype was observed upon knockdown of zf-NARC-1/PCSK9 with defective neurogenesis including loss of tectum, midbrain-hindbrain boundary, as well as disorganized hindbrain architecture (Fig. 6c,d). It remains to be seen whether NARC-1/PCSK9 has different functions in mammals as opposed to fish. Alternatively, the CNS of mammals may have developed compensatory mechanisms for the lack of NARC-1/PCSK9 that are absent in teleosts. Detailed mapping of the functional domains of NARC-1/PCSK9 in zebrafish and mouse may lead to a better understanding of the various functions of this fascinating convertase.

Acknowledgements

We would like to specially thank Johanne Duhaime for excellent assistance in identifying and concatenation of the zf-NARC-1/PCSK9 cDNA sequences. We also wish to thank Ann Chamberland for QPCR analyses, Marie-Claude Asselin for cell culture and Josée Hamelin for cDNA cloning of mouse LDLR. The authors are also indebted to all the members of Dr. Seidah's lab for their constant and precious advice and help. The secretarial assistance of Mrs. Brigitte Mary is greatly appreciated. This work was supported in part by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants: MOP-36496, a Canadian Chair # 201652, MGP 44363, and by a group grant MGC-64518.

LEGENDS

Table 1. Primers used for QPCR. Accession numbers of the chosen QPCR forward and reverse primers are included.

Fig. 1. Immunocytochemistry of RA-treated P19 cells at day 10. The type of mAb used (NeuN or GFAP) is emphasized (right panels). The left panels show the cells under visible light. Arrows point to neural extensions.

Fig. 2. PC2 as a neuronal marker. Undifferentiated P19 cells (day 0), RA-treated P19 aggregates (days 1-4) and P19 derived-neurons (days 5-10) were collected

every 24h. (a) Relative PC2 mRNA expression analyzed by QPCR. PC2 expression was normalized against the ribosomal protein S16 one and calibrated with that found in undifferentiated cells (day 0). The histogram shown is representative of three and four independent differentiation on RA- untreated and treated cells, respectively. Each QPCR experiment was done in triplicates (bars indicate the standard errors). (b) Immunoblot analyses of PC2 protein and β -actin marker during neuroectodermal differentiation of P19 cells. (c) Results of the ImageQuant quantitation of the PC2 and proPC2 arbitrary protein levels are emphasized.

Fig. 3. QPCR profiles of NARC-1/PCSK9, PC5/6, Furin and SKI-1/S1P during neuroectodermal differentiation of P19 cells. Each sample was normalized against the ribosomal protein S16 expression and calibrated with undifferentiated cells (day 0).

Fig. 4. Cholesterol-independent role of NARC-1/PCSK9 in P19 cells. (a) QPCR analysis of the relative HMG-CoA reductase mRNA levels. (b) Immunoblot analysis of the LDLR levels on days 0 to 4 of RA treated P19 cells. The migration positions of the LDLR (~160 kDa) and that of the internal standard β -actin (~42 kDa) are emphasized. (c) Comparative ISH of mouse NARC-1/PCSK9 and LDLR at P1. Spinal ganglia, SG; dorsal root ganglia, DRG; trigeminal nerve, TN.

Fig. 5. Developmental expression of zf-NARC-1/PCSK9. (a) RT-PCR analysis of NARC-1/PCSK9 expression in zebrafish during gastrulation/segmentation. Actin

was used as an internal standard. (b) *In situ* hybridization of zf-NARC-1/PCSK9 12 hpf at the 6-somites stage, and (c) at 4 and 5 dpf.

Fig. 6. Validation of morpholino-based translation inhibition and phenotypic consequences of zf-NARC-1/PCSK9 knockdown. Morpholino oligonucleotides directed against the starter methionine of zf-NARC-1/PCSK9 (MO1), its five base-pair mismatch (MO1-mm) and scramble control (Scramble Ctrl) at 10ng each were injected into 1- to 2-cell stage embryos and overall morphology assessed at 24 hpf. (a) Knockdown of zf-NARC-1/PCSK9 protein following morpholino injection *in vivo*. Western blot analysis of embryos injected with 10 ng zf-NARC-1/PCSK9 or control morpholinos using rabbit zf-NARC-1/PCSK9 polyclonal antibody (upper panel) and anti-mouse actin monoclonal antibody as a loading control (lower panel). Protein extracted from single 24 hpf embryo were loaded onto each lane. WT, uninjected; MO1, zf-NARC-1/PCSK9 morpholino; MO1-mm, five base-pair mismatch control; scramble, control MO. (b) Central nervous system degeneration was observed with the following frequencies 50/54 (MO1), 8/48 (MO1-mm) and 0/50 (Scramble Ctrl), expressed as percentages in the histogram. (c) Wild-type and (d) MO1 injected embryos at 24 hpf display defective neurogenesis that includes absence of tectum (red arrow), midbrain-hindbrain boundary (arrow head) as well as decreased hindbrain architecture (black arrow and asterisk). Comparison of (e) wild-type and (f) MO1 injected embryos at 48 hpf indicates the presence of further abnormalities in neural development. (e-h) These defects culminate in lethality between 48 and 96 hpf.

Supplemental Fig. S1. Immunocytochemistry of naive and untreated P19 cells . The type of mAb used (NeuN or GFAP) is emphasized for either naïve P19 cells at day 0 (D0), or untreated (-RA) P19 cells at day 10 (D10). Left panels show the cells under visible light.

Supplemental Fig. S2. QPCR of NARC-1/PCSK9 in HepG2 cells. Untreated (gray bars) or treated (black bars) HepG2 cells with RA for 4 days and QPCR performed at each day in triplicate.

Supplemental Fig. S3. cDNA and protein sequence deduced for zf-NARC-1/PCSK9. The deduced sequence was deduced from concatenation of zebrafish genomic and EST data. The predicted signal peptide (aa 1-22) is underlined, together with the active site Asp¹⁷⁷, His²¹⁷, Ser³⁷⁷ and the oxyanion hole Asn³⁰⁹ are emphasized. The zymogen activation site SSIFAQ¹⁴³↓SIPWN is very similar to the SSVFAQ¹⁵²↓SIPWN site in human NARC-1/PCSK9^{108,109}. The antigen used for antibody production is in bold and underlined. The position of the predicted two N-glycosylation sites at Asn^{75,397} as well as the Tyr²⁶ sulfation site are shown as shaded amino acids. The two oligonucleotides (sense and antisense) that were used to obtain by RT-PCR the 1,323 base zf-NARC-1/PCSK9 cRNA are boxed. Finally, the morpholino oligonucleotide sequence around the initiator³⁸⁸ATG used in the knockdown experiment is shaded. The stop codon is represented by an asterisk.

Reference List

1. Yanagita,M., Hoshino,H., Nakayama,K. & Takeuchi,T. Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines. *Endocrinology* **133**, 639-644 (1993).
2. Seidah,N.G. & Chretien,M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45-62 (1999).
3. Zhou,A., Webb,G., Zhu,X. & Steiner,D.F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748 (1999).
4. Seidah,N.G. *et al.* Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1321-1326 (1999).
5. Sakai,J. *et al.* Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* **2**, 505-514 (1998).
6. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
7. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
8. Seidah,N.G. & Prat,A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem.* **38**, 79-94 (2002).
9. Thomas,G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753-766 (2002).
10. Roebroek,A.J. *et al.* Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125**, 4863-4876 (1998).
11. Mbikay,M. *et al.* Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6842-6846 (1997).
12. Denis,F. *et al.* Alternative proteolytic processing of mouse mammary tumor virus superantigens. *J. Virol.* **74**, 3067-3073 (2000).
13. Benjannet,S. *et al.* Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879-10887 (2001).

14. Decroly,E., Benjannet,S., Savaria,D. & Seidah,N.G. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**, 68-72 (1997).
15. Lenz,O., ter Meulen,J., Klenk,H.D., Seidah,N.G. & Garten,W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12701-12705 (2001).
16. Khatib,A.M., Siegfried,G., Chretien,M., Metrakos,P. & Seidah,N.G. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy : novel targets in cancer therapy. *Am. J Pathol.* **160**, 1921-1935 (2002).
17. Abifadel,M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
18. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
19. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
20. Abifadel,M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
21. Abifadel,M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
22. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
23. Attie,A.D. & Seidah,N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
24. Timms,K.M. *et al.* A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum. Genet.* **114**, 349-353 (2004).
25. Allard,D. *et al.* Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **26**, 497 (2005).
26. Pisciotta,L. *et al.* Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* (2005).
27. Cohen,J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**, 161-165 (2005).
28. Kotowski,I.K. *et al.* A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410-422 (2006).

29. Attie,A.D. & Seidah,N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
30. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
31. Maxwell,K.N. & Breslow,J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
32. Park,S.W., Moon,Y.A. & Horton,J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
33. Attie,A.D. & Seidah,N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
34. Horton,J.D. *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12027-12032 (2003).
35. Maxwell,K.N., Soccio,R.E., Duncan,E.M., Sehayek,E. & Breslow,J.L. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* **44**, 2109-2119 (2003).
36. Dubuc,G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
37. Dubuc,G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
38. Sakai,J., Nohturfft,A., Goldstein,J.L. & Brown,M.S. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site- 1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* **273**, 5785-5793 (1998).
39. Brown,M.S. & Goldstein,J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11041-11048 (1999).
40. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
41. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).

42. McBurney, M.W. P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 135-140 (1993).
43. Rudnicki, M.A., Reuhl, K.R. & McBurney, M.W. Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotent P19 embryonal carcinoma cells. *Development* **107**, 361-372 (1989).
44. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
45. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
46. Benjannet, S. *et al.* Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **294 (Pt 3)**, 735-743 (1993).
47. Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R. & Schachner, M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* **278**, 10381-10388 (2003).
48. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
49. Marcinkiewicz, M. *et al.* Nerve growth factor and proprotein convertases furin and PC7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in Schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells. *J. Comp. Neurol.* **403**, 471-485 (1999).
50. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
51. Westerfield, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene (2000).
52. Nasevicius, A. & Ekker, S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**, 216-220 (2000).
53. Seidah, N.G. *et al.* cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* **9**, 789 (1990).

54. Scopsi,L., Gullo,M., Rilke,F., Martin,S. & Steiner,D.F. Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **80**, 294-301 (1995).
55. Jeannotte,R., Paquin,J., Petit-Turcotte,C. & Day,R. Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* **16**, 1175-1187 (1997).
56. Benjannet,S., Rondeau,N., Day,R., Chretien,M. & Seidah,N.G. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3564-3568 (1991).
57. Breslin,M.B. *et al.* Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *J. Biol. Chem.* **268**, 27084-27093 (1993).
58. Galanopoulou,A.S., Seidah,N.G. & Patel,Y.C. Heterologous processing of rat prosomatostatin to somatostatin-14 by PC2: requirement for secretory cell but not the secretion granule. *Biochem. J.* **311 (Pt 1)**, 111-118 (1995).
59. Berman,Y. *et al.* Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. *J. Neurochem.* **75**, 1763-1770 (2000).
60. Benjannet,S. *et al.* Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **294 (Pt 3)**, 735-743 (1993).
61. Laplante,I., Beliveau,R. & Paquin,J. RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *J Neurobiol.* **60**, 289-307 (2004).
62. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
63. Maxwell,K.N., Soccio,R.E., Duncan,E.M., Sehayek,E. & Breslow,J.L. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* **44**, 2109-2119 (2003).
64. Horton,J.D., Goldstein,J.L. & Brown,M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin. Invest* **109**, 1125-1131 (2002).
65. Maxwell,K.N. & Breslow,J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).

66. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
67. Park,S.W., Moon,Y.A. & Horton,J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
68. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
69. Korzh,S., Emelyanov,A. & Korzh,V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech. Dev.* **103**, 137-139 (2001).
70. Lossi,L. & Merighi,A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* **69**, 287-312 (2003).
71. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
72. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
73. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
74. Means,A.L. & Gudas,L.J. The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 201-233 (1995).
75. Denson,L.A. *et al.* Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J Biol. Chem.* **275**, 8835-8843 (2000).
76. Wei,Y., Harris,T. & Childs,G. Global gene expression patterns during neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Differentiation* **70**, 204-219 (2002).
77. Horton,J.D. *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12027-12032 (2003).
78. Dubuc,G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).

79. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. & Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-398 (2000).
80. Schuppin, G.T. & Rhodes, C.J. Specific co-ordinated regulation of PC3 and PC2 gene expression with that of preproinsulin in insulin-producing beta TC3 cells. *Biochem. J* **313** (Pt 1), 259-268 (1996).
81. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
82. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
83. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
84. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
85. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
86. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
87. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
88. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
89. Schier, A.F. *et al.* Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-178 (1996).
90. Korzh, S., Emelyanov, A. & Korzh, V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech. Dev.* **103**, 137-139 (2001).
91. Wallace, K.N. & Pack, M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev. Biol.* **255**, 12-29 (2003).
92. Cohen, J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**, 161-165 (2005).

93. Kotowski,I.K. *et al.* A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410-422 (2006).
94. Furutani-Seiki,M. *et al.* Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 229-239 (1996).
95. Lossi,L. & Merighi,A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* **69**, 287-312 (2003).
96. Furutani-Seiki,M. *et al.* Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 229-239 (1996).
97. Abifadel,M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
98. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
99. Attie,A.D. & Seidah,N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
100. Timms,K.M. *et al.* A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum. Genet.* **114**, 349-353 (2004).
101. Rashid,S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
102. Maxwell,K.N. & Breslow,J.L. Adenoviral-mediated expression of *Pcsk9* in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
103. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
104. Park,S.W., Moon,Y.A. & Horton,J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
105. Rashid,S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
106. Ishibashi,S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest* **92**, 883-893 (1993).
107. Muto,E. *et al.* Identification and characterization of *Vepf*, a novel gene encoding a PH domain-containing protein expressed in the developing central nervous system of vertebrates. *Biochimie* **86**, 523-531 (2004).

108. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
109. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).

Table 1

Primers for QPCR

Assessed mRNA	Forward Primer	Reverse Primer
hS14 (NM_001025071)	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC
hPCSK9 (NM_174936)	ATCCACGCTTCCTGCTGC	CACGGTCACCTGCTCCTG
mS16 (NM_013647)	AGGAGCGATTGCTGGTGTGG	GCTACCAGGGCCTTTGAGATG
mPCSK9 (NM_153565)	TGCAAAATCAAGGAGCATGGG	CAGGGAGCACATTGCATCC
mPCSK5/6AB (XM_129214)	ACTCTTCAGAGGGTGGCTA	GCTGGAACAGTCTTGAATC
mPCSK2 (NM_008792)	TGACAAGTGGCCTTTCAT	ATCAGGGTCCATTCCCTC
mSKI-1 (NM_019709)	GCCCTCAAGTGAGACCTTG	GTCCCACCTCTGGTTGTAG
mFurin (NM_011046)	CATGACTACTCTGCTGATGG	GAACGAGAGTGAACCTGGTC
mLdlr (NM_010700)	GTATGAGGTTCTGTCCATC	CCTCTGTGGTCTTCTGGTAG
mHMGR (NM_008255)	TCAGAAGTACATGGTTCAC	TTGCATGTTAGTCTTGAGA
mSREBP-2 (NM_033218)	GTTCTGGAGACCATGGAG	AAACAAATCAGGGAACCTC

Fig.1

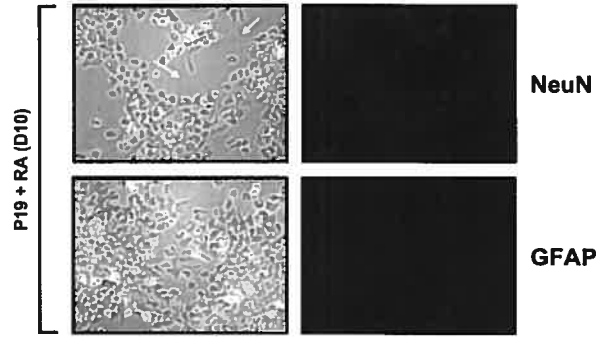


Fig.2

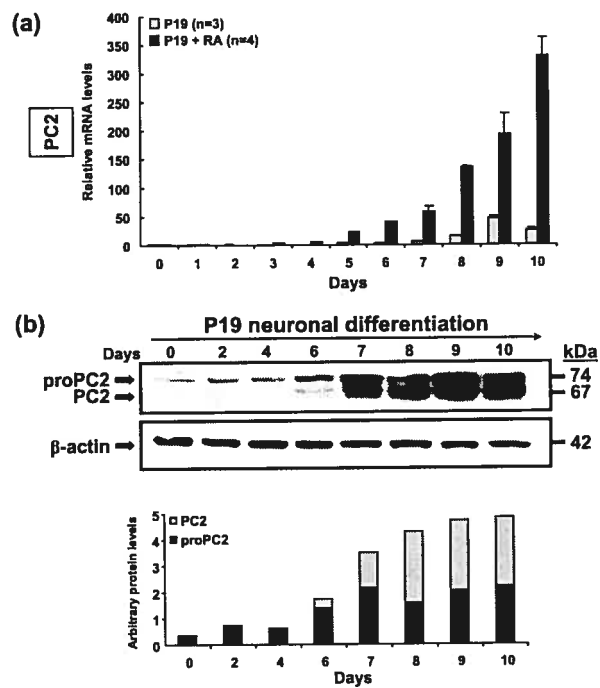


Fig.3

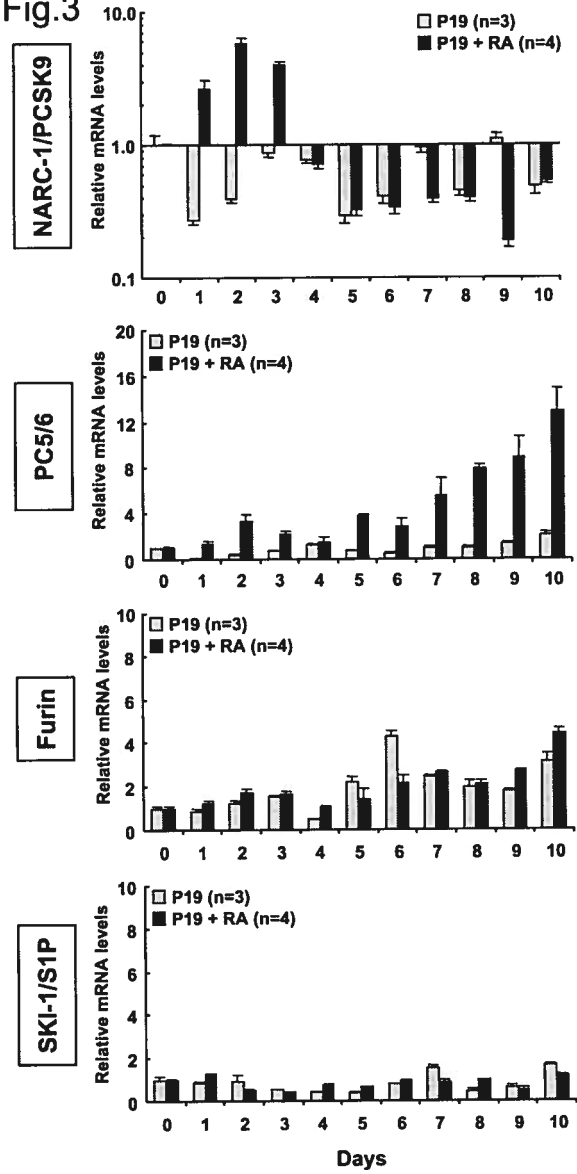


Fig.4

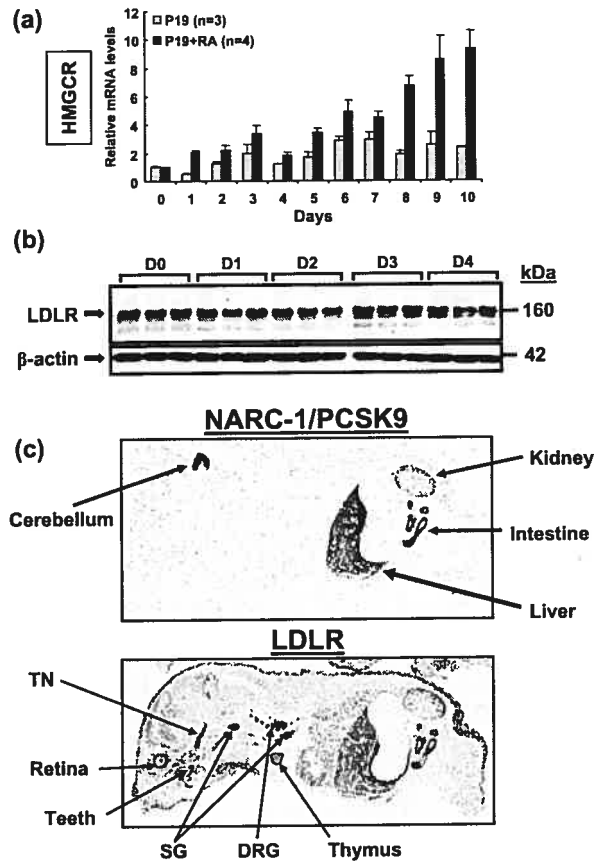


Fig.5

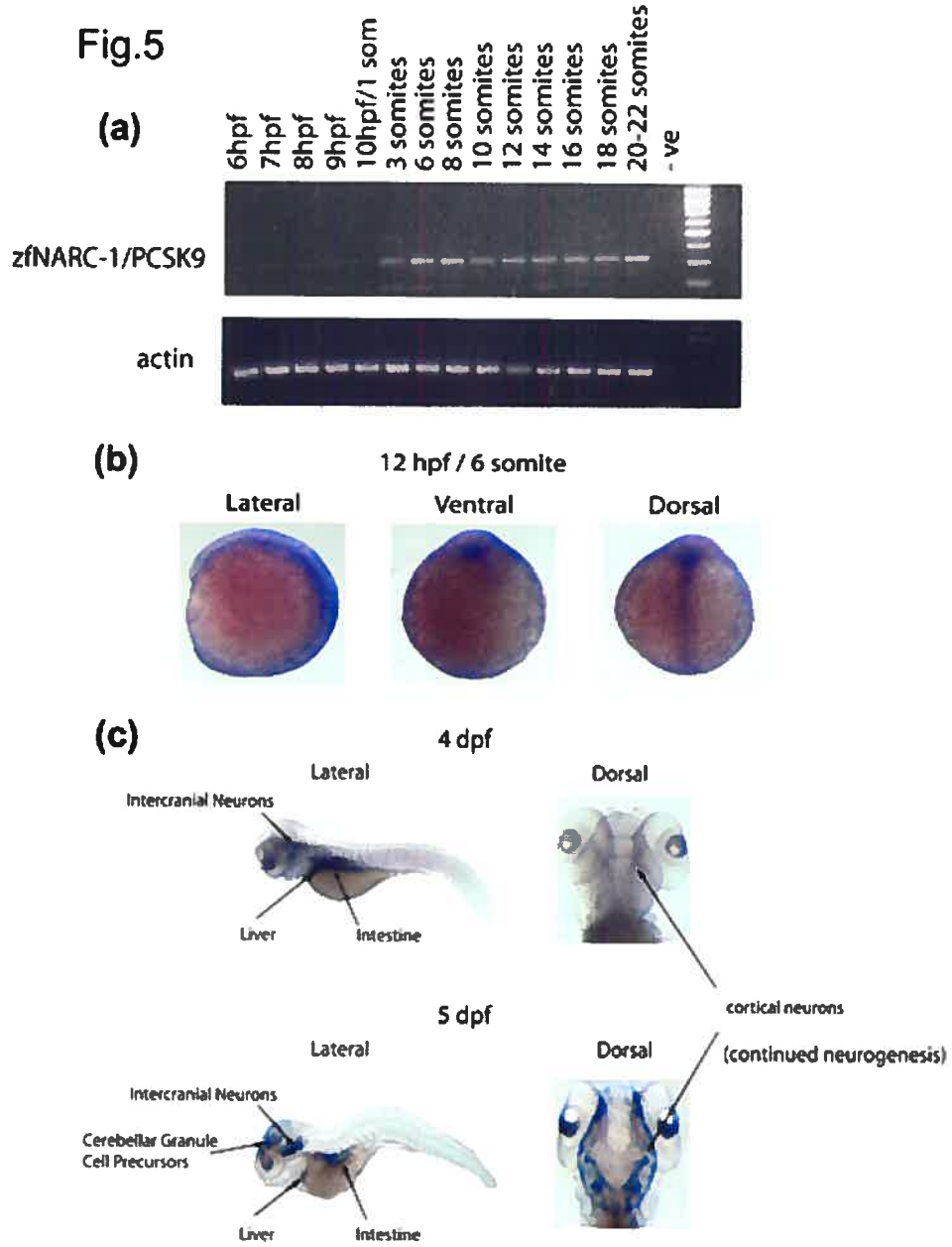


Fig.6

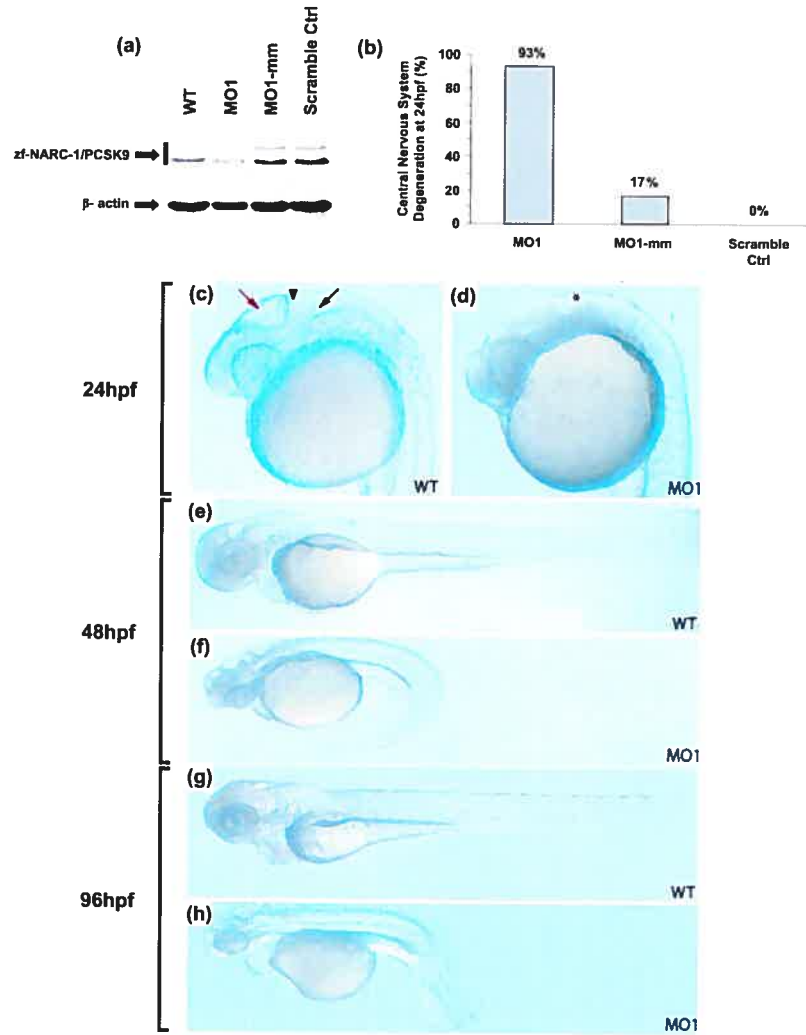


Fig.S1

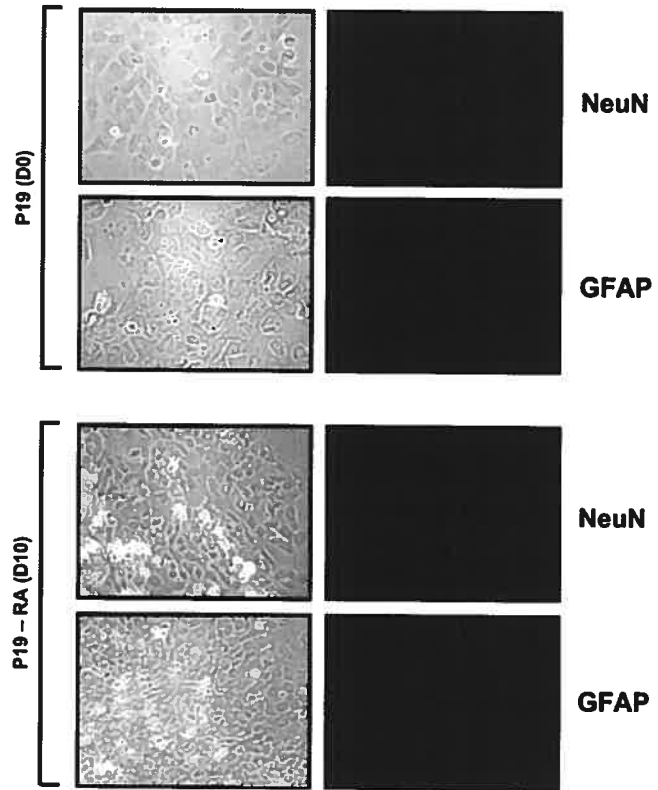


Fig.S2

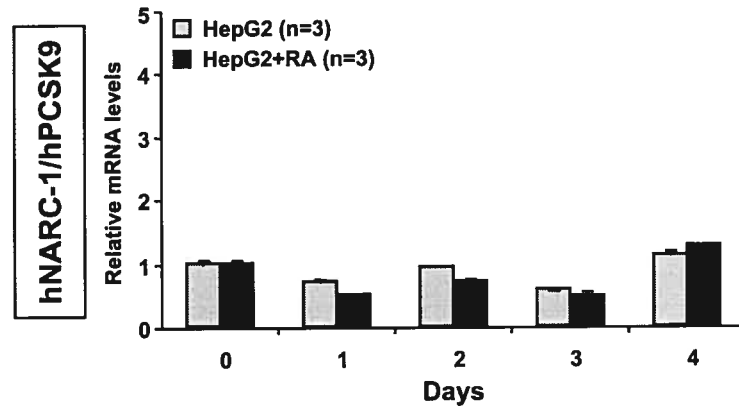


Fig. S3

1 TAATTGTAGTAAATCTCGTTTACTACAATTAGCTTCACTGTATTTATTGACATATTTGACAAATATTTAACTAACAGTTATTTCAT 90
91 GTTACAGGTTTTATTTCAGCAAATGTTTCAAGCCTGTGCATGAAATCTAAGCGTATAATATGTGTGGTGGACTGTAATCTGACTCCA 180
181 CTTCTGCTGTTATTTATACCGAGGCATCGTTCGATACACGGGCAGTGAACGTCATTAGCTCGCCCCACCTTCTTTAGTCAGTCTGAG 270
271 AGTCACGTTAATGATAAATCTCCAAATCTCTTTATCATATATGTTCTGCCTCAGTGTACGACCAACAGCAACAGAGAGAAAAATAC 360
1 M R S V V S V C C L G F L L G L L A V V E 21
361 ACTTACTTTGAGTTGAAAGCACAGAGTatgagaagcgtcctgtcggtg gctgcttgggtttctgttgggtctctcgctgtgtggaa 450
22 C D E D Y I E D E D E M I L S L I L Q D D T Q P E A E N R P 51
451 tgtgatgaagattatattgaggatgaagatgagatgactcgtcttattttgaggatgacactcagcctgaagcagagaacaggcca 540
52 S A Q F Y R C T K D A W R M P G Q Y L V V M R M G T H V N Q 81
541 tcggcgcagttttacaggtgcaccaaggacgcgtggcgaatgccgggtcagttattagttgtgatgcggaacgggacgcactgaaccag 630
82 V E R T T R R L S A K A A K R G Y L I E I L Q T Y S G A F R 111
631 gtggagcgcaccacgcgcagactcagcgcaaaagccgcaaacgcggatacctgattgagatattgcagacttactctggagccttccgt 720
112 G F L V K M S S D V L H M A V K L P H V E Y I E E D S S I F 141
721 ggtttctgggtaaaatgagcagcaggttcttccacatggcagtaaaagttgcccctggaatacattgaagaggattcctcaatcttt 810
142 A Q S I F M N L Q R V L Q N X H E A G K Y S P P N D G A K V 171
811 gcccaagcatcccatggaacctgcagcgggtccttcaaaataaacatgaggctggaaaatactctccaccaatgacggagctaaagt 900
172 G V Y L L D T S V Q L T H R E V E D R V M V T D F N R V P E 201
901 ggagtgatctcgtggacacgagcgttcagttgacccaccgtgaggtcgaggacaggggtgatggtagccgactcaacagatgacctgag 990
202 E D G V R V H R Q A S Q C D S H G T H I A G V I S G R D S G 231
991 gaggacggggtcagagttcacagggcaggcagtcagttgacagctatggcacacacattgcaggggtgatcagtggaagcgggactcgggt 1080
232 V A R G A S V N S V R V L N C Q G K G T V S G A L A G L E Y 261
1081 gtgctcgaggtgccagttgtaaacagcgtccagtggtgaaactgccagggcaaggggtactgtgtctggagcttggcaggtctggaat 1170
262 I Q S S L A S Q P V S P V I L L L P P F V G G F S R T L N T A 291
1171 atccagtcactctcgtcctcagcctcgtcagtcctgttattcctgctgctgccattttaggggggtctcagtcgaccctaaacaccgcc 1260
292 C R K I V E S G A V L I A A A G M Y N D D A C L Y S P A S E 321
1261 tggcggaaaatgttgagctcgggtcagtgcttattgctgcagcgggaaaactataacgatgatcgtgctctgattcacctcctcagag 1350
322 P E V I T V G A V N F A D Q P L N R G T T G T N V G R C V D 351
1351 ccagagtgatcacagtagtgctgtaattttgcccagaccactgaaccctgggacgacggaaactaacgtgggcccgtggtggat 1440
352 V F A P G D D I I S A S S D C P T C F T T K S G T Q A A A 381
1441 gtgttcgaccaggtgatgacatcattagcgcacccagtgactgccccacctgcttaccaccaagagtgaggacatcgaggcagccgag 1530
382 H V A G V A A V L L N L R P M S S S A E V L Q Q L R Y H S V 411
1531 caegtgtcgtgtagcagcagttcttctgaacctgaggccaaactccagctctgctgaggttcttcagcagctccgctatcattcagtc 1620
412 K Q V I N P B S L P V M H R L T T P N M V V A L P D P T S T 441
1621 aaacaggtcattaaccagagctctcaccagtgatgcaccgtctcact.acaccacaatgggtgggtcctgctgacccaacatccaca 1710
442 L T G E D L L C R S V W S E R S A S P V P S T A V S R C R S 471
1711 etcacagagagatcgtcttggtaggtcagtcctggtctgaaagatcagcttctccagtttctccactgctgttctcgtgctcgtcc 1800
472 T E E H L S C S S F F S D N G M R A G E R V E E R D G Q K E C 501
1801 actgaagagatgctgagctcctcagtttctctgataatggcatgagagctggagaagagtgaggagagagatgggagagaagaggtg 1890
502 V A V N V N G G F V F A V A R C C T G H R A Q C Q M L E G 531
1891 gtggctgtaaatgtgaacggaggccaggaggtgttgcagtcgctcgtggttacagggcatagagctcagtgctcagatgttggaggt 1980
532 P E R G A G A E C P P E H H L T G C S F S S S S G E A S D S 561
1981 ccagagagaggagcaggtgctgtaatgccaccagagcaccatctgacaggtcgagctttctcctcactcggagaagcagcagactct 2070
562 D R T L H G S R R R T C A A K K G M M S Y A F C H T S T L E 591
2071 gatcagctctgcatggtgaccgaggaacatgctgctgctaaaaagggatgatgtcatatgccttctgctgcccacgctccactctggag 2160
592 C R L K E H H L N T L S Q Q V E V S C E D S W T L T A C E A 621
2161 tgcagactgaaagaaccacactcaatctcagccaacaggtggaggttctcgtgtaggactcatggacactgacggcagctgtagggt 2250
622 L S R D A V I H G A F A M G N T C V V R T S G V D K D A A A 651
2251 ctgctcagagatcagctcattcacggggcgttggcaatgggaaacacctgtgtagtctgacatctggagtagatgaaggacgctgcccgc 2340
652 I A T C C R N H P L H G T Q D H * 667
2341 atcgcaacctgctgcagaaccactcctttacatgggacacaggtacactgaAGATCTCCATTAGGCCTTAAGTAGATGTTTCTTTCTTT 2430
2431 TCTAAACAGTAACTCAAGACTTGATACTGAAACGTGGGATACTGGAGAGCTCAGCTCTGCCACTATAGAAATGTTTATACTGAATATA 2520
2521 CCATAACTGATCGGACATTACATAGAAGTGAAAAA

Chapitre III : Discussion

Actuellement, la littérature scientifique dénombre plusieurs articles sur la convertase de proprotéines NARC-1/PCSK9 en relation avec son action sur le métabolisme du cholestérol via la dégradation du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR).^{110,111} Des souris déficientes pour le gène codant pour NARC-1/PCSK9 présentent une hausse des niveaux de LDLR à la surface des hépatocytes ce qui, par conséquent, augmente la capture des particules LDL-C réduisant les taux de cholestérol sanguin.¹¹² En prime, lorsque ces souris furent traités aux statines (inhibiteur de la synthèse de *novo* cholestérol), ils ont remarqué une diminution davantage marquée des niveaux de cholestérol sanguin d'où l'importance de développer un inhibiteur pour cette convertase qui pourrait être utilisé en thérapie combinatoire de concert avec les statines.¹¹² Au niveau transcriptionnel, NARC-1/PCSK9 est régulée par SREBP-2 dans le foie des souris, les hépatocytes primaires humains et la lignée cellulaire humaine HepG2.¹¹³ Chose intéressante, la distribution tissulaire de NARC-1/PCSK9 révèle qu'elle est fortement exprimée dans les tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol (foie et l'intestin) mais expose un profil d'expression très particulier dans des régions où figure de forte activité neurogénique notamment dans le bulbe olfactif, dans le cervelet et transitoirement dans le télencéphale au cours du développement embryonnaire.¹¹⁴ Jusqu'à présent, la fonction de NARC-1/PCSK9 est plutôt restrictive à son implication dans le métabolisme du cholestérol.

Dans cette étude, nous avons utilisé les cellules de carcinome embryonnaire P19 pour définir le rôle de la convertase de proprotéines NARC-1/PCSK9 au cours de la différenciation neuroectodermale.¹¹⁵ Tout d'abord, bien que le modèle cellulaire des P19

soit fort connu, nous avons quand même voulu valider l'efficacité de la différenciation à l'aide marqueurs neuronaux. Suite à l'induction des cellules P19 par l'acide rétinoïque, on remarque une morphologie propre au phénotype neuronal au alentour du jour 7 post-traitement. On dénote la présence de prolongements neuronaux illustrée par des flèches blanches. (Fig.1, p.85) Nous avons donc voulu caractériser, par immunofluorescence, le rendement de la différenciation neuronale à l'aide de différents marqueurs soit : NeuN (cellules neuronales) et GFAP (cellules gliales). Comme présenté à la Figure 1 (p.85) du manuscrit, on remarque que le rendement est d'environ 95% neuronales (NeuN) et 5% gliales (GFAP). À titre de comparaison, nous avons aussi marqué les cellules naïves (P19 jour0) et les cellules non-traitées à l'acide rétinoïque qui furent cultivées pour une période de 10 jours (P19 -RA jour10; Fig. S1, p.91) Pour ces deux protocoles, on dénombre très peu de cellules neuronales et gliales ce qui suggère, que le traitement à l'acide rétinoïque favorise la différenciation des P19 en cellules neuronales et que le modèle utilisé est donc valable pour étudier l'implication de NARC-1/PCSK9 au cours de la différenciation neuroectodermale. Ensuite, nous avons aussi voulu confirmer le rendement observé pour la différenciation neuronale en utilisant la convertase de proprotéines PC2 comme marqueur. En effet, cette convertase est exprimée dans les cellules endocrines et tout particulièrement dans le système nerveux central (SNC) d'où son utilisation comme marqueur de la présence de neurones matures.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Dans cette étude, l'utilisation de PC2 comme marqueur s'avère pertinente puisque suite au traitement à l'AR, les neurones forment des structures sécrétoires distincts nécessaires à la maturation des prohormones. Comme illustré à la Figure 2a (p.86), on remarque une augmentation de ~350 fois de l'ARNm (PCR en temps réel) de PC2 dans les cellules traitées à l'AR comparativement aux cellules contrôles où on dénote une hausse de seulement ~30 fois. (Fig.2a, p.86) Cette faible augmentation peut être expliquée par

le fait que lorsque les cellules non traitées subissent le même protocole d'agrégation, environ 10% des cellules se différencient en neurones. (Fig.1, p.85) Ensuite, nous avons vérifié, par immunobuvardage, les niveaux protéiques de la convertase PC2. Comme illustré à la Fig.2b (p.86), les niveaux de proPC2, PC2 ainsi que le rapport PC2/proPC2 augmentent considérablement dans les jours concordant avec le phénotype différencié. Puisque l'expression de PC2 (messager et protéine) coïncide avec le protocole de différenciation neuronale des cellules P19 (marqueur neuronaux), ceci suggère que PC2 reflète bien la qualité de la différenciation et que l'utilisation du PCR en temps réel est un bon outil d'analyse pour qualifier l'efficacité de la différenciation neuronale des P19.

À titre de comparaison, nous avons aussi analysé les profils d'expression, par PCR en temps réel, des autres convertases dont la Furine, SKI-1/S1P, PC5/6 et tout particulièrement NARC-1/PCSK9. (Fig.3, p.87) Les profils d'expression de la Furine et de SKI-1/S1P ne démontre pas de différence significative au niveau de leurs messagers, ce qui est en accord avec leurs distributions tissulaires ubiquitaires et leurs rôles physiologiques définis comme enzymes de ménage.¹¹⁹ Par contre, pour ce qui est de la convertase PC5/6, on remarque que le niveau d'expression augmente dans le phénotype neuronal allant culminant à ~15 fois. En effet, PC5/6 fut caractérisée comme étant présente dans diverses régions du cerveau où il fut démontré que cette enzyme catalyse la coupure de nombreuses prohormones dont la pro-neurotensine/neuromedine N.^{120,121} De plus, il fut démontré que PC5/6 coupe la protéine transmembranaire *neural adhesion molecule L1* qui joue un rôle fonctionnel très important dans le développement du système nerveux central.¹²² Nous avons donc voulu vérifier la présence de la protéine *L1* dans les cellules P19 et vérifier si l'augmentation des niveaux de PC5/6 dans les neurones coïncide avec une augmentation de la coupure de cette protéine. Effectivement, on observe une

augmentation de la protéine *L1* dans les neurones aux jours 7 à 10 (Fig.9, Annexe I) ainsi que la formation de la forme de 140 kDa qui résulte d'une coupure possible par PC5/6. Nous avons tenté de vérifier les niveaux protéiques de PC5/6 dans les P19 mais les résultats ne semblaient pas convainquant possiblement dû à la sensibilité des anticorps disponibles. Par contre, puisque la coupure de la protéine *L1* dans le phénotype neuronale semble être favorisée et qu'il fut démontré que PC5/6 catalyse cette réaction, ceci suggère que cette convertase est impliquée dans l'activation de précurseurs dans le phénotype différencié. Pour ce qui est de la convertase NARC-1/PCSK9, on observe un profil d'expression distinct comparativement aux autres convertases. (Fig.3, p.87) Lorsque les cellules sont induites à se différencier par l'AR, on remarque une forte augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour NARC-1/PCSK9 culminant au jour 2 (~7X) suivi d'une régression allant du jour 3 à 10. Cette répression est aussi observée dans les cellules non traitées suggérant qu'elle est sans doute engendrée par les conditions de culture dans ces deux protocoles. La surexpression transitoire de NARC-1/PCSK9 dans les cellules P19, qui survient au début de la différenciation neuronale, est très voisine de celle observé lors du développement embryonnaire dans le télencéphale au jour e12 chez la souris.¹¹⁴ On remarque aussi qu'au jour 2 de différenciation des P19, la convertase PC5/6 est aussi exprimée transitoirement ce qui rappelle la coexpression observée pour PC5/6 et NARC-1/PCSK9 lors d'hépatectomie partielle chez la souris.¹¹⁴ Puisque ces convertases ne possèdent pas les mêmes spécificités de coupure, il est donc possible qu'elles agissent de concert dans l'activation de précurseurs impliqués dans le développement du SNC.

Comme NARC-1/PCSK9 et PC5/6 sont des convertases hautement régulées et qui semblent être impliquées dans de nombreux processus de croissance cellulaire et d'apoptose, nous avons regardé si la régulation de ces gènes pouvait être sous le contrôle

de Notch. Lorsque coupée par la γ -sécrétase, cette protéine transmembranaire libère un fragment nommée NICD (*notch intracellular domain*) qui est transloqué au noyau et active la transcription de gènes cibles dont Hes1, Hes3 et Hes5 impliqués dans la balance entre la prolifération et la différenciation cellulaire et ce dans de nombreuses conditions physiologiques.¹²³⁻¹²⁵ Pour ce faire, nous avons transfecté seulement le fragment NICD dans les cellules P19 et vérifié si la transcription des gènes NARC-1/PCSK9 et PC5/6 pouvait être affecté par la cascade Notch. Pour s'assurer de la validité du NICD, nous avons observé la transcription de gène cible pour dont Hes5. En effet, lorsque transfecté dans les cellules P19, le fragment NICD augmente l'expression de Hes5 sans pour autant affecter les niveaux d'ARNm des gènes NARC-1/PCSK9 et PC5/6 ce qui suggère que Notch n'est pas, dans ces conditions, le régulateur de ces convertases. (Fig.10, annexe 2 p. II) Chose intéressante, il fut observé que l'expression du messenger Notch, dans les P19, est plutôt restrictive aux jours avancés de différenciation et que sa surexpression diminue la différenciation des P19 en neurones sans affecter la formation d'oligodendrocytes.¹²⁶ D'après ces observations, nous concluons que les convertases NARC-1/PCSK9 et PC5/6 ne sont pas directement régulées par Notch, ce qui n'empêche pas le fait que l'ajout de l'acide rétinoïque pourrait permettre leurs activations et ce de manière indirecte.

Dans le but de vérifier si l'augmentation de NARC-1/PCSK9 dans les cellules P19 est directement liée à l'addition d'acide *all-trans* rétinoïque, nous avons traité des cellules hépatocytaires HepG2, qui possède la machinerie nécessaire (RAR/RXR) pour répondre à l'AR.¹²⁷ Pour ce faire, nous avons traitées les HepG2 avec de l'AR à une concentration de 500 nM et ce pour une durée de 4 jours. En comparaison avec les cellules non traitées, on n'observe aucune modulation de l'ARNm de NARC-1/PCSK9 dans les HepG2 suite au

traitement à l'AR. (Fig.S2, p.92) Ce qui suggère que dans les cellules P19, l'AR n'active pas directement la transcription de NARC-1/PCSK9 n'excluant pas le fait que sa régulation par l'AR peut se faire indirectement ou qu'un facteur est manquant dans les cellules HepG2.

Puisque le seul mécanisme transcriptionnel connu pour réguler les niveaux de NARC-1/PCSK9 est par l'intermédiaire du facteur de transcription SREBP-2 comme démontré dans les cellules HepG2, les hépatocytes primaires humains et murins¹¹³ Nous avons voulu d'abord regarder si la transcription de SREBP-2 pouvait être modulée par l'addition d'acide rétinoïque. Nous n'avons observé aucune différence significative dans le taux d'ARNm codant pour SREBP-2 au cours de la différenciation neuronale des P19. Il est à noter que SREBP-2 est une protéine résidante du RE et qui, lorsque la cellule est dépourvue de cholestérol, est dirigée vers le golgi pour être coupée par la cascade enzymatique SKI-1/S1P et S2P. Le fragment résultant suite à la coupure à l'intérieur même de la membrane par S2P, est transloqué au noyau activant ainsi toute une famille de gènes cholestérogéniques dont le HMG-CoA réductase qui est l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol.¹²⁸ La littérature scientifique ne présente aucune documentation quant au métabolisme du cholestérol et la différenciation neuronale des P19. Dès lors, nous avons donc mesuré l'activité SREBP-2 au cours de la neurogenèse des cellules P19 par l'intermédiaire du gène cible connu soit l'HMG-CoA réductase. (Fig.4a, p.88) Au cours de la différenciation des cellules P19, on remarque que l'activité du facteur de transcription cholestérogénique SREBP-2 (expression de l'HMG-CoA réductase) est plutôt abondante dans le phénotype neuronal (jours 5 à 10). On remarque que le patron d'expression de l'HMG-CoA réductase est plutôt distinct en comparaison avec celui de la convertase NARC-1/PCSK9 pour qui on observe une expression transitoire dans les premiers jours de

différenciation suggérant que dans les cellules P19, la régulation de NARC-1/PCSK9 post-traitement à l'AR ne suit pas un patron SREBP-2 dépendant. Par conséquent, lors de la neurogenèse, l'expression transitoire de NARC-1/PCSK9 implique possiblement un autre mécanisme de régulation transcriptionnelle différent de celui connu dans un contexte autre tel dans les cellules hépatocytaires.

Mise à part la régulation de NARC-1/PCSK9 par SREBP-2, la seule fonction connue pour cette enzyme est l'augmentation de la dégradation post-traductionnelle du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR).^{110,111} Tout d'abord, nous avons observé, par PCR en temps réel, que les niveaux de messagers codant pour le LDLR ne semblent pas être augmentés au cours de la différenciation neuronale des P19 ainsi que dans les cellules non-traitées. (Fig.11, Annexe 3 p.III) Puisque l'action de NARC-1/PCSK9 est d'accroître la dégradation post-traductionnelle du LDLR, nous avons regardé si l'expression de cette convertase dans les premiers jours de différenciation neuronale (Fig.3, p.87) pouvait moduler les niveaux du LDLR. Fait intéressant, cette augmentation n'affecte pas le niveau du LDLR et ce du jour 0 au jour 4 (voir Fig.4b, p.88). Ces résultats suggèrent fortement que NARC-1/PCSK9 possède un rôle distinct au cours de la neurogenèse et ce indépendamment de son rôle connu sur la dégradation du LDLR et de sa régulation par le facteur SREBP-2. De plus, nous avons étudié, par hybridation *in situ* chez une souris post-natal 1 jour (P1), l'expression de NARC-1/PCSK9 et avons observé que cette convertase est exprimée dans les organes impliqués dans le métabolisme du cholestérol soit le foie et l'intestin ce qui est aussi représenté par une coupe voisine illustrant l'expression du LDLR. Par contre, on remarque un marquage très intense pour NARC-1/PCSK9 dans le cervelet où on retrouve un faible signal pour le LDLR (voir Fig.4c, p.88).

Par la suite, nous avons entrepris d'utiliser la technique d'interférence à l'ARN (siRNA) pour étudier l'impact de la diminution de l'ARNm de NARC-1/PCSK9 sur la différenciation neuronale. L'idée première était de réduire l'importance du pic d'expression transitoire présent dans les premiers jours de différenciation. Tout d'abord, nous avons optimisé l'efficacité d'oligotransfection de siRNA à l'aide d'oligos contrôles couplés à des molécules fluorescentes. Ensuite, nous avons sélectionné les conditions idéales pour transfecter cette fois-ci les P19 avec des oligos ciblant l'ARNm de NARC-1/PCSK9. Bien que l'atténuation au jour 0 ne fût que d'environ 60% sur les niveaux de l'ARNm de NARC-1/PCSK9, il semble que la durée de vie des siRNA utilisés n'était pas assez efficace pour contrer l'augmentation rencontrée au jour 2 lors de la différenciation neuronale. (Fig.12, annexe 4 p.IV) Puisque la réduction du messenger codant pour NARC-1/PCSK9 ne semblait pas suffisante pour poursuivre nos analyses, nous avons plutôt opté pour une collaboration avec l'équipe du Dr.Bennett qui utilise le poisson zèbre comme modèle animal où il est possible d'atténuer l'expression de NARC-1/PCSK9 de manière beaucoup plus efficace.

Tout d'abord, nous avons analysé, par RT-PCR, l'expression de zf-NARC-1/PCSK9 et remarqué qu'elle est exprimée à partir du stade de 3 somites où on remarque un début d'activité neurogénique (Fig.5a, p.89). Par hybridation *in situ*, nous avons observé une expression ubiquitaire fortement marquée pour zf-NARC-1/PCSK9 12h post fertilisation (hpf) et plus restrictivement dans la notocorde présomptive. (Fig.5b, p.89) De plus, au jour 4-5 dpf on dénote un patron d'expression de zf-NARC-1/PCSK9 très voisin de celui observé chez la souris.¹¹⁴ En effet, zf-NARC-1/PCSK9 est fortement exprimée dans le foie et l'intestin du poisson zèbre. Par contre, comme chez la souris, zf-NARC-1/PCSK9 est

retrouvée aussi dans des centres neurogénique notamment dans les neurones corticaux et les cellules granuleuses précurseurs du cervelet. (Fig.5c, p.89) Ce qui suggère que NARC-1/PCSK9 est exprimée dans des centres neurogéniques chez le poisson zèbre tout comme chez les mammifères.

Ensuite, nous avons utilisé l'approche d'interférence à l'ARNm à l'aide d'un morpholino oligonucléotide (MO) qui inhibe la traduction de l'ARNm d'un gène cible. Lorsque le MO dirigé contre zf-NARC-1/PCSK9 fut injecté dans les œufs de poissons zèbre, ceci résulta en une dégénérescence du système nerveux central. À 24 hpf, seulement une légère fissure est visible et représente le rhombencéphale (*hindbrain*). De plus, une activité anormale de neurogenèse fut observée au alentour de 48 hpf. Par conséquent, ceci a conduit à une létalité embryonnaire entre 48-96 hpf chez le poisson zèbre. (Fig.6, p.90) Nous avons aussi vérifié les niveaux endogènes de zf-NARC-1/PCSK9 suite à l'injection de MO et avons remarqué une réduction d'environ 60% comparativement aux MO contrôles. Basé sur les patrons d'expression de NARC-1/PCSK9 au cours du développement de la souris, il fut attendu que l'ablation de ce gène chez le poisson zèbre ait un effet sur l'organogenèse soit neurale et/ou hépatique/intestinale/rénale.¹¹⁴ Chez le poisson zèbre, il est à noter que la neurogenèse débute au alentour de 10 hpf tandis que l'hépatogenèse s'effectue plutôt aux environs de 34 hpf. Cependant, les défauts observés furent détectés à 24 hpf chez les poissons zèbres injectés avec des MO. Par contre, il demeure difficile de conclure sur l'organogenèse hépatique. L'utilisation de marqueur spécifique pourrait illustrer l'importance de zf-NARC-1/PCSK9 dans différents tissus au cours du développement.

Le modèle d'ablation génique (KO) pour NARC-1/PCSK9 a démontré que les souris ont une diminution importante de leurs taux de cholestérol, bien qu'il ne semble pas présentées aucune anomalie au niveau du système nerveux. En regardant de plus près la stratégie employée, nous avons remarqué qu'ils avaient retiré qu'une partie de l'exon 2 à 4 ce qui pourrait résulter en une forme tronquée de l'enzyme. Bien que le peptide signal soit conservé, il se peut qu'un épissage alternatif tissu spécifique se produise générant par conséquent, seulement le domaine C-terminal de NARC-1/PCSK9 riche en His/Cys qui pourrait avoir une fonction propre autre que l'activité enzymatique puisque le domaine catalytique est retiré. Nous avons aussi tenté de surexprimer la convertase NARC-1/PCSK9 (wt) dans les cellules P19 pour vérifier son pouvoir neurogénique. À titre de contrôle, nous avons utilisé le mutant H226A où l'histidine du site actif fut mutée. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'une augmentation des niveaux de NARC-1/PCSK9, dans des cellules non-traitées à l'AR, augmente la formation de neurones. En effet, on détecte une légère augmentation du marqueur neuronal proPC2 et la forme mature PC2 ainsi que le neurofilament M dans les cellules surexprimant NARC-1/PCSK9. (Fig.13, annexe 5 p.V) Il serait donc intéressant de comparer l'effet de la surexpression du domaine C-terminal seul sans le domaine catalytique comparativement avec la forme complète de NARC-1/PCSK9 sur la différenciation neuronale des P19. Il est possible que le C-terminal à lui seul puisse moduler la neurogenèse des P19.

Un aspect qui fut malheureusement mis de côté dans cette étude est la relation entre NARC-1/PCSK9 et l'apoptose. Il est à remarquer que cette protéine fut clonée à partir de culture primaire de neurones qui furent induites en apoptose.¹¹⁴ Chose intéressante, dans des cellules CHO (*chinese hamster ovary*), une étude a démontrée que lorsque qu'elles furent induites en apoptose la forme active des SREBPs pouvait être

transloquée au noyau et ce indépendamment de la cascade SKI-1/S2P. En effet, cette coupure dans le cytosol est engendrée par la caspase-3, qui est une enzyme clé dans la cascade de la mort cellulaire programmée par apoptose. De plus, cette coupure ne fut pas réprimé par l'addition de stérois.¹²⁹ Il est à remarquer que la dégradation du LDLR par NARC-1/PCSK9 dans les CHO ne présente pas le même patron que dans les cellules hépatocytaires ce qui renforce l'hypothèse de la spécificité tissulaire de NARC-1/PCSK9.¹³⁰ Peut-être que NARC-1/PCSK9 est spécifiquement activé par SREBP-2 lors de l'apoptose et ce rôle pourrait bien être indépendant de la voie métabolique du cholestérol. Par contre, il important de mentionner que le protocole utilisé, lors de l'induction des cultures primaires neuronales en apoptose, fut celui de l'absence de sérum dans le milieu de culture. En effet, lorsque des cellules sont cultivées sans sérum, on observe notamment une induction de la mort cellulaire ainsi qu'une activation des SREBP puisque les cellules sont dépourvues du même coup de cholestérol. Alors, il est donc possible que l'induction de la transcription de NARC-1/PCSK9 dans les cultures primaires soit en fait qu'une conséquence d'une augmentation de l'activité de SREBP-2. Pour ce, il s'avère pertinent d'approfondir les connaissances quant à l'implication de NARC-1/PCSK9 dans l'apoptose d'autant plus que NARC-1 signifie *neural apoptosis-regulated convertase-1*.

Pour bien définir le rôle de NARC-1/PCSK9 au cours de la neurogenèse chez les mammifères, l'équipe de Wechsler-Reya *et coll*, propose une technique d'isolation de cellules souches neurales à partir du cervelet post-natal.¹³¹ Le cervelet constitué majoritairement des cellules granulaires, contient aussi des cellules souches pluripotentes neurales (NSCs) qui possèdent la capacité de se renouveler et de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et en neurones *in vitro*. Comme il fut démontré, NARC-

1/PCSK9 est fortement exprimée dans le cervelet (Fig.3c, p.87). Jusqu'à présent, nous ne connaissons pas la nature exacte des cellules positives pour cette convertase. La purification des différents types cellulaires à partir du cervelet à l'aide de marqueur pourrait nous dresser des pistes sur la compréhension du rôle de NARC-1/PCSK9 sur la neurogenèse. De plus, dans le cervelet, il existe un équilibre intense entre la prolifération, l'apoptose et la différenciation des neurones et ce modèle pourrait être utilisé pour de futures investigations quant aux rôle(s) de NARC-1/PCSK9 dans cet équilibre. De plus, il serait intéressant de supprimer le gène codant pour *Narc-1/Pcsk9*, spécifiquement dans le SNC, avec l'aide de souris *KO* conditionnelles qui sont maintenant disponible au laboratoire. Bien qu'aucun substrat(s) de NARC-1/PCSK9 ne fut découvert jusqu'à maintenant, l'utilisation des souris déficientes de concert avec une technique d'isolation des différentes populations cellulaires à partir du cervelet post-natal, pourrait permettre d'approfondir considérablement le rôle de cette convertase dans le SNC.

Lors du développement du SNC, où l'on retrouve une expression transitoire de NARC-1/PCSK9 dans le télencéphale ainsi que le cervelet, on remarque que cette période coïncide avec la mise en place des structures neuronales. D'une part, dans la différenciation neuronale et d'autre part dans la migration et le bon positionnement de ces neurones dans le cortex et le cervelet adulte. Cette migration, qui débute au alentour du jour embryonnaire e12, implique une protéine nommée Reelin. Lorsque ce gène fut muté dans des souris (phénotype *reeler*), plusieurs anomalies du SNC furent observées notamment dans le néocortex, l'hippocampe et le cervelet. Ces malformations sont principalement dues à une mauvaise migration des neurones dans les différentes régions du SNC dénoté par une forte désorganisation des couches du néocortex.¹³² Une autre étude a démontré que des souris où les gènes codants pour les récepteurs apoER2 et

VLDLR furent mutés (double *KO*), récapitulent le phénotype observé pour les souris *reeler*. Il fut donc proposé que ces récepteurs puissent être impliqués dans la migration des neurones en modulant l'action de la Reelin qui se lie à ces récepteurs. En effet, il fut démontré très clairement que la Reelin lie l'apoER2 et le VLDLR et que ceux-ci participent à la mise en place des structures neuronales et ce dans le néocortex, le cervelet ainsi que dans l'hippocampe.¹³³ L'apoER2 et le VLDLR sont des membres de la famille du LDLR qui possèdent le plus haut degré de similitudes au niveau de leurs structures ainsi que de leurs séquences en acides aminées avec le LDLR (voir Fig. 14, Annexe 6, p.VI). Puisque la convertase NARC-1/PCSK9 possède la capacité de dégrader le LDLR dans le foie, il est donc possible que cette convertase puisse aussi agir sur d'autres membres de la famille du LDLR dont l'apoER2 et le VLDLR. De plus, au cours du développement du SNC, ces récepteurs sont exprimés dans des régions similaires à NARC-1/PCSK9. Conséquemment, il serait pertinent d'étudier l'implication de cette convertase dans la dégradation des membres de la famille du LDLR, et d'autant plus, ceci pourrait expliquer son rôle dans le développement du SNC.

Conclusion

En somme, nous avons démontré que les cellules P19 s'avèrent être un bon modèle *in vitro* pour étudier le rôle de NARC-1/PCSK9 au cours de la différenciation neuronale. Les analyses transcriptionnelles ont démontrées que la furine ainsi que SKI-1/S1P ne varient pas pendant la neurogenèse tandis que pour PC2 et PC5/6, on observe une augmentation de leurs ARNm plutôt dans le phénotype différencié. Chose intéressante, le profil de NARC-1/PCSK9 culmine au début de la différenciation et décroît rapidement dans les neurones. Il fut aussi démontré que cette régulation est SREBP-2 indépendante et elle n'affecte pas la dégradation du LDLR contrairement à ce qui fut rapporté jusqu'à présent. De plus, une étude d'hybridation *in situ* a démontré que NARC-1/PCSK9 et le LDLR sont présent dans les tissus cholestérogéniques (intestin et foie) mais que l'on ne retrouve pas de signal pour le LDLR dans le cervelet. Ce qui confère davantage un rôle distinct neurogénique pour NARC-1/PCSK9.

D'autre part, chez le poisson zèbre, on remarque un profil d'expression très analogue à celui observé chez la souris notamment dans l'intestin, le foie et les cellules précurseur du cervelet. Par ailleurs, l'injection de morpholinos (atténuation génique) dirigés contre zf-NARC-1/PCSK9 a démontrée une dégénérescence du système nerveux central.

Bibliographie

1. Yanagita,M., Hoshino,H., Nakayama,K. & Takeuchi,T. Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines. *Endocrinology* **133**, 639-644 (1993).
2. Seidah,N.G. & Chretien,M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45-62 (1999).
3. Zhou,A., Webb,G., Zhu,X. & Steiner,D.F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748 (1999).
4. Seidah,N.G. *et al.* Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1321-1326 (1999).
5. Sakai,J. *et al.* Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* **2**, 505-514 (1998).
6. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
7. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
8. Seidah,N.G. & Prat,A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem.* **38**, 79-94 (2002).
9. Thomas,G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753-766 (2002).
10. Roebroek,A.J. *et al.* Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* **125**, 4863-4876 (1998).
11. Mbikay,M. *et al.* Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6842-6846 (1997).
12. Denis,F. *et al.* Alternative proteolytic processing of mouse mammary tumor virus superantigens. *J. Virol.* **74**, 3067-3073 (2000).
13. Benjannet,S. *et al.* Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and

transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879-10887 (2001).

14. Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D. & Seidah, N.G. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**, 68-72 (1997).
15. Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G. & Garten, W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12701-12705 (2001).
16. Khatib, A.M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. & Seidah, N.G. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy : novel targets in cancer therapy. *Am. J Pathol.* **160**, 1921-1935 (2002).
17. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
18. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
19. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
20. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
21. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
22. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
23. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
24. Timms, K.M. *et al.* A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum. Genet.* **114**, 349-353 (2004).
25. Allard, D. *et al.* Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **26**, 497 (2005).
26. Pisciotta, L. *et al.* Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* (2005).
27. Cohen, J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**, 161-165 (2005).

28. Kotowski, I.K. *et al.* A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410-422 (2006).
29. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
30. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
31. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
32. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
33. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
34. Horton, J.D. *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12027-12032 (2003).
35. Maxwell, K.N., Soccio, R.E., Duncan, E.M., Sehayek, E. & Breslow, J.L. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* **44**, 2109-2119 (2003).
36. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
37. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
38. Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site- 1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* **273**, 5785-5793 (1998).
39. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11041-11048 (1999).
40. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).

41. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
42. McBurney, M.W. P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 135-140 (1993).
43. Rudnicki, M.A., Reuhl, K.R. & McBurney, M.W. Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotent P19 embryonal carcinoma cells. *Development* **107**, 361-372 (1989).
44. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
45. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
46. Benjannet, S. *et al.* Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **294 (Pt 3)**, 735-743 (1993).
47. Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R. & Schachner, M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* **278**, 10381-10388 (2003).
48. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
49. Marcinkiewicz, M. *et al.* Nerve growth factor and proprotein convertases furin and PC7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in Schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells. *J. Comp. Neurol.* **403**, 471-485 (1999).
50. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
51. Westerfield, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene (2000).
52. Nasevicius, A. & Ekker, S.C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* **26**, 216-220 (2000).

53. Seidah,N.G. *et al.* cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* **9**, 789 (1990).
54. Scopsi,L., Gullo,M., Rilke,F., Martin,S. & Steiner,D.F. Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **80**, 294-301 (1995).
55. Jeannotte,R., Paquin,J., Petit-Turcotte,C. & Day,R. Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* **16**, 1175-1187 (1997).
56. Benjannet,S., Rondeau,N., Day,R., Chretien,M. & Seidah,N.G. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3564-3568 (1991).
57. Breslin,M.B. *et al.* Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *J. Biol. Chem.* **268**, 27084-27093 (1993).
58. Galanopoulou,A.S., Seidah,N.G. & Patel,Y.C. Heterologous processing of rat prosomatostatin to somatostatin-14 by PC2: requirement for secretory cell but not the secretion granule. *Biochem. J.* **311** (Pt 1), 111-118 (1995).
59. Berman,Y. *et al.* Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. *J. Neurochem.* **75**, 1763-1770 (2000).
60. Benjannet,S. *et al.* Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **294** (Pt 3), 735-743 (1993).
61. Laplante,I., Beliveau,R. & Paquin,J. RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *J Neurobiol.* **60**, 289-307 (2004).
62. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
63. Maxwell,K.N., Soccio,R.E., Duncan,E.M., Sehayek,E. & Breslow,J.L. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J. Lipid Res.* **44**, 2109-2119 (2003).
64. Horton,J.D., Goldstein,J.L. & Brown,M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin. Invest* **109**, 1125-1131 (2002).

65. Maxwell,K.N. & Breslow,J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
66. Benjannet,S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
67. Park,S.W., Moon,Y.A. & Horton,J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
68. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
69. Korzh,S., Emelyanov,A. & Korzh,V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech. Dev.* **103**, 137-139 (2001).
70. Lossi,L. & Merighi,A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* **69**, 287-312 (2003).
71. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
72. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
73. Seidah,N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
74. Means,A.L. & Gudas,L.J. The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 201-233 (1995).
75. Denson,L.A. *et al.* Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J Biol. Chem.* **275**, 8835-8843 (2000).
76. Wei,Y., Harris,T. & Childs,G. Global gene expression patterns during neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Differentiation* **70**, 204-219 (2002).
77. Horton,J.D. *et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12027-12032 (2003).

78. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
79. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. & Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-398 (2000).
80. Schuppin, G.T. & Rhodes, C.J. Specific co-ordinated regulation of PC3 and PC2 gene expression with that of preproinsulin in insulin-producing beta TC3 cells. *Biochem. J* **313** (Pt 1), 259-268 (1996).
81. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
82. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
83. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
84. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
85. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
86. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
87. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
88. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
89. Schier, A.F. *et al.* Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-178 (1996).
90. Korzh, S., Emelyanov, A. & Korzh, V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech. Dev.* **103**, 137-139 (2001).
91. Wallace, K.N. & Pack, M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev. Biol.* **255**, 12-29 (2003).

92. Cohen, J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**, 161-165 (2005).
93. Kotowski, I.K. *et al.* A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410-422 (2006).
94. Furutani-Seiki, M. *et al.* Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 229-239 (1996).
95. Lossi, L. & Merighi, A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* **69**, 287-312 (2003).
96. Furutani-Seiki, M. *et al.* Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 229-239 (1996).
97. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154-156 (2003).
98. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
99. Attie, A.D. & Seidah, N.G. Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* **1**, 290-292 (2005).
100. Timms, K.M. *et al.* A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum. Genet.* **114**, 349-353 (2004).
101. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
102. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of *Pcsk9* in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
103. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
104. Park, S.W., Moon, Y.A. & Horton, J.D. Post-transcriptional Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Protein by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9a in Mouse Liver. *J Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
105. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking *Pcsk9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
106. Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest* **92**, 883-893 (1993).

107. Muto, E. *et al.* Identification and characterization of Vepf, a novel gene encoding a PH domain-containing protein expressed in the developing central nervous system of vertebrates. *Biochimie* **86**, 523-531 (2004).
108. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
109. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and Its Natural Mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol. Chem.* **279**, 48865-48875 (2004).
110. Maxwell, K.N., Fisher, E.A. & Breslow, J.L. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 2069-2074 (2005).
111. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 7100-7105 (2004).
112. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5374-5379 (2005).
113. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454-1459 (2004).
114. Seidah, N.G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 928-933 (2003).
115. Bain, G., Ray, W.J., Yao, M. & Gottlieb, D.I. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays* **16**, 343-348 (1994).
116. Winsky-Sommerer, R. *et al.* Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *J. Comp Neurol.* **424**, 439-460 (2000).
117. Cullinan, W.E. *et al.* Neuroanatomical and functional studies of peptide precursor-processing enzymes. *Enzyme* **45**, 285-300 (1991).
118. Bolduc, D., Cadet, N., Sayasith, K. & Paquin, J. Proteolytic profile of recombinant pro-opiomelanocortin in embryonal carcinoma P19 cells: conversion to beta-lipotropin and secretion are inhibited following incubation with canavanine. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 237-246 (1997).
119. Seidah, N.G. *et al.* The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 57-74 (1999).

120. Villeneuve,P., Seidah,N.G. & Beaudet,A. Immunohistochemical distribution of the prohormone convertase PC5-A in rat brain. *Neuroscience* **92**, 641-654 (1999).
121. Barbero,P. *et al.* PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 25339-25346 (1998).
122. Kalus,I., Schnegelsberg,B., Seidah,N.G., Kleene,R. & Schachner,M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* **278**, 10381-10388 (2003).
123. Brunkan,A.L. & Goate,A.M. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J. Neurochem.* **93**, 769-792 (2005).
124. Gaiano,N. & Fishell,G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 471-490 (2002).
125. Kageyama,R., Ohtsuka,T., Hatakeyama,J. & Ohsawa,R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* **306**, 343-348 (2005).
126. Nye,J.S., Kopan,R. & Axel,R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**, 2421-2430 (1994).
127. Ashkar,S. *et al.* Retinoic acid induces corneal epithelial CYP4B1 gene expression and stimulates the synthesis of inflammatory 12-hydroxyeicosanoids. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **20**, 65-74 (2004).
128. Brown,M.S. & Goldstein,J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11041-11048 (1999).
129. Wang,X. *et al.* Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J.* **15**, 1012-1020 (1996).
130. Park,S.W., Moon,Y.A. & Horton,J.D. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 50630-50638 (2004).
131. Lee,A. *et al.* Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat. Neurosci.* **8**, 723-729 (2005).
132. Rice,D.S. & Curran,T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1005-1039 (2001).
133. Trommsdorff,M. *et al.* Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689-701 (1999).

Annexe 1

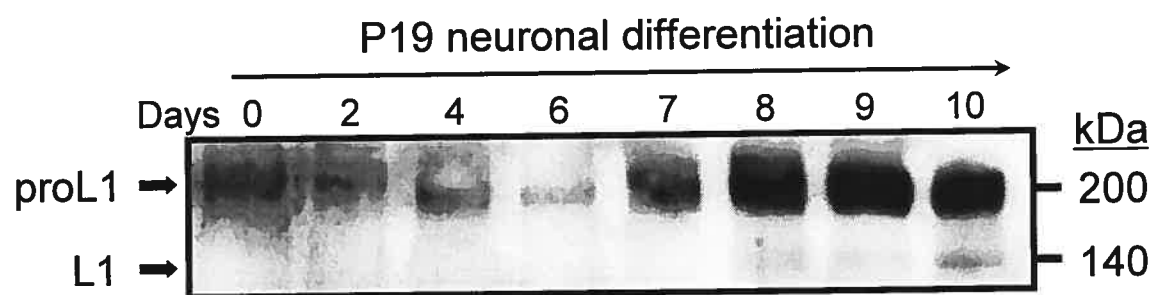


Figure 9: Immunobuvardage du *neural adhesion molecule L1* au cours de la différenciation neuronales des cellules P19

Annexe 2

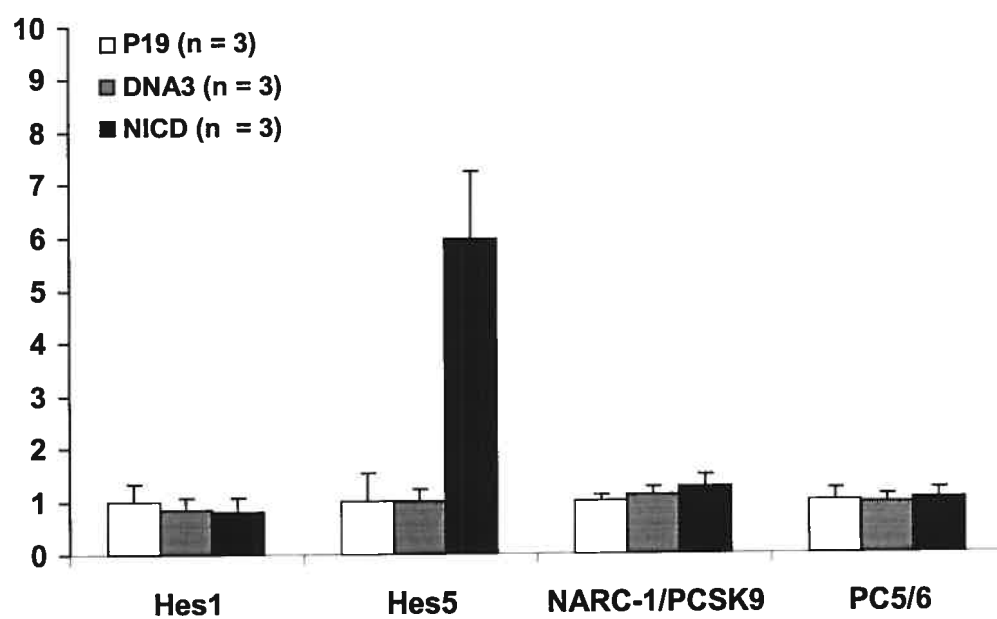


Figure 10: Analyse PCR en temps réel de Hes1, Hes5, NARC-1/PCSK9 et PC5/6 par NICD (*notch intracellular domain*) L'écart type représente des triplicatas biologiques (n=3).

Annexe 3

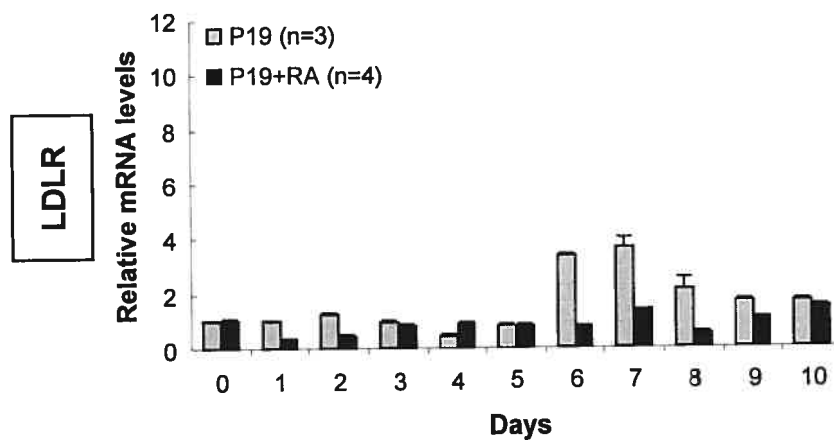


Figure 11: Quantification par PCR en temps réel de l'expression en ARNm du LDLR au cours de la différenciation neuronal des P19

Annexe 4

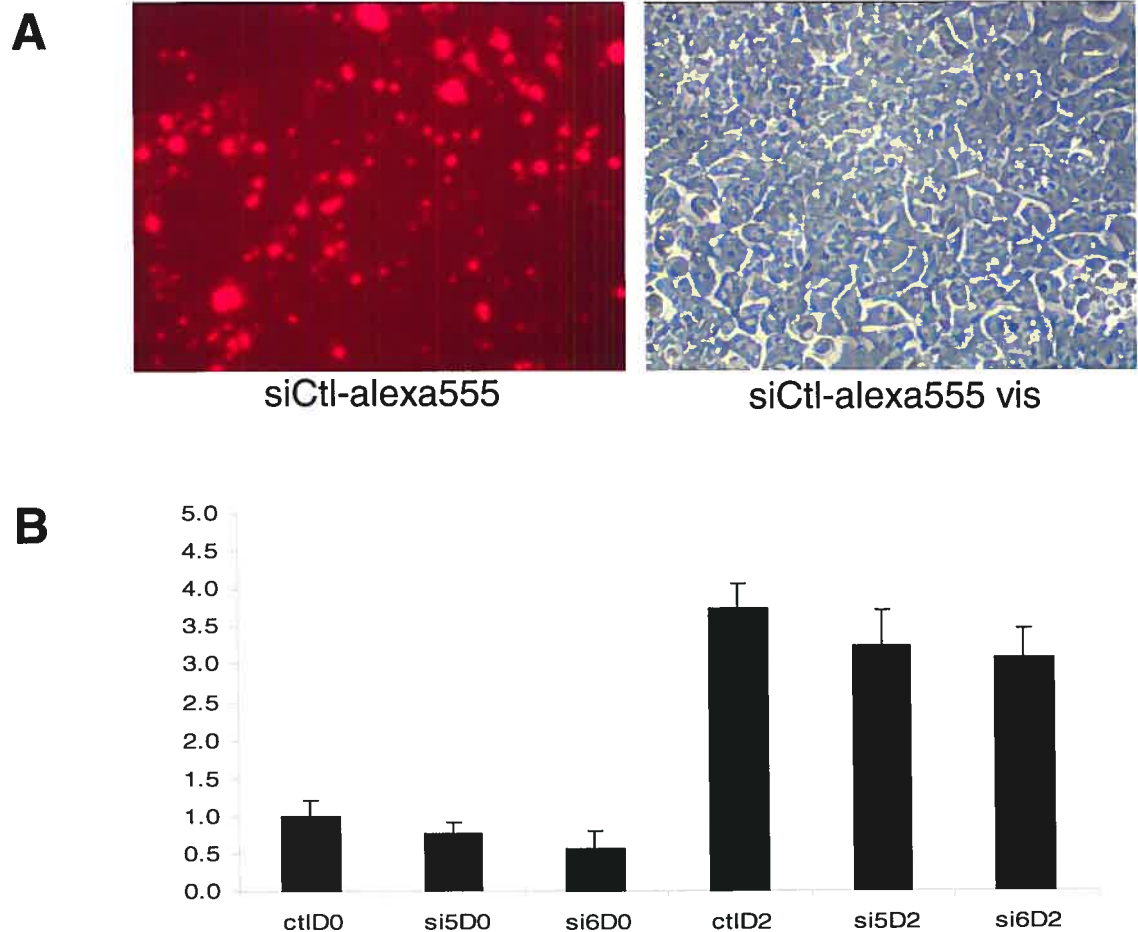


Figure 12: Oligotransfection de siRNA dans les cellules P19 (A) Image gauche : Immunofluorescence en vue de l'optimisation de l'efficacité d'oligotransfection de siRNA control couplé au fluorophore alexa 555. Image droite : photographie des cellules transfectées en lumière visible. (B) Quantification par PCR en temps réel de l'ARNm de NARC-1/PCSK9 suite à l'oligotransfection de siRNActl (alexa 555) et siRNA dirigés contre NARC-1/PCSK9 (si5, si6) soit 24h (D0) et 72h (D2) post-transfection.

Annexe 5

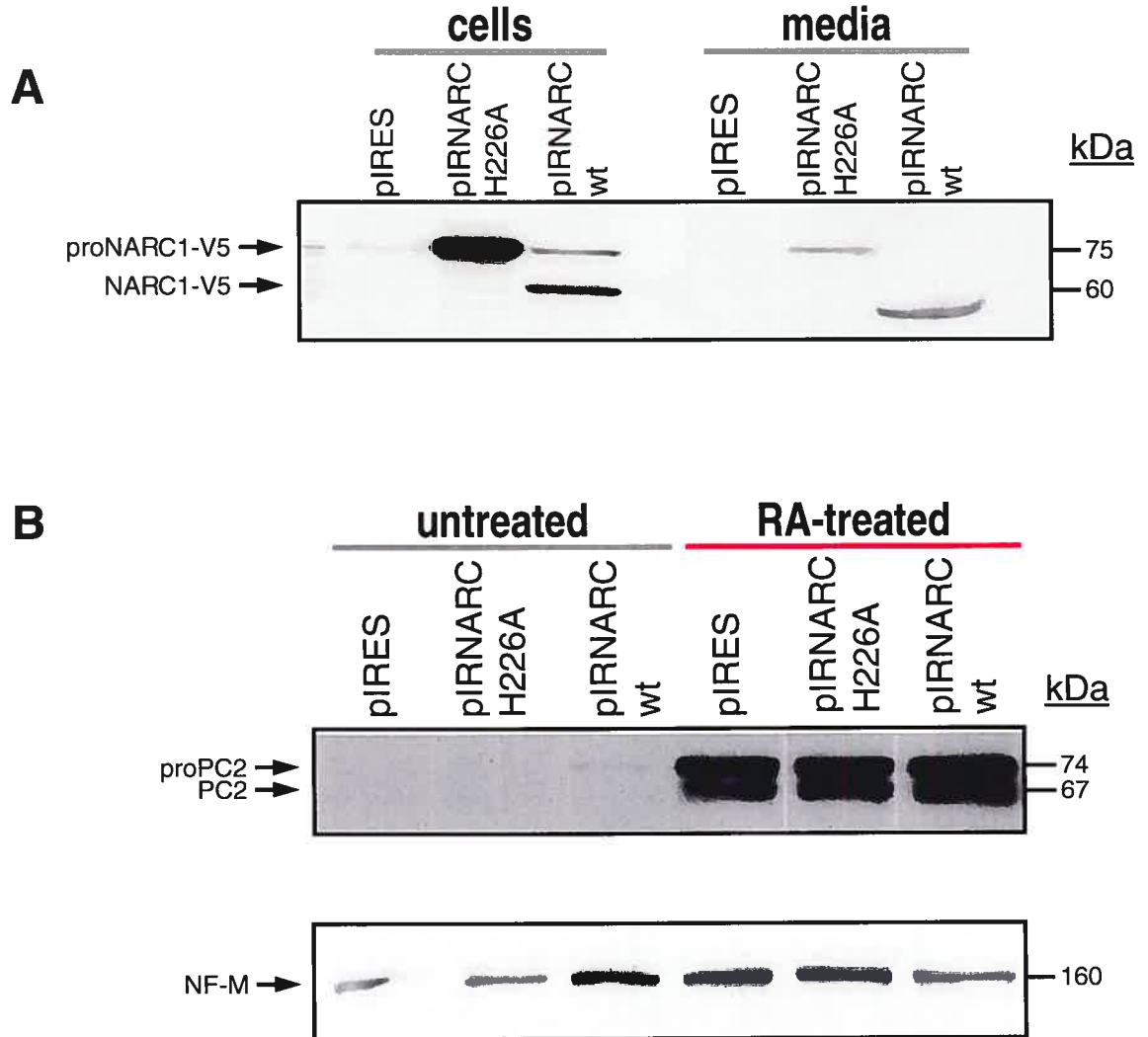
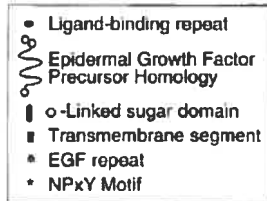


Figure 13: Surexpression de NARC-1/PCSK9 dans les cellules P19 Les cellules P19 furent transfectées transitoirement avec des cDNA encodant pour NARC-1/PCSK9 couplée avec un épitope V5 soit le wt (pIRNARCwt), le mutant inactif (pIRNARCH226A) et le vecteur vide (pIRES). (A) Immunobuvardage anti-V5 d'extrait protéique cellulaire et milieu 48h post-transfection. (B) Immunobuvardage des marqueurs neuronaux PC2 et NF-M sur des extraits protéiques 120h post-agrégation des différentes transfections (pIRES, pIRNARCH226A, pIRNARCwt) avec ou sans traitement à l'acide all-*trans* rétinolique.

Annexe 6



LDL Receptor-Superfamily

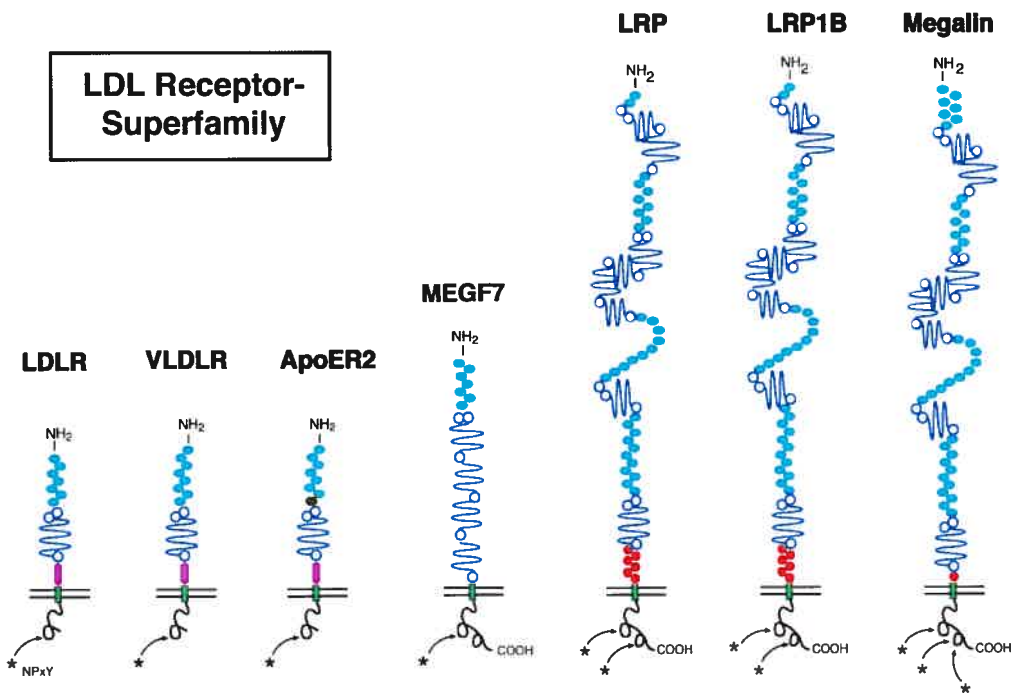


Image tirée de : Trommsdorff M., et al., *Cell*, 689-701.

Figure 14: Organisation structural des membres de la famille du LDLR

