

Université de Montréal

**Le médicament épigénétique 5-Azacytidine stabilise l'ARN
messager du récepteur des lipoprotéines de basse densité
(LDLR) *via* une voie IRE1 α /EGFR/ERK1/2- dépendante**

par

Nourhen Mnasri

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
doctorat en Sciences Biomédicales

Août, 2017

© Nourhen Mnasri, 2017

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Le médicament épigénétique 5-Azacytidine stabilise l'ARN
messager du récepteur des lipoprotéines de basse densité
(LDLR) *via* une voie IRE1 α /EGFR/ERK1/2- dépendante**

Présentée par :

Nourhen Mnasri

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires (MCV) occupent la première place en tant que cause majeure de mortalité et de morbidité au Canada et dans le monde. Plusieurs essais cliniques montrent que la réduction du cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL-c) est une stratégie efficace pour prévenir l'athérosclérose et les maladies coronariennes pour réduire le taux de mortalité. Le récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDLR) est une glycoprotéine transmembranaire qui sert à la liaison et l'endocytose des particules LDL. Chez l'homme, le récepteur LDL est fortement exprimé au niveau du foie, et est responsable de l'élimination de 70% à 80% du LDL-c à partir du plasma. Des mutations génétiques peuvent entraîner un LDLR dysfonctionnel et provoquer l'hypercholestérolémie familiale (FH), une maladie caractérisée par un niveau de LDL-c sanguin très élevé et la formation de plaques d'athérosclérose prématurées.

L'expression du LDLR est strictement contrôlée par les facteurs de transcription appelés protéines de liaison aux éléments régulateurs de stérol «*Sterol Regulatory element-binding proteins*» (SREBP) en réponse à l'accumulation excessive ou à l'épuisement du cholestérol intracellulaire. La régulation post-traductionnelle du récepteur LDL est médiée par sa dégradation intracellulaire *via* la proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9) ou par l'ubiquitine ligase E3 «*Inducible degrader of LDLR*» (IDOL). En revanche, nos connaissances sur le mécanisme de la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm du récepteur LDL sont encore très peu avancées.

La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm du récepteur LDL est médiée par sa région 3' non traduite (3'UTR). L'ARNm du récepteur LDL humain contient une séquence 3'UTR de 2,5 kb de long dans laquelle 3 régions riches en éléments AU (AREs) ont été précédemment identifiées en tant que médiateurs de la dégradation rapide de l'ARNm dans les cellules hépatiques.

Dans cet ouvrage, nous avons recherché des réponses aux questions suivantes: (1) À quel niveau la 5-Azacytidine (5-AzaC), un antimétabolite utilisé pour le traitement de la leucémie et le syndrome myélodysplasique, induit-elle la régulation du récepteur LDL ? (2) Quelles sont les voies de signalisations cellulaires impliquées dans la stabilisation du

récepteur LDL par la 5-AzaC ? (3) Est-ce que la stabilisation du récepteur LDL par la 5-AzaC est dépendante ou indépendante au stress du réticulum endoplasmique (RE) ?

1) Nous avons d'abord démontré que la 5-AzaC induisait l'augmentation de l'expression du récepteur LDL dans les cellules hépatiques humaines (HepG2 et Huh7) par un nouveau mécanisme indépendant des facteurs de transcription SREBP. Afin d'élucider les effets de la 5-AzaC sur le métabolisme des lipoprotéines, nous avons étudié son effet sur l'expression de l'ARNm du récepteur LDL. Nous avons constaté une stabilisation significative de son ARNm ainsi que l'augmentation du niveau de la protéine membranaire. Nos résultats montrent également que la 5-AzaC induit la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL par un mécanisme post-transcriptionnel nécessitant la présence de la séquence 3'UTR. Les mutations systématiques des trois motifs AREs (ARE1-3) situés au niveau de la séquence 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL et leur expression, couplés à la luciférase, dans les cellules Huh-7, ont montré que le motif ARE1 est à la fois le principal déterminant de la labilité de l'ARNm du récepteur LDL et le médiateur principal de sa stabilisation par la 5-AzaC.

2) Nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation requise pour la régulation post-transcriptionnelle du récepteur LDL, impliquant l'enzyme nécessitant l'inositol 1 α «*Inositol-requiring enzyme 1 α* » (IRE1 α), la kinase N-terminale c-Jun «*c-Jun N-terminal kinase*» (JNK), le récepteur des facteurs de croissance épidermique «*Epidermal growth factor receptor*» (EGFR) et la kinase 1/2 régulée par la signalisation extracellulaire «*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*» (ERK1/2). Dans les hépatocytes, la 5-AzaC entraînait l'activation du récepteur EGFR après 6h de traitement. Cet effet pourrait être expliqué par l'augmentation des ligands spécifiques du récepteur tels que l'amphiréguline (AREG) (40 fois) et l'épiréguline (EREG) (60 fois). La phosphorylation de ERK1/2 a été augmentée 2 h après l'activation de la voie JNK par IRE1 α .

3) Contrairement aux résultats obtenus avec la thapsigargine (Th), un inducteur efficace du stress au RE, nos résultats ont montré que la 5-AzaC activait la voie IRE1 α indépendamment du stress au niveau du RE. Le blocage du domaine IRE1 α kinase avec l'inhibiteur spécifique (KIRA 6) a inhibé la stabilisation de l'ARNm et l'augmentation de

l'expression du récepteur LDL dans les cellules traitées par la 5-AzaC. Au contraire, l'inhibition du domaine endonucléase de IRE1 α , en utilisant l'inhibiteur spécifique STF 083010 ou *via* sa mutation n'ont pas affecté la régulation positive du LDLR ni l'activation de ERK1/2 par la 5-AzaC.

Dans l'ensemble, ce présent travail nous a permis d'identifier la 5-AzaC comme étant un stabilisateur important de l'ARNm du récepteur LDL dans les hépatocytes *via* la cascade de signalisation IRE1 α /JNK-EGFR-ERK1/2. Ce mécanisme se déclenche par l'activation spécifique du domaine IRE1 α kinase de façon indépendante du stress au niveau du RE et s'achève par l'activation de la phosphorylation de ERK1/2 et les protéines de liaison de l'ARNm «*RNA-binding proteins*» (RBPs) induisant la stabilité de l'ARNm du récepteur LDL. Cette étude a révélé que la séquence 3'UTR est nécessaire pour la stabilisation du récepteur LDL et que le 1er motif ARE1 le plus proche du codon stop est le responsable principal de la stabilisation *via* la 5-AzaC.

L'identification de cette nouvelle voie de régulation permettra de révéler des cibles potentielles pour améliorer la clairance du LDL-c au niveau du foie ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de réduire le niveau de cholestérol.

Mots-clés: 5-AzaC, LDLR, 3'UTR, ARE1, IRE1 α , c-JNK, EGFR, ERK1 / 2.

ABSTRACT

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of mortality and morbidity in Canada and around the world. Several clinical trials have shown that reducing low-density lipoprotein (LDL-c) cholesterol is an effective strategy for preventing atherosclerosis and coronary heart disease to reduce mortality. The low density lipoprotein receptor (LDLR) is a transmembrane glycoprotein that serves for the binding and endocytosis of LDL particles. In humans, the LDLR is strongly expressed in the liver, and is responsible for the elimination of 70% to 80% of LDL-c from plasma. Genetic mutations can lead to dysfunctional LDLR and cause familial hypercholesterolemia (FH), a disease characterized by a very high level of blood LDL-c and the formation of premature atherosclerotic plaques.

The expression of LDLR is strictly controlled by transcription factors called sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) in response to excessive accumulation or depletion of intracellular cholesterol. Post-translational regulation of LDLR is mediated by its intracellular degradation *via* the proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (PCSK9) or by the ubiquitin ligase E3, the inducible degrader of LDLR (IDOL). On the other hand, our knowledge about the post-transcriptional regulation of LDLR mRNA is still very little advanced.

The post-transcriptional regulation of LDLR mRNA stability has been shown to be mediated through the mRNA 3' untranslated region (3'UTR). Human LDLR mRNA contains a 2.5-kb-long stretch of 3'UTR in which 3 AU-rich elements (AREs) were previously identified as a mediators of rapid turnover rate of LDLR mRNA in liver cells.

In this thesis, we sought answers to the following questions: (1) At which level does 5-Azacytidine (5-AzaC), an antimetabolite used for the treatment of leukemia and myelodysplastic syndrome, induce regulation of the LDLR? (2) Which cell signaling pathways are involved in 5-AzaC LDLR stabilization? (3) Is the 5-AzaC LDLR mRNA-stabilization - ER stress- dependent?

1) We first demonstrated that 5-AzaC increased the expression of LDLR in human hepatic cells (HepG2 and Huh7) by a new mechanism independent of the transcription

factors SREBP. In order to elucidate the effects of 5-AzaC on lipoprotein metabolism, we investigated its effect on LDLR mRNA expression. We observed a significant stabilization of its mRNA as well as an increase in the level of the membrane protein. Our results also show that 5-AzaC induces the stabilization of the LDLR mRNA by a post-transcriptional mechanism requiring the presence of its 3'UTR sequence. Systematic mutations of the three AREs (ARE1-3) motifs located at the 3'UTR sequence of the LDLR mRNA and their luciferase-like expression in Huh-7 cells showed that the ARE1 motif is both the primary determinant of LDLR mRNA lability and the target of 5-AzaC-induced mRNA stabilization.

2) We pinpointed a new signaling pathway required in LDLR post-transcriptional regulation involving the inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), the c-Jun N-terminal kinase (JNK), the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the extracellular signaling-regulated kinase1/2 (ERK1/2). In hepatocytes, 5-AzaC induced the activation of the EGFR receptor after 6 h of treatment. This effect could be explained by the increase in receptor-specific ligands such as amphiregulin (AREG) (40-fold) and epiregulin (EREG) (60-fold). The phosphorylation of ERK1/2 was increased 2 h after the JNK pathway activation by IRE1 α .

3) As opposed to the results obtained with thapsigargin (Th), a potent ER stress inducer, our results showed that 5-AzaC activates the IRE1 α pathway independently of the ER stress. Blocking of the IRE1 α kinase domain with the specific inhibitor (KIRA 6) blunted the increase of LDLR mRNA and protein levels in 5-AzaC-treated cells. Contrarily, the inhibition of the endonuclease domain of IRE1 α , using the specific inhibitor STF 083010 or by its mutation, did not affect the 5-AzaC LDLR up-regulation neither IRE1 α and p-ERK1/2 activation.

In summary, this work allowed us to identify 5-AzaC as an important stabilizer of the LDLR mRNA in hepatocytes *via* the IRE1 α /JNK-EGFR-ERK1/2 signaling cascade. This mechanism started by the specific activation of the IRE1 α kinase domain independently to the ER stress and finished by the phosphorylation of ERK1/2 and the binding of the RNA-binding proteins (RBPs) ensuring LDLR mRNA stability. This study revealed that the 3'UTR sequence is necessary for the stabilization of the LDLR mRNA

and that the first ARE1 motif closest to the stop codon is the main cause of stabilization *via* 5-AzaC.

The identification of this new regulatory pathway will reveal potential targets to enhance plasma LDL-c clearance in the liver as well as new therapeutic strategies to reduce cholesterol levels.

Keywords: *5-AzaC, LDLR, 3'UTR, ARE1, IRE1 α , c-JNK, EGFR, ERK1/2.*

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	vi
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations	xvi
Dédicaces	xviii
Remerciements	xix

CHAPITRE 1: INTRODUCTION 1

I. L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires- généralités

1. L'athérosclérose	1
1.1. Interactions cellulaires et moléculaires et initiation de la maladie	2
1.2. Rôle de l'endothélium et les lipides dans l'athérosclérose	2
1.3. Le processus inflammatoire et la formation des cellules spumeuses	3
1.4. La thrombose	4
2. Les maladies cardiovasculaires	5
2.1. L'infarctus du myocarde (IM) et le syndrome métabolique (MetS)	5
3. Structure, synthèse et transport du cholestérol	6
3.1. Les lipoprotéines	10
3.1.1. Les différentes classes de lipoprotéines	11
3.2. Métabolisme de lipoprotéines	12
3.2.1. Les chylomicrons (CM)	12
3.2.2. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de densité intermédiaires (IDL)	13
3.2.3. Les lipoprotéines de faible densité (LDL)	13
3.2.4. Le transport inverse du cholestérol	14
4. Les conséquences des troubles de synthèse du cholestérol	15
4.1. Le syndrome d'Antley-Bixler	15
4.2. La dysplasie squelettique létale type Greenberg	16
4.3. La lathostérolose et la desmostérolose	16
4.4. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SSLO)	16
5. Les conséquences des troubles au niveau du trafic du cholestérol	17
5.1. La maladie de Niemann-Pick type C (NPC)	17
6. Les conséquences des troubles au niveau du transport inverse du cholestérol	17
6.1. La maladie de Tangier	17

7. Hypercholestérolémie familiale (HF)	18
7.1. Description clinique et épidémiologie de la maladie	18
7.2. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale dominante (HAD)	19
7.2.1. LDLR	19
7.2.2. L'apolipoprotéine B100 (apo-B100)	20
7.2.3. La proprotéine convertase subtilisine / kexine de type 9 (PCSK9)	21
7.3. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale récessive (HAR)	22
7.3.1. Le domaine de liaison à la phospho tyrosine (PTB) et les protéines adaptatrices	22
7.4. Diagnostic de la FH	23
8. Approches thérapeutiques pour contrôler le niveau du cholestérol sanguin	23
8.1. Les statines	24
8.2. Les résines échangeuses d'anions	25
8.3. L'acide nicotinique	25
8.4. Les fibrates	26
8.5. Les inhibiteurs de l'absorption du cholestérol	26
II. Le récepteur de lipoprotéines de basse densité (LDLR)	27
1. Historique	27
2. Structure du récepteur LDL	28
3. Internalisation du LDLR: Origine du concept de l'endocytose	31
III. La régulation du récepteur LDL	32
1. Régulation transcriptionnelle du LDLR	32
1.1. Les protéines de liaison aux éléments régulateurs de stérol (SREBPs)	32
1.2. L'activation de SREBP par une cascade protéolytique	32
1.3. SREBP: deux gènes, trois protéines	34
1.4. La voie de SREBP: SCAP en tant que capteur de stérol	35
1.5. La voie de SREBP: Identification de INSIG	36
2. Régulation post-traductionnelle du LDLR	38
2.1. La proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)	38
2.1.1. Structure de PCSK9	38
2.1.2. Régulation de l'expression de PCSK9	40
2.1.2.1. Les facteurs de transcription SREBP-2 et SREBP1c	40
2.1.2.2. Le facteur nucléaire hépatocytaire 1 α (HNF1 α)	41
2.1.3. Dégradation du récepteur LDL par PCSK9	41
2.1.4. Les autres récepteurs / canaux / enzymes affectés par PCSK9	44
2.2. Le dégradeur inductible du récepteur LDL (IDOL)	45
2.2.1. Structure de l'ubiquitine ligase IDOL	45
2.2.2. Régulation de l'expression de la protéine IDOL par le récepteur nucléaire LXR	45
2.2.3. Ubiquitination et dégradation du LDLR par IDOL	46
3. Régulation post-transcriptionnelle du LDLR	48
3.1. La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm	48

3.1.1. Les mécanismes de régulation de la stabilité de l'ARNm	49
3.1.2. Les différentes classes d'AREs	50
3.1.3. Les protéines de liaison de l'ARNm «RBPs»	51
3.1.3.1. Les protéines Hu de la famille «ELAV-Like/Hu Protein Family»	53
3.1.3.2. La protéine AUF-1 « Adenylate - uridylate – rich elements (ARE)/poly (U) – binding degradation factor-1»	55
3.1.3.3. La tristétraproline (TTP)	56
3.1.3.4. La protéine KSR «K homology-type splicing regulatory protein»	56
3.1.4. Protéines RBPs vs les micro-ARN	57
3.1.5. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la stabilité de l'ARNm par les RBPs	59
3.1.5.1. Les voies des MAP Kinases	60
3.1.5.1.1. La voie des MAP Kinases p38	60
3.1.5.1.2. La voie « <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> » (JNK)	60
3.1.5.1.3. La voie « <i>Extracellular signal- regulated kinases</i> » (ERK1/2)	60
3.1.5.2. La voie de l'AMP kinase	61
3.1.5.3. La protéine kinase C (PKC)	61
3.2. Les protéines RBPs et les maladies cardiovasculaires	61
3.2.1. Les RBPs et l'infarctus du myocarde (IM)	63
3.2.2. Les RBPs et l'hypertension	64
3.2.3. Les RBPs et l'hypertrophie	64
3.2.4. Les RBPs et la fibrose	64
3.3. Régulation de l'expression du récepteur LDL <i>via</i> son 3'UTR	65
3.3.1. Structure de la séquence 3'UTR du LDLR	66
3.3.2. Les RBPs impliquées dans la régulation du LDLR	67
4. Les micro-ARNs vs la stabilité du LDLR	68
CHAPITRE 2: RÉSUMÉ DU PROJET DE RECHERCHE ET MISE EN CONTEXTE	69
1. Introduction	69
2. Problématique	70
3. Hypothèses	71
4. Les objectifs du projet	71
CHAPITRE 3: CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	73
1. Article 1	73
CHAPITRE 4: DISCUSSION	117
1. La stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL <i>via</i> la séquence 3'UTR	117
2. Régulation de l'expression du récepteur LDL par la 5-AzaC	120
2.1. Stabilisation post-transcriptionnelle de l'ARNm du récepteur LDL par la 5-AzaC	122

2.2. Activation de la voie de signalisation ERK1/2 et du récepteur EGFR par la 5-AzaC	123
2.3. Activation de la cascade de signalisation IRE1 α -JNK par la 5-AzaC	126
2.4. Activation de la voie de signalisation IRE1 α d'une façon indépendante du stress du RE	128
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	131
BIBLIOGRAPHIE	133
ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	xxi
CURRICULUM VITAE	xxviii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les principales apolipoprotéines constituant les lipoprotéines plasmatiques et leurs fonctions correspondantes.	12
Tableau 2: Le rôle des RBPs dans le développement des maladies cardiovasculaires.	62
Tableau 3: Effet de la sous-expression de quelques RBPs sur l'expression de l'ARNm du récepteur LDL.	67

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Les stades de formation d'une lésion athérosclérotique.	5
Figure 2: Structure chimique du cholestérol	6
Figure 3: Les voies endogène et exogène du métabolisme du cholestérol.	7
Figure 4: Synthèse du cholestérol à partir de la voie métabolique de l'acétyl coenzyme.	8
Figure 5: Apport exogène du cholestérol <i>via</i> le récepteur LDL.	9
Figure 6: Représentation schématique d'une particule de lipoprotéines.	10
Figure 7: Classification des principaux types de lipoprotéines selon la densité.	11
Figure 8: Les xanthomes cutanés au niveau a) du coude gauche, b) la main et c) les genoux.	19
Figure 9: Structure chimique de la HMG-CoA et de différentes classes des statines.	25
Figure 10: Structure du récepteur LDL.	29
Figure 11: L'homologie de structure des membres de la famille du récepteur LDL.	31
Figure 12: Clivage protéolytique du facteur de transcription SREBP.	34
Figure 13: Structures de SREBP-1a et SREBP-2 humains.	35
Figure 14: Mécanismes de modification de la conformation de SCAP en présence de stérols et l'inhibition du transport de SREBP du RE vers l'appareil de Golgi.	37
Figure 15: Variations des séquences de PCSK9.	39
Figure 16: Mécanisme de régulation de l'expression du LDLR par PCSK9.	42
Figure 17: les différents modèles de dégradation du récepteur LDL par PCSK9.	44
Figure 18: Le mécanisme de reconnaissance et d'ubiquitination du récepteur LDL par IDOL.	47
Figure 19: La structure générique de l'ARNm chez les eucaryotes.	49
Figure 20: Les différentes fonctions des protéines RBPs dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.	53
Figure 21: Illustration schématique de la séquence 3'UTR avec ses éléments régulateurs (agissant en cis) et leurs principaux partenaires d'interaction (éléments à effet trans).	59
Figure 22: Mécanismes de stabilisation de l'ARNm par la protéine HuR.	65
Figure 23: Structure de la région 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL.	66
Figure 24: Profils de l'expression des gènes après 24h de traitement des cellules HepG2 avec la 5-AzaC.	72
Figure 25: Représentation de la méthylation de l'ADN (A), et de l'inhibition de la DNMT (B).	122
Figure 26: Activation de la voie de signalisation ERK1/2 par le récepteur EGFR	

ainsi que les protéines impliquées.

124

Figure 27: Mécanisme contrôlant l'expression de EREG par la voie de signalisation IRE1 α -JNK.

128

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AICAR	<i>5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside</i>
Apo-B	<i>apolipoprotein B</i>
Apo-E	<i>apolipoprotein A/E</i>
AREG	<i>amphiréguline</i>
AVC	<i>accident vasculaire cérébral</i>
5-AzaC	<i>5-Azacytidine</i>
BBR	<i>berberine</i>
CDCA	<i>chenodeoxycholic acid</i>
C-Jun	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
CM	<i>chylomicron</i>
CMLs	<i>cellules musculaires lisses</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EREG	<i>épiréguline</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal- regulated kinases</i>
FH	<i>familial hypercholestérolémie</i>
HAD	<i>hypercholestérolémie autosomale dominante</i>
HAR	<i>hypercholestérolémie autosomale recessive</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase</i>
HNF1α	<i>hepatocyte nuclear factor 1 alpha</i>
IDOL	<i>inducible degrader of low-density lipoprotein receptor</i>
IM	<i>infarctus du myocarde</i>
INSIG	<i>Insulin induced gene</i>
IRE1α	<i>inositol-requiring enzyme 1 alpha</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>

MCV	<i>maladies cardiovasculaires</i>
MetS	<i>metabolic Syndrome</i>
PCSK9	<i>proprotein convertase subtilisin kexin type 9</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RBP s	<i>RNA- binding proteins</i>
RE	<i>reticulum endoplasmique</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SNC	<i>système nerveux central</i>
SRE	<i>sterol response element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding proteins</i>
Th	<i>thapsigargin</i>
TIC	<i>transport inverse de cholestérol</i>
3'UTR	<i>three prime untranslated region</i>
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
WT	<i>wild-type</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

À mes parents,

REMERCIEMENTS

Il m'est agréable au terme de ce travail, de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à l'accomplissement de mon projet. À l'heure des bilans, je peux admettre que ce fut un parcours généralement heureux avec quelques moments difficiles que je chéris parce qu'ils m'ont permis de grandir et m'ont fait progresser tant au plan scientifique et humain. Mais, je ne me suis pas rendue là où je suis aujourd'hui toute seule.

Tout d'abord, je tiens à adresser mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Dr. Gaétan Mayer, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je lui témoigne toute ma gratitude pour sa confiance, son ouverture d'esprit, ses encouragements, ses remarques constructives et sa patience.

Mes remerciements vont également à l'endroit de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, à la mission universitaire de la Tunisie à Montréal et à l'organisme subventionnaire de mon directeur de thèse, l'IRSC, pour leur support financier durant mes années de doctorat.

Je témoigne toute ma reconnaissance envers Dr. Bruce G. Allen et Dr. Yahye Merhi pour l'amabilité avec laquelle ils m'ont toujours traitée, pour leur aide et leurs encouragements.

Mes remerciements s'adressent également à Dr. Nicolas Bousette pour sa collaboration et sa générosité.

Je remercie très affectueusement Mme Maya Mamarbachi, responsable du service de biologie moléculaire et Mr. Louis Villeneuve, responsable de l'imagerie cellulaire à l'Institut de Cardiologie de Montréal, pour leur collaboration soutenue, leur bienveillance et leur disponibilité en tout temps.

J'aimerais aussi remercier tous les autres membres de l'équipe, anciens ou actuels, pour leur aide et leurs conseils. Je remercie particulièrement Dr. Steve Poirier et Dr. Ahmed Zaid pour leurs précieux conseils, mes collègues Dre. Emilienne Tudor Ngo Sock, Dre.

Annie Demers et Samaneh Samami et mes chers amis Jessika, Sabrina et Alexis pour tous les moments agréables que j'ai partagés avec eux.

Je ne manquerai pas de remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce présent travail.

Enfin, je remercie, avec tout mon amour, ma famille:

Un grand merci à mes frères Walid et Abdelbaki, à leurs épouses Fabienne et Nadia et à ma nièce et mon neveu adorés Ranim et Fady.

Merci à mes sœurs Siham et Imène, à leurs époux et à mes amours Hamdi, Ayoub, Omar et Chahd pour leur amour et leur soutien qui m'accompagnent au quotidien. Vous avez su m'apporter la chaleur et la convivialité nécessaires à mon équilibre malgré la distance.

Je ne remercierai jamais assez les deux personnes les plus chères à mon cœur, mes parents. Qu'ils puissent trouver en ces modestes mots le témoignage de mon amour éternel et de ma profonde reconnaissance pour leur amour inconditionnel et leur soutien. Vous avez toujours cru en moi et m'avez donné la chance de réaliser mon rêve le plus cher, j'espère pouvoir vous rendre fières.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Les MCV sont considérées comme la cause majeure de mortalité et d'incapacité dans le monde entier et plus particulièrement dans les pays industrialisés. Cliniquement parlant, elles désignent généralement des troubles du fonctionnement du cœur et des vaisseaux sanguins et englobent une gamme de maladies majeures, notamment les AVC, les maladies coronariennes, le trouble du rythme cardiaque, l'insuffisance cardiaque et l'athérosclérose. Ensembles, les MCV et les AVC demeurent une énorme charge économique et un fardeau très lourd pour le domaine de la santé aussi bien au Canada qu'à l'échelle mondiale (Mozaffarian *et al.*, 2015).

Au Canada, les maladies cardiaques et cérébrovasculaires sont la première cause de décès (Agence de la santé publique du Canada, 2010). En 2011, elles représentaient près de 20% de tous les décès (46 852 décès) (Statistiques Canada, 2014) et demeurent les principales causes d'hospitalisation dans le pays (CIHI, 2011). Selon l'agence de la santé publique du Canada, le rapport publié en 2010 mettait en exergue l'hypertension comme un facteur de risque principal associé aux MCV. En 2009, le même organisme a rapporté que les individus diabétiques risquent également de développer une MCV. D'après les statistiques, environ 80 % des canadiens atteints de diabète meurent d'une crise cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral. Grâce à l'étude de Framingham, il était largement admis que l'âge, le sexe, l'hérédité, le tabagisme, l'inactivité physique, la dyslipidémie et le diabète sont les principaux facteurs de risques responsables des MCV (Cupples and D'Agostino., 1987).

I. L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires – généralités

1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie progressive caractérisée par la formation de plaques d'athérome constituant des sites inflammatoires dans la paroi artérielle avec une accumulation de lipides et d'éléments fibreux (Berliner *et al.*, 1995; Lusic *et al.*, 2000). Malgré les progrès thérapeutiques considérables au cours des 50 dernières années, l'athérosclérose est toujours considérée comme une principale cause de décès dans les pays industrialisés et dans le monde entier (Lusic *et al.*, 2000, L'association américaine des maladies du cœur, 2017). Le processus d'athérogenèse implique plusieurs types de

cellules, telles que les cellules endothéliales (Reglero-Real *et al.*, 2016), les cellules musculaires lisses (CMLs) (Majesky., 2016) , les cellules immunitaires (monocytes et macrophages) (Manes *et Pober.*, 2016) et les cellules souches / progénitrices (Xie *et al.*, 2016). Après accumulation de lipides, les macrophages se transforment en cellules spumeuses et ces dernières sont à l'origine de la lésion précoce du type strie lipidique, élément clé de l'athérogenèse. Ensuite, la lésion évolue successivement vers les stades fibreux et complexes et pourrait aboutir à la rupture qui provoquerait la formation d'un thrombus occluant la lumière du vaisseau sanguin (Lusis *et al.*, 2000) (**Figure 1**).

1.1. Interactions cellulaires et moléculaires et initiation de la maladie

Les études réalisées sur le développement de l'athérosclérose ont révélé une série bien définie des changements au niveau des vaisseaux sanguins durant l'athérogenèse. Ces études ont également montré que les cellules inflammatoires dérivées du sang, en particulier les monocytes et les macrophages, ont un rôle clé dans la progression de la maladie. Les études faites sur des cultures tissulaires et cellulaires variées telles que les cellules vasculaires, les monocytes et les macrophages, ont fourni des preuves concrètes concernant le rôle de l'endothélium comme étant un médiateur central de l'inflammation. Elles ont également suggéré que l'oxydation et l'accumulation de lipoprotéines de basse densité oxydées (LDL-Ox) dans l'intima pourrait contribuer d'une manière significative au recrutement de monocytes et à la formation de cellules spumeuses (Smithies *et Maeda.*, 1995; Gimbrone., 1999).

1.2. Rôle de l'endothélium et les lipides dans l'athérosclérose

L'endothélium, avec ses jonctions intercellulaires complexes, fonctionne comme une barrière entre le sang et les tissus. Il possède des fonctions lui permettant de générer des molécules effectrices qui régulent la thrombose, l'inflammation, le tonus et le remodelage vasculaires (Gimbrone., 1999).

Les lipides jouent un rôle central dans la pathogenèse des plaques. Les études antérieures sont unanimes pour démontrer un lien fort entre le niveau de lipides plasmatique et le risque de MCV (Grainger *et al.*, 1994; Boren *et al.*, 1998; Goldstein *and Brown.*, 2009). Chez l'humain, le niveau de lipoprotéines de basse densité (LDLs) encore

appelé «mauvais cholestérol», est en corrélation directe avec le risque d'événements cardiovasculaires et augmente la susceptibilité individuelle à l'athérosclérose ainsi que ses complications (Goldstein *and* Brown., 2009). En effet, le processus d'athérosclérose commence par l'accumulation des particules LDLs dans la matrice sous-endothéliale. Ces particules diffusent passivement à travers les jonctions des cellules endothéliales et restent piégées dans la paroi des vaisseaux. La rétention des particules LDLs au niveau de la paroi des vaisseaux semble impliquer des interactions spécifiques entre les protéoglycanes de la matrice et l'apolipoprotéine B (apoB) qui constitue les particules LDLs (Boren *et al.*, 1998). D'autres lipoprotéines contenant l'apoB, telles que les lipoprotéines (a) et les vestiges de VLDL peuvent également s'accumuler dans l'intima et favoriser l'athérosclérose. La lipoprotéine (a), une particule ressemblant aux LDLs mais contenant un polypeptide supplémentaire liée à l'apoB par un pont disulfure appelé apolipoprotéine (a), semble être particulièrement athérogène en raison de ses effets supplémentaires sur la fibrinolyse ainsi que la croissance des cellules spumeuses (Grainger *et al.*, 1994).

Contrairement aux particules LDLs, les lipoprotéines de haute densité (HDLs) sont connues par leur potentiel protecteur contre l'athérosclérose grâce à leur rôle dans l'élimination de l'excès de cholestérol dans les tissus périphériques. De plus, les HDLs sont caractérisées par leurs propriétés antioxydantes et antiinflammatoires *in vitro* et *in vivo* ce qui permet d'inhiber l'oxydation des lipoprotéines (Rye *et al.*, 2009).

1.3. Le processus inflammatoire et la formation des cellules spumeuses

L'athérosclérose se caractérise par le recrutement des cellules du système immunitaire dans la paroi de l'artère telles que les monocytes et les lymphocytes. L'accumulation des particules LDL-Ox est l'événement déclencheur du processus inflammatoire, ce qui stimule les cellules endothéliales à produire certaines molécules pro-inflammatoires comme les molécules d'adhésion et les facteurs de croissance tels que le facteur M-CSF. L'activité biologique des LDL-Ox est contenue principalement dans sa fraction phospholipidique (Watson *et al.*, 1997). Ces particules peuvent également inhiber la production d'oxyde nitrique (NO), un médiateur chimique possédant de multiples propriétés anti-athérogènes, y compris la vasorelaxation (Knowles *et al.*, 2000). En plus du

LDL-Ox, d'autres facteurs sont susceptibles de moduler le processus inflammatoire, y compris les forces hémodynamiques, les niveaux d'homocystéine, les hormones sexuelles et l'infection (Hofmann *et al.*, 1999).

Les cellules spumeuses sont formées suite à l'absorption rapide des particules LDLs hautement oxydées (ou autrement modifiées) par les macrophages. Ce processus pourrait être médié par un groupe de récepteurs éboueurs ou «scavengers», capables de reconnaître un large éventail de ligands tels que le récepteur SR-A et le récepteur CD36 (Suzuki *et al.*, 1997).

1.4. La thrombose

Les plaques fibreuses se caractérisent généralement par la formation d'une masse croissante de lipides extracellulaires, principalement du cholestérol libre et de son ester, et par l'accumulation des CMLs qui migrent de la media vers la surface sous- endothéliale de l'intima et forment la chape fibreuse entourant le cœur lipidique. Les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les macrophages et les cellules T sont aussi importants pour la migration et la prolifération des CMLs ainsi que pour la production de la matrice extracellulaire (Schönbeck *et al.*, 2000). Il a été précédemment documenté que le développement des maladies coronariennes aiguës médiés par la formation du thrombus dépendait principalement de la composition et de la susceptibilité plaquettaire plutôt que la gravité de la sténose. Ces plaques contiennent généralement des capsules fibreuses fines et de nombreuses cellules inflammatoires. Le tissu fibreux reflète la formation ou la dégradation de la matrice, alors que les cellules inflammatoires pourraient influencer les deux processus. Par exemple, les lymphocytes T produisent l'IFN- γ , qui pourrait inhiber la production de la matrice extracellulaire par les CMLs alors que les macrophages produisent diverses protéases qui la dégradent, y compris la collagénase interstitielle, les gélatinases et la stromolysine (Libby., 1999). La rupture se produit fréquemment aux bords des lésions riches en cellules spumeuses, ce qui suggère que les facteurs contribuant à l'inflammation pourraient également influencer la thrombose. À cet égard, il est remarquable que l'incidence de l'infarctus du myocarde et les accidents cardiovasculaires augmentent dans le cas des infections aiguës (Watson *et al.*, 1994).

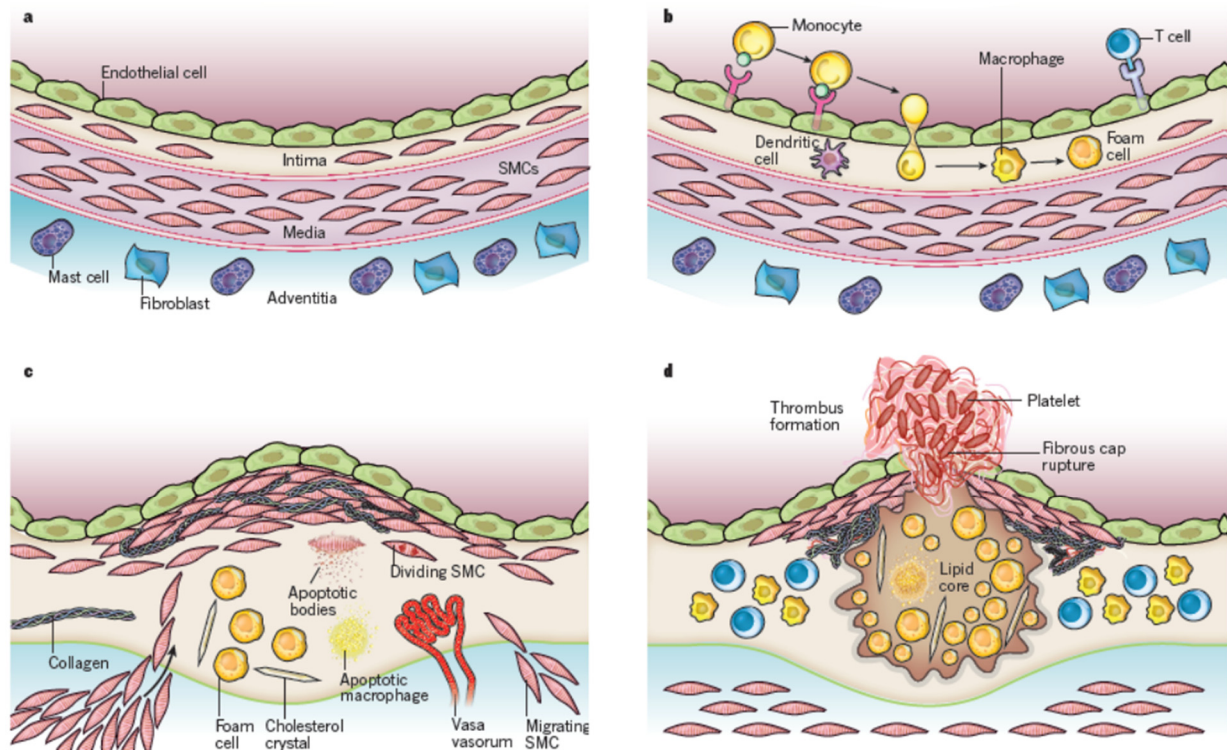


Figure 1: Les stades de formation d'une lésion athérosclérotique
(Source: Libby *et al.*, 2011).

2. Les maladies cardiovasculaires

Les MCV et les AVC demeurent très répandus au Canada et dans le monde entier (Mozaffarian *et al.*, 2016). Ces maladies partagent des facteurs de risques vasculaires similaires, y compris l'hypertension, le diabète, la dyslipidémie, l'obésité abdominale, l'inactivité physique, la mauvaise alimentation et le tabagisme (O'Donnell *et al.*, 2010). L'hypertension, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'obésité abdominale coexistent souvent dans le cas du syndrome métabolique (MetS). Ce dernier est présent chez environ un tiers de la population américaine et il est fortement associé aux risques d'avoir un IM (Ninomiya *et al.*, 2004; Boden-Albala., 2006).

2.1. L'infarctus du myocarde (IM) et le syndrome métabolique (MetS)

L'IM pourrait être défini à partir de différents points de vue liés aux caractéristiques cliniques, électrocardiographiques, biochimiques et pathologiques. L'IM a également des

implications sociales et psychologiques, à la fois. Comme un indicateur d'un problème de santé majeur et comme mesure de la prévalence de la maladie dans les statistiques démographiques et les résultats des essais cliniques. Il est défini comme une mort nécrotique due à une ischémie prolongée des cellules du myocarde (La société européenne de cardiologie., 2000).

Le MetS est un ensemble d'anomalies incluant généralement l'obésité abdominale, la glycémie élevée et la tolérance au glucose altérée, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle, qui pourraient ensemble augmenter le risque de diabète et des MCV (ATP III., 2002).

3. Structure, synthèse et transport du cholestérol

Le cholestérol a été défini comme étant «la plus petite molécule décorée en biologie» par Brown et Goldstein le jour de la remise de leur prix Nobel en 1985. Durant et après cette époque, plusieurs études ont été menées pour la recherche d'un ou de plusieurs aspects de la biochimie des stérols ainsi que leurs métabolites (Nes and McMean., 1977; Brown and Goldstein., 1986). Le cholestérol a été découvert et isolé pour la première fois par des chimistes français à partir des calculs biliaires humains il y a plus de 230 ans (Gibbons., 2002). En 1888, la formule du cholestérol a été initialement proposée par Friedrich Richard Reinitze, mais il a fallu encore plus que 30 ans pour établir la formule exacte de la molécule par Wieland en 1927 et Windaus en 1928 (Popjak., 1986) (**Figure 2**).

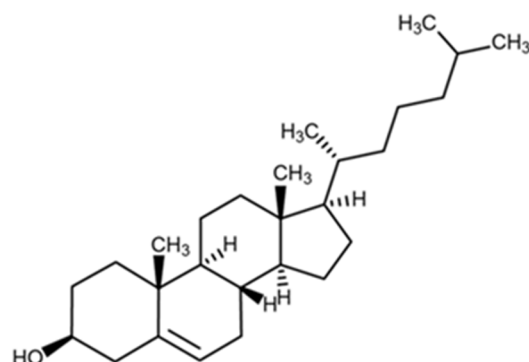


Figure 2: Structure chimique du cholestérol (Source: Goldstein and Brown., 1990).

Le cholestérol est un élément essentiel pour la croissance et le développement. C'est un constituant important de la membrane cellulaire, où il régule à la fois la fluidité de la membrane et constitue les radeaux lipidiques (Pike., 2004). Il est également essentiel pour la formation de la myéline (Jurevics and Morell., 1995). Le cholestérol ainsi que ses intermédiaires biosynthétiques sont considérés comme étant des précurseurs métaboliques clés pour la synthèse des corticostéroïdes, de la vitamine D, des acides biliaires (Russell., 2004) et des hormones stéroïdiennes (Bhatti., 2012).

Chez les mammifères, l'apport en cholestérol provient de deux voies différentes; la voie de synthèse endogène au niveau du foie à partir de l'acétyl Coenzyme A (Acetyl-CoA) (75%) (Nes., 2011) et la voie exogène (lors de la prise alimentaire) (35%) (Frances *et al.*, 2014) (**Figure 3**).

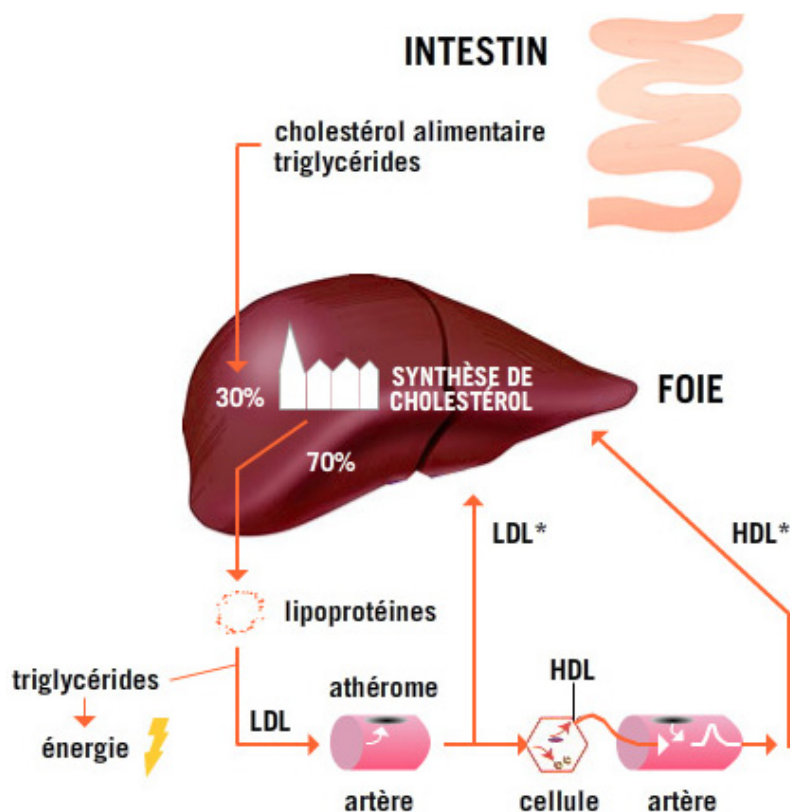


Figure 3: Les voies endogène et exogène du métabolisme du cholestérol
(Source: <http://www.effi-science.com/lipamine-cholesterol/cholesterol?catid=67>).

La voie endogène est une voie multi-enzymatique connue sous le nom de la biosynthèse *de novo* (figure 4).

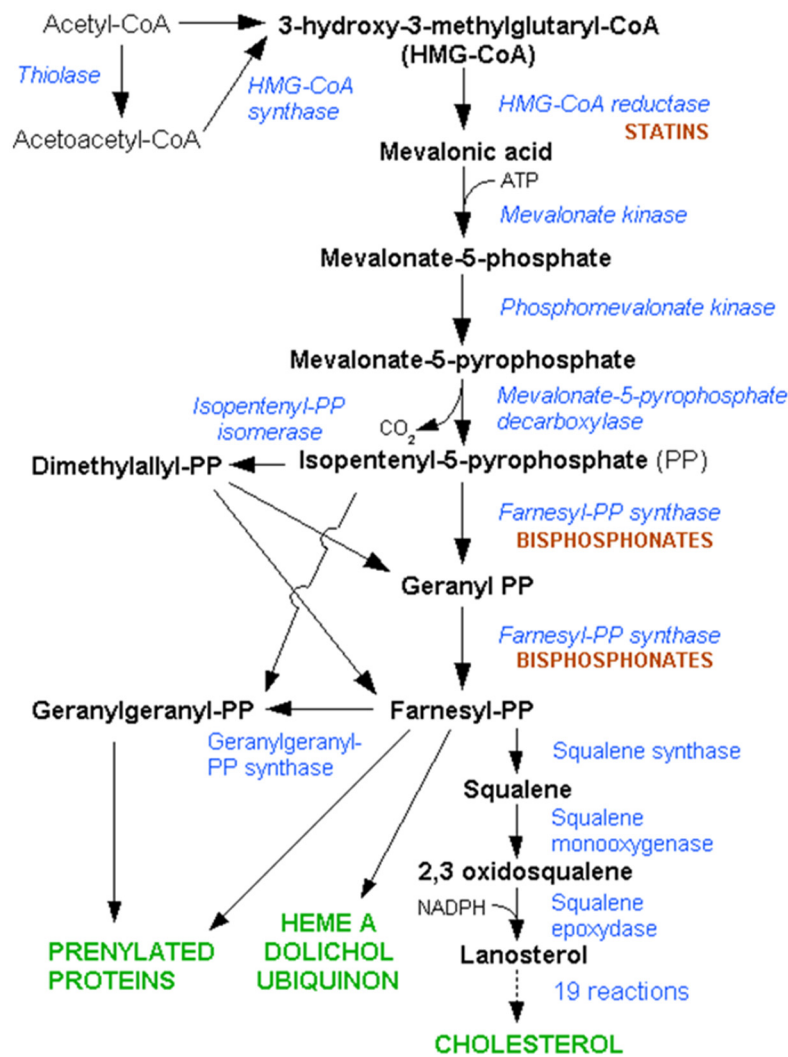


Figure 4: Synthèse du cholestérol à partir de la voie métabolique de l'acétyle coenzyme A (Acetyl-CoA) (Source: Goldstein and Brown., 1990).

La biosynthèse *de novo* se déroule en deux étapes, l'étape pré-squalène qui contribue à la synthèse des stérols et d'isoprénoïdes et l'étape post-squalène qui aboutit à la biosynthèse du cholestérol et de la vitamine D. En effet, une molécule de cholestérol contient 27 atomes de carbone dérivant de l'acétyle-CoA. La première étape de synthèse implique la condensation de trois acétates pour former le mévalonate. Par la suite, le

mévalonate se transforme en isoprènes activés, qui vont ensuite se polymériser pour former une molécule linéaire de 30 atomes de carbone, appelée squalène. L'étape finale de cette biosynthèse consiste à des réactions d'oxydation et à des modifications des groupements méthyle. La voie de biosynthèse *de novo* peut être manipulée pharmacologiquement en utilisant des statines, des inhibiteurs puissants de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase (Nes., 2011).

La deuxième voie d'apport de cholestérol est la voie exogène qui consiste à l'absorption du cholestérol associé aux particules LDL dans la circulation. Cet apport en cholestérol se déroule essentiellement au niveau du foie et provient principalement de l'alimentation. L'absorption du cholestérol exogène au niveau des cellules est assurée par le récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Frances *et al.*, 2014) (**Figure 5**).

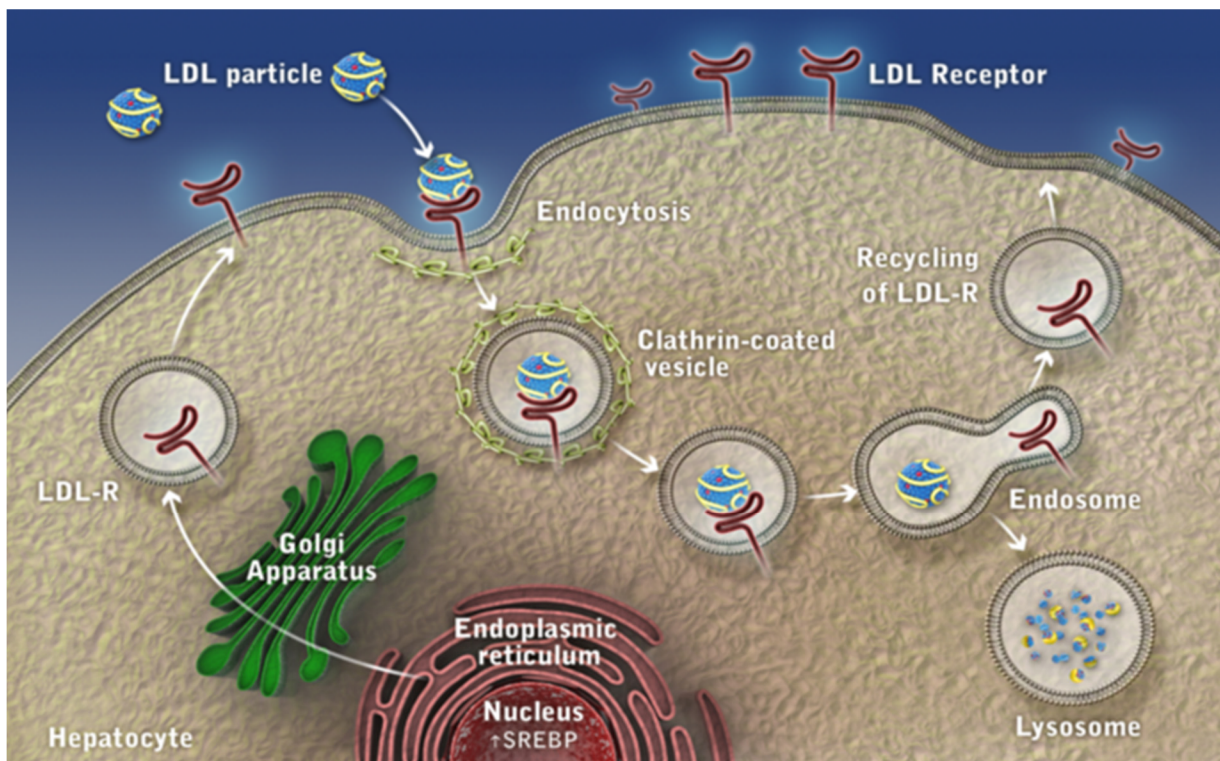


Figure 5: Apport exogène du cholestérol *via* le récepteur LDL

(Source : <https://pace-cme.org/2012/10/08/novel-therapies-for-the-prevention-of-atherosclerotic-vascular-disease/>).

3.1. Les lipoprotéines

En raison de son insolubilité, le cholestérol est transporté dans le plasma par des complexes protéolipidiques connus sous le nom de lipoprotéines. Ces particules sont constituées d'une apolipoprotéine structurale, d'apolipoprotéines périphériques, de lipides structuraux (phospholipides et cholestérol) et de lipides hautement hydrophobes notamment les triacylglycérols (TAG) et les esters de cholestérol (Vance and Vance., 2008) (**Figure 6**).

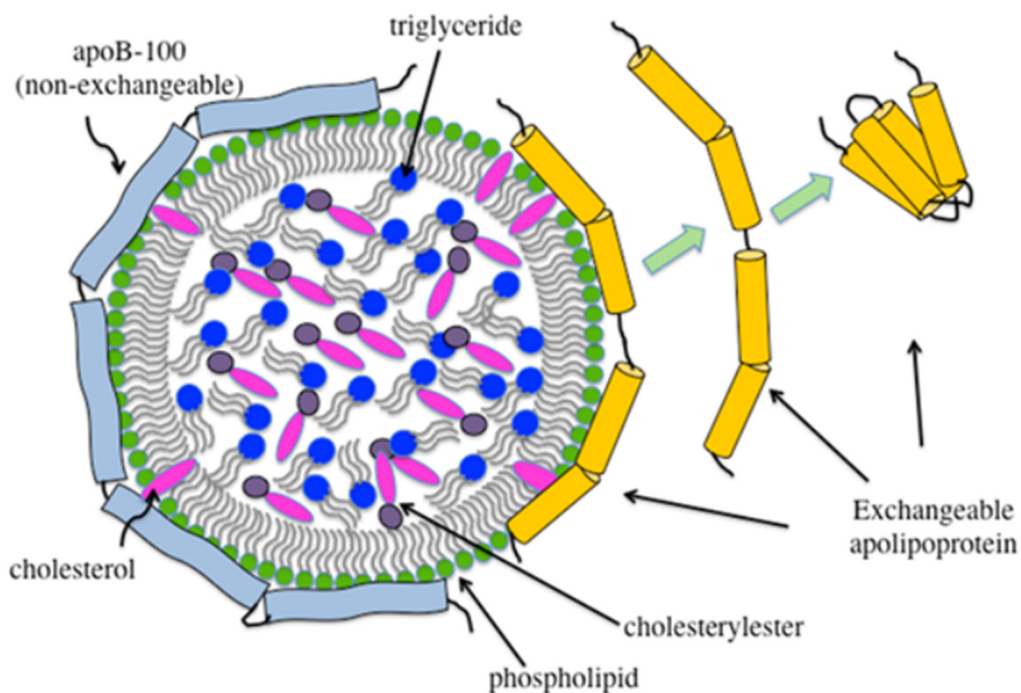


Figure 6: Représentation schématique d'une particule de lipoprotéines
(Source : Jairam *et al.*, 2012).

Ces particules jouent un rôle majeur dans le transport des lipides et des molécules lipophiles dans le plasma ainsi que dans le système nerveux central. Les lipoprotéines plasmatiques représentent un continuum dynamique de particules qui subissent constamment des changements dans leurs composants lipidiques et protéiques conduisant à une restructuration de la particule dans des conditions physiologiques normales. La ré-

modulation de ces particules est le résultat du transfert de lipides médié par des processus enzymatiques et non enzymatiques et de l'association ou la dissociation des lipides à partir d'apolipoprotéines (Jairam *et al.*, 2012).

3.1.1. Les différentes classes de lipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité, leur diamètre et leur composition. Nous trouvons les lipoprotéines de haute densité (HDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les chylomicrons (CM). En général, le diamètre de ces particules est inversement proportionnel à leur densité. (**Figure 7**) (Jairam *et al.*, 2012).

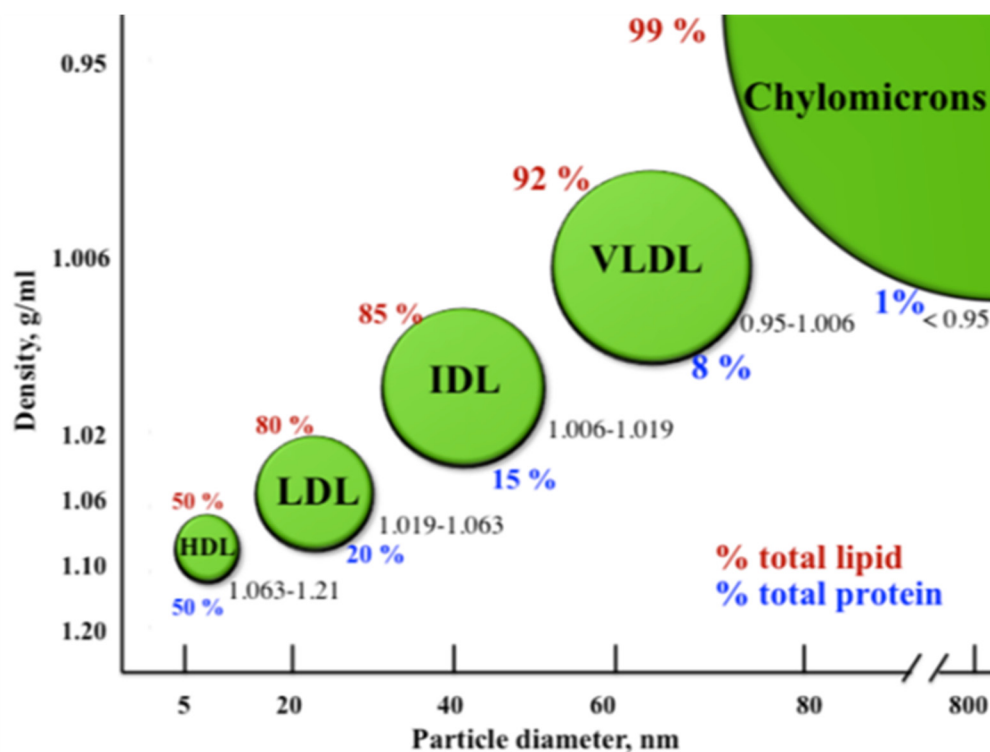


Figure 7 : Classification des principaux types de lipoprotéines selon la densité. La gamme de densité pour chaque classe est indiquée (noir), la teneur en lipides (rouge) et en protéines (bleu) (Source : Jairam *et al.*, 2012).

Les lipoprotéines sont subdivisées en deux grandes classes en fonction du type d'apolipoprotéine, un composant structural de base des lipoprotéines. Nous trouvons des

lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B (apoB) et d'autres contenant l'apolipoprotéine AI (apo-AI). En combinaison avec d'autres apolipoprotéines périphériques telles que l'apoE, l'apo-CII et l'apo-CI, ces protéines peuvent définir la fonction et les destinées métaboliques des lipoprotéines dans le corps (Vance and Vance, 2008).

Tableau 1 : Les principales apolipoprotéines constituant les lipoprotéines plasmatiques et leurs fonctions correspondantes (Jairam *et al.*, 2012, modifié).

Apolipoprotéine	Lipoprotéine	Fonction
ApoAI	HDL	active LCAT, ABCA1
ApoAII	HDL	inhibe LCAT
ApoAIV	Chylomicrons, HDL	active LCAT, la clearance et le transport du cholestérol
ApoB-48	Chylomicrons, Chylomicrons restants	clearance et transport du cholestérol
ApoB-100	VLDL, IDL, LDL	se lie au récepteur LDLR
ApoCI	VLDL, HDL	active LCAT
ApoCII	VLDL, IDL, Chylomicrons	active la lipoprotéine lipase
ApoCIII	VLDL, IDL, Chylomicrons	inhibe la lipoprotéine lipase
ApoD	HDL	transport des protéines de la famille des lipocalines
ApoE2	VLDL, IDL, Chylomicrons, Chylomicrons restants	faible liaison de LDLR, associée au MCV et la FH
ApoE3	HDL, VLDL, IDL, Chylomicrons restants (lie les HDL plus que les VLDL)	grande affinité au LDLR, associée aux MCV et l'athérosclérose
ApoE4	VLDL, HDL, IDL, Chylomicrons restants (lie les VLDL plus que les HDL)	grande affinité au LDLR, associée aux MCV et l'Alzheimer
ApoM	HDL	transporte la sphingosine-1-phosphate
Apo(a)	Lipoprotéine (a) (Lp(a))	lie l'apoB-100

3.2. Métabolisme de lipoprotéines

3.2.1. Les chylomicrons (CM)

Le transport des molécules hydrophobes dans le système vasculaire aqueux est l'une des principales fonctions des lipoprotéines (Jairam *et al.*, 2012). Tout d'abord, les lipides provenant de l'alimentation sont absorbés par l'intestin grêle et ensuite réassemblés dans de grandes particules connues sous le nom de CM (Vance and Vance, 2008). Les CM sont sécrétés initialement dans la lymphe et rejoignent la circulation sanguine. Ils sont caractérisés par leur grande taille mais ils ont le rapport protéique / lipidique le plus bas, et ils ont donc la plus faible densité de toutes les autres lipoprotéines. Ils sont caractérisés par une surface hydrophile contenant les phospholipides et les protéines alors que les molécules hydrophobes sont enfermées à l'intérieur (Miles., 2003). Ils contiennent une forme tronquée de l'apoB spécifique de l'intestin, l'apo-B48. Les CM représentent essentiellement un système de distribution de triglycérides (TG) et de lipides alimentaires dans tout le corps pour leur utilisation directe ou pour leur stockage (Vance and Vance, 2008). Les CM naissants sont formés essentiellement par l'apoB-48, l'apo-AI, l'apo-AII et

l'apo-AIV. Dans la circulation, les CM naissants acquièrent l'apo-CII et l'apoE à partir des particules HDL. L'apo-CII est essentielle pour activer la lipoprotéine lipase (LPL). Les CM se lient aux LPLs au niveau des capillaires des tissus adipeux et musculaires où les TG sont hydrolysés en acides gras (AG). Ces derniers seront transportés vers la cellule adipeuse où ils sont de nouveau stockés sous forme de TG. Au niveau des muscles, les AG sont oxydés pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP. Les CM diminuent progressivement de taille et de densité lors de l'absorption des AG par les tissus et ils transfèrent, au fur et à mesure, une partie de leurs phospholipides et apolipoprotéines A et C aux particules HDL. À leur tour, les protéines apo-CII sont continuellement recyclées entre les CM et les HDL et les vestiges de CM seront captés et endocytés dans les hépatocytes par le LDLR (Miles., 2003).

3.2.2. Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les lipoprotéines de densité intermédiaires (IDL)

Les VLDL sont synthétisées et sécrétées au niveau du foie, leur rôle consiste essentiellement à la distribution des lipides vers les tissus périphériques (Jairam *et al.*, 2012). Tout comme les CM, les VLDL subissent des changements constants dans le plasma. Tout d'abord, elles acquièrent l'apo-CII et l'apoE à partir des particules HDL, puis elles se lient à la LPL située au niveau des capillaires des tissus adipeux et musculaires où les TG sont hydrolysés en AG. De même, les AG sont transportés dans les cellules adipeuses où ils seront de nouveau ré-synthétisés et stockés sous forme de TG. Les AG sont oxydés au niveau du muscle pour fournir de l'énergie. Au fur et à mesure que les tissus absorbent les AG et les monoacylglycérols, les VLDL se transforment progressivement en IDL et transfèrent une partie de phospholipides et de l'apo-CII aux particules HDL. Les IDL peuvent se lier au récepteur LDL des hépatocytes où elles seront absorbées de la même façon que les vestiges de CM. Les IDL continueront d'être catabolisées par la LPL et finiront par perdre l'apoE pour former des LDL (Miles., 2003).

3.2.3. Les lipoprotéines de faible densité (LDL)

Les LDL sont des particules riches en cholestérol et contiennent exclusivement l'apoB-100. Les particules LDL sont les principaux transporteurs de cholestérol plasmatique (Miles., 2003). Elles jouent un rôle important dans la distribution du

cholestérol aux tissus périphériques et au foie. L'absorption cellulaire et l'internalisation des particules LDL sont assurées par le LDLR qui lie l'apoB située dans leur couche de phospholipides (Jairam *et al.*, 2012). Les LDL sont internalisées au niveau de la cellule par l'intermédiaire des vésicules revêtues de clathrine (Andersons *et al.*, 1976). Après acidification des endosomes, la particule de LDL se dissocie de son récepteur pour que ce dernier puisse être recyclé au niveau de la membrane cellulaire. Lorsque les particules LDL atteignent les compartiments tardifs de l'endosome / lysosome, elles seront hydrolysées et le cholestérol généré serait disponible pour qu'il soit transporté vers d'autres compartiment dans la cellule, tels que la membrane plasmique, la mitochondrie et le RE (Strickland *et al.*, 2002).

3.2.4. Le transport inverse du cholestérol

Les lipoprotéines de haute densité, HDL, sont des particules hétérogènes au point de vue taille et composition. Par rapport aux autres lipoprotéines, elles ont la densité relative la plus élevée tout en étant les plus petites en taille. Les HDL jouent un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol (TIC) en agissant comme un transporteur du cholestérol vers le foie et comme étant un médiateur important de l'homéostasie et du métabolisme des lipides. Les particules HDL sont principalement sécrétées par le foie et l'intestin grêle. Le foie est considéré comme la source principale des particules HDL dans la circulation vu qu'il sécrète ~ 70 à 80% du HDL total dans le plasma. L'apo-AI est la principale protéine structurale des HDL. En plus de l'apo-AI, plusieurs autres apolipoprotéines contribuent à la formation des HDL telles que l'apo-AII, l'apo-AIV, l'apoB, l'apo-CI et l'apo-CII (Timmins *et al.*, 2005; Vaisar *et al.*, 2007; Davidsson *et al.*, 2010). Un grand nombre d'études épidémiologiques ont constaté que le taux faible de particules HDL transportant le cholestérol (HDL-c) est un facteur de risque important des MCV. Ces études ont démontré que les taux élevés de HDL-c sont associés à une réduction de l'incidence des MCV (Cappel *et al.*, 2013). Les particules HDL transportent le cholestérol dans le sang à partir des cellules périphériques, y compris les macrophages et les cellules endothéliales situées au niveau des artères. Le cholestérol capté par les HDL peut être estérifié en CE dans le sang par la LCAT. Une fois arrivé dans le foie, le CE entre dans la cellule hépatique grâce à des récepteurs spécifiques des particules HDL tels que les

SR-BI. Par la suite, le CE sera métabolisé en acides biliaires ou en lipides neutres, qui seront excrétés dans la bile. Ce mécanisme expliquerait l'effet anti-athérosclérotique des particules HDL (Fisher *et al.*, 2012).

Le processus du TIC à partir des macrophages nécessite la collaboration de plusieurs facteurs, y compris les transporteurs «*ATP-binding cassette transporter*» ABCA1 et ABCG1 et le récepteur SR-BI (Larrede *et al.*, 2009). L'ABCA1 est situé au niveau de la membrane cellulaire pour faciliter la liaison du cholestérol et de phospholipides à l'apo-AI afin de former des HDL naissants en forme de disque. Ces dernières seront ensuite transformées en HDL sphériques matures par la lécithine cholestérol transférase (LCAT), la protéine de transport du cholestérol ester (CETP), la protéine de transfert de phospholipides et d'autres facteurs. L'ABCG1 n'est pas impliqué dans l'assemblage des particules HDL naissantes. Par contre, il favorise l'efflux de cholestérol ce qui augmente le taux de HDL-c (Freeman *et al.*, 2014). La fonction du récepteur SR-BI diffère selon le type cellulaire ; dans le cas des macrophages, il sert à transporter le cholestérol intracellulaire libre vers les particules HDL matures (Zhang *et al.*, 2005), tandis qu'au niveau du foie et de la surrénale, il fonctionne principalement comme un récepteur pour absorber sélectivement le cholestérol ester provenant des particules HDL (Chen *et al.*, 2000).

4. Les conséquences des troubles de synthèse du cholestérol

4.1. Le syndrome d'Antley-Bixler

Les patients atteints du syndrome d'Antley-Bixler (AB) (OMIM#207410) présentent des anomalies cranio faciales sévères et des défauts squelettiques comme la synostose radio-humérale. Cette pathologie est due généralement à une diminution de la synthèse du cholestérol ou à une stéroïdogénèse altérée. On distingue deux formes génétiques, l'AB de type 1 associé à des mutations hétérozygotes du gène *FGFR2* (10q26), sans anomalie de la stéroïdogénèse, et l'AB de type 2 associé à des anomalies homozygotes du gène *POR* (7q11.2). Ce gène code pour le cytochrome P450 oxydoréductase, enzyme jouant un rôle direct dans la stéroïdogénèse (Porter and Herman., 2011).

4.2. La dysplasie squelettique létale type Greenberg

La dysplasie de Greenberg (OMIM#215140) est une pathologie très rare et létale caractérisée par une anasarque fœto-placentaire (*hydrops fetalis*), des membres courts et une calcification anormale des os et du cartilage. C'est une maladie létale *in utero* qui se transmet par un mode autosomique récessif et elle est due à une mutation du gène codant pour le récepteur de la lamine B qui appartient à la famille des stéroïdes réductases (Wassif *et al.*, 2007).

4.3. La lathostérolose et la desmostérolose

La lathostérolose (OMIM #607330) est une erreur innée du métabolisme du cholestérol due à un déficit en 3-bêta-hydroxystéroïde-delta-5-désaturase ce qui empêche la conversion du lathostérol en 7-déhydrocholestérol. Ce syndrome s'accompagne de diverses malformations, d'un retard mental et d'un dysfonctionnement hépatique (Brunetti-Pierri *et al.*, 2002).

La desmostérolose (OMIM#602398) est une maladie causée par un trouble de la biosynthèse du cholestérol et caractérisée par de multiples malformations et une accumulation généralisée de desmostérol. Elle a été rapportée chez deux patients. Tous les deux avaient des taux plasmatiques et tissulaires élevés de desmostérol, un visage dysmorphique et une fente palatine. Les autres malformations variaient considérablement chez les deux patients, incluant la macro ou la microcéphalie, le retour veineux pulmonaire anormal, l'ostéosclérose généralisée, la persistance du canal artériel, l'ambiguïté sexuelle ou l'agénésie du corps calleux. La maladie se transmet par un mode autosomique récessif et elle est due à un déficit en 3-bêtahydroxystérol-delta24-réductase. Le premier enfant atteint de cette maladie est décédé une heure après sa naissance (Clayton *et al.*, 1996).

4.4. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SSLO)

Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (OMIM#270400) est un trouble prototypique au niveau de la biosynthèse du cholestérol. Des mutations du gène *DHCR7* (11q13.4) entraînent un déficit en 7-déhydrocholestérol réductase, enzyme qui convertit le 7-déhydrocholestérol (7DHC) en cholestérol. Cette pathologie est caractérisée par des anomalies congénitales multiples, par des anomalies cardiovasculaires (telles que la

communication inter-auriculaire ou inter-ventriculaire, la persistance du canal artériel ou du canal atrio-ventriculaire) et par un déficit intellectuel et des troubles comportementaux (Smith *et al.*, 1964).

5. Les conséquences des troubles au niveau du trafic du cholestérol

5.1. La maladie de Niemann-Pick type C (NPC)

La maladie de Niemann-Pick type C est définie comme une lipidose lysosomale complexe avec une hépatosplénomégalie et une atteinte neurologique progressive. Elle se transmet par un mode autosomique récessif et se produit à une fréquence de 1/120 000 naissances. D'après les statistiques, environ 95% des cas de NPC résultent de la mutation des gènes NPC1 ou NPC2. Le gène NPC1 a été identifié comme un gène défectueux pour la première fois par l'équipe de Pentchev et ses collaborateurs. Il code pour une grande protéine membranaire de 1228 acides aminés et contient 13 régions transmembranaires permettant son acheminement vers l'endosome et le lysosome et le transport du cholestérol vers l'endosome (Carstea *et al.*, 1997). Quelques temps après, un deuxième gène, NPC2 a été identifié. Ce dernier code pour une petite protéine soluble de 132 acides aminés (Naureckiene *et al.*, 2000). Les protéines NPC1 et NPC2 travaillent de façon concertée au niveau du système endo-lysosomal pour faciliter le transport intracellulaire du cholestérol et d'autres molécules. Quel que soit le gène muté, la lésion cellulaire résultante est représentée par une anomalie du transport intracellulaire du cholestérol exogène (LDL), avec une accumulation du cholestérol non estérifié dans le lysosome (Vanier., 2010).

6. Les conséquences des troubles au niveau du transport inverse du cholestérol

6.1. La maladie de Tangier

La maladie de Tangier est un trouble rare du métabolisme des lipoprotéines caractérisé biochimiquement par une absence quasi complète de HDL dans le plasma (Puntoni *et al.*, 2012) et, au niveau moléculaire, par la mutation du gène ABCA1 (Remaley *et al.*, 1999). Au niveau clinique, cette maladie est caractérisée par une hépatosplénomégalie, une lymphadénopathie et une hypertrophie des amygdales accompagnées d'une neuropathie périphérique chez les enfants et les adolescents, et occasionnellement, d'une MCV chez les adultes (Puntoni *et al.*, 2012).

7. Hypercholestérolémie familiale (HF)

7.1. Description clinique et épidémiologie de la maladie

L'hypercholestérolémie familiale (HF) (MIMN#143890) est le résultat d'un trouble génétique qui se produit au niveau du métabolisme des lipoprotéines. Elle est caractérisée par des concentrations plasmatiques élevées de LDL-c, des xanthes au niveau des tendons, la formation de plaques d'athérosclérose prématurées et une forte augmentation du risque des maladies coronariennes prématurées. La HF est l'un des troubles héréditaires les plus courants avec une incidence de 1/250 personnes; en effet, nous trouvons environ 10 000 000 personnes souffrant de cette maladie dans le monde entier, principalement des hétérozygotes. La HF est causée principalement par des mutations du gène codant pour le LDLR (\approx 60% des cas) et elle peut également être due, moins fréquemment, à la mutation du gène codant pour l'apoB (2%) ou la PCSK9 (2%) (Goldstein *et al.*, 2001, Abifadel *et al.*, 2003) (**Figure 8**).

La HF a été décrite pour la première fois par Müller en 1938 (Müller., 1938). Elle était initialement considérée, et pour longtemps, comme le résultat d'une synthèse accrue du cholestérol (Langer *et al.*, 1972). En 1970, Brown et Goldstein ont constaté que la HF était plutôt dû à l'absence de la haute affinité du récepteur LDL pour les particules de LDL (Goldstein and Brown., 1973; Brown and Goldstein., 1974). De nos jours, la HF est une des maladies génétiques les plus connues. Nous trouvons deux formes de HF, une forme hétérozygote dont la prévalence est de 1:250 et une forme plus rare, la forme homozygote, avec une prévalence de 1:1000000. D'après les statistiques, les plus hautes fréquences de la HF se trouvent chez certaines populations telles que les canadiens français (Leitersdorf *et al.*, 1990), les chrétiens libanais (Lehrman *et al.*, 1987), les finlandais (Koivisto *et al.*, 1992) et les sud-africains (Kotze *et al.*, 1991).

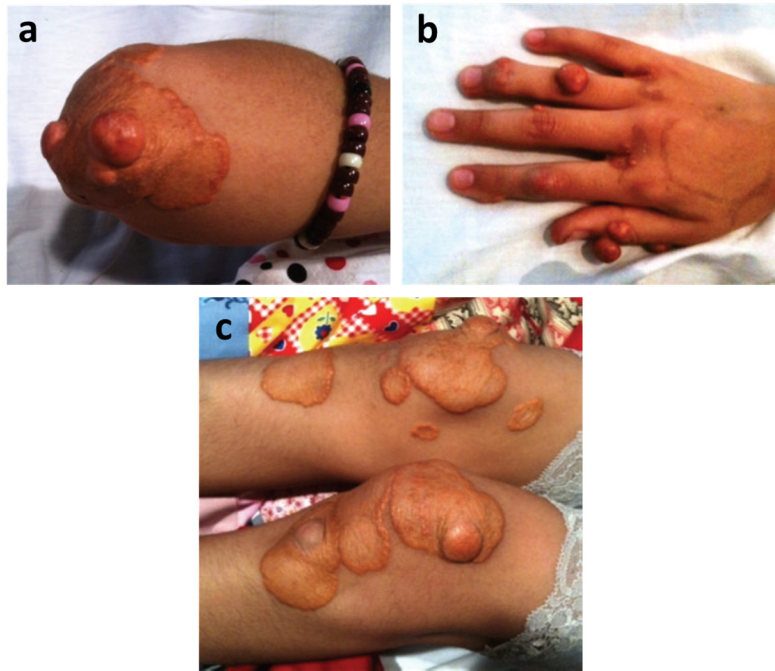


Figure 8 : Les xanthomes cutanés au niveau **a)** du coude, **b)** la main et **c)** les genoux
(Source : Carlos *et al.*, 2011).

Chez les patients porteurs de la forme hétérozygotes de la HF, le niveau du cholestérol plasmatique est plus élevé (de 2 à 6 fois) en comparant avec les individus sains. De plus, les pourcentages de mortalité selon l'âge et le sexe sont 4 à 5 fois plus élevés que dans les populations normales. En raison de l'incidence élevée de MCV prématurées avant 55 ans chez les hommes et 65 ans chez les femmes et de la diminution de l'espérance de vie en présence de cette maladie, la HF est considérée comme un problème de santé publique mondial (De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

7.2. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale dominante (HAD)

7.2.1. LDLR

La forme hétérozygote de la HF est caractérisée par la présence d'une seule copie mutée du gène codant pour le LDLR. Elle se retrouve à une fréquence de 1: 250 personnes parmi la plupart des groupes ethniques dans le monde entier. Cette maladie est caractérisée par une diminution de 50% du niveau du LDLR fonctionnel ce qui engendre une augmentation du nombre de particules de LDL dans le sang depuis la naissance. Chez les

individus porteurs de cette maladie, il est possible d'observer des crises cardiaques avant l'âge de 30 ans. De plus, environ 5% des personnes qui subissent un infarctus du myocarde ont une mutation hétérozygote de la HF (Goldstein and Brown., 2009). De nos jours, plus de 1000 mutations au niveau du LDLR ont été décrites chez les patients atteints de la HF.

Ces mutations sont classées en fonction du comportement phénotypique de la protéine mutée. Au total, nous distinguons cinq classes (De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

Les mutations de classe 1, connues sous le nom «allèles nuls» sont dues à une délétion au niveau du promoteur du LDLR, à la modification du cadre de lecture, à des mutations du site d'épissage ou, à la production d'un ARN messager (ARNm) anormal (Hobbs *et al.*, 1988).

Les mutations de classe 2 caractérisent un défaut de transport qui empêchent le bon repliement du LDLR dans le RE. Nous distinguons deux sous- classes pour les mutations de classes 2, les allèles de classe 2A produisant une protéine LDLR incapable de quitter le RE et les allèles de classe 2B codant pour une protéine dont le transport vers l'appareil de Golgi est trop ralenti (Yamamoto *et al.*, 1984).

Les mutations de classe 3 sont caractérisées par des allèles causant un défaut de liaison à l'apoB, où le LDLR est synthétisé et transporté à la surface cellulaire mais incapable de lier les particules LDL (De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

Les mutations de classe 4 causent un défaut d'internalisation. Elles sont divisées en deux sous classes ; les mutations de classe 4A affectant le domaine cytoplasmique du LDLR et les mutations de classe 4B touchant à la fois, le domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire. Ces mutations permettent de bloquer l'internalisation du LDLR par son endocytose *via* les vésicules de clathrine (Dais *et al.*, 1986).

Enfin, les allèles avec défaut de recyclage sont appelées mutations de classe 5. Elles touchent le domaine «*EGF-like domain*» permettant la liaison du LDLR avec le ligand mais elles empêchent sa dissociation et son recyclage vers la surface cellulaire (Hobbs *et al.*, 1992).

7.2.2. L'apolipoprotéine B100 (apo-B100)

En 1986, Vega et Grundy ont rapporté que certains patients souffrant de la HF avaient une faible clairance du LDL-c à cause d'un défaut de structure ou de composition des

particules LDL réduisant ainsi leur affinité pour le LDLR (Vegas and Grundy., 1986). Quelques années plus tard, Innerarity et son équipe ont pu identifier l'apoB-100 comme une cause principale du défaut de liaison au LDLR. Les mutations de l'apoB-100 caractérisent un type particulier de HF connue sous le nom de «*Familial defective apo B-100*» (FDB), dans laquelle l'apoB-100 est incapable de lier le LDL ce qui cause une accumulation de LDL-c dans la circulation (Innerarity *et al.*, 1978).

La première mutation du type FDB, la R3500Q, a été identifiée en séquençant deux allèles de l'apoB provenant des patients appartenant à trois familles différentes (Sorica *et al.*, 1989). En 1995, deux autres mutations ont été décrites comme cause de la FDB; la R3500W et la R3531C (Gaffney *et al.*, 1995). La fréquence estimée de la mutation R3500Q est de 1:500 à 1:700 en Amérique du nord et en Europe alors que les mutations R3500W et R3531C sont moins fréquentes. Récemment, la mutation H3543Y a été identifiée comme une nouvelle mutation associée à la FDB avec une prévalence quatre fois plus élevée en Allemagne (De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

7.2.3. La proprotéine convertase subtilisine / kexine de type 9 (PCSK9)

PCSK9 a été identifiée pour la première fois comme un membre de la famille des proprotéines convertases exprimé au niveau du foie, des intestins et au niveau des reins (Seidah *et al.*, 2003). Les mutations S127R, P216L, D374Y et N157K touchant le gène qui code pour PCSK9 permettent une activation accrue de la protéine (un gain de fonction) responsable de la diminution du niveau du LDLR et l'augmentation de l'incidence de l'ADH (Abifadel *et al.*, 2003). Les mutations affectant PCSK9 ont été également classées en différentes classes, y compris «les allèles nulles», les mutations qui affectent le transport des protéines à travers le RE, des mutations qui affectent la stabilité de PCSK9 et enfin les mutations de gain de fonction (Cameron *et al.*, 2006). Les mutations responsables de la perte de fonction de la protéine PCSK9 sont fortement associées à la diminution des niveaux de LDL-c telles que les mutations Y142X, C679X et R46L (Cohen *et al.*, 2005; Hobbs *et al.*, 2006).

7.3. Gènes impliqués dans l'hypercholestérolémie autosomale récessive (HAR)

Une deuxième forme d'hypercholestérolémie, l'hypercholestérolémie autosomale récessive (HAR), a été identifiée mais elle n'était pas due ni aux variations au niveau de la séquence du gène codant pour le LDLR ni pour le gène codant pour l'apoB (Zuliani *et al.*, 1999). Les lymphoblastes immortalisés chez les patients portant la HAR ont plus de molécule LDLR au niveau de la surface cellulaire, mais en dépit de l'augmentation de la liaison des particules LDL, leur dégradation semble être diminuée de -75% par rapport aux lymphoblastes chez les individus normaux (Norman *et al.*, 1999). En revanche, la fonction du LDLR est toujours normale ou modérément réduite (Zuliani *et al.*, 1999).

7.3.1. Le domaine de liaison à la phospho tyrosine (PTB) et les protéines adaptatrices

L'HAR est causée par des mutations au niveau du gène codant pour l'ARH, une protéine de liaison du domaine phospho tyrosine (PTB). Les domaines PTB se trouvent au niveau de plusieurs protéines adaptatrices pour les relier à des fonctions complexes afin d'assurer la signalisation transmembranaire et l'endocytose (Garcia *et al.*, 2001). Les domaines PTB sont capables de lier un motif de séquence canonique (NPXY) situé au niveau de la queue cytoplasmique de divers récepteurs membranaires (Davis *et al.*, 1987b). Également, la partie cytoplasmique du LDLR contient une séquence NPVY nécessaire pour son internalisation par endocytose. En effet, l'ARH fonctionne comme une protéine adaptatrice capable de lier la séquence NPVY du LDLR et déclenche l'endocytose (Garcia *et al.*, 2001). Les mutations affectant le domaine PTB de l'ARH bloquent la liaison avec le motif NPVY situé au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur, et elles bloquent par conséquent l'endocytose (Bansal *et al.*, 1991). D'après la littérature, les cellules provenant des patients porteurs de la forme homozygote de la HF sont incapables de lier les particules LDL *via* le LDLR. Par contre, les cellules porteuses de la mutation D.J (provenant d'un patient dont les initiales sont D.J) étaient capables de lier les particules LDL mais elles échouaient leur internalisation. Les études moléculaires ont montré que la mutation D.J résulte de la substitution d'une tyrosine par une cystéine dans le domaine cytoplasmique du LDLR (Lerhman *et al.*, 1985). Cette observation a été suivie par une série d'expériences de mutagenèse *in vitro* qui ont révélé que la tyrosine en question fait

partie du tétramère NPVY (Asn-Pro-Val-Tyr) qui dirige le LDLR vers les puits recouverts (mantelés) de clathrine pour son internalisation ultérieure (Chen *et al.*, 1990).

7.4. Diagnostic de la HF

Les critères cliniques utilisés afin d'identifier les patients atteints de la HF comprennent les niveaux élevés des particules LDL-c plasmatiques ($>0,7$ mmol/dl), les antécédents familiaux de HF particulièrement chez les enfants, le dépôt de cholestérol au niveau des tissus extravasculaires et les antécédents de MCV prématurées. Les patients atteints de la forme hétérozygote de la HF présentent des taux élevés de LDL-c (environ deux fois plus qu'un individu normal), allant de 4,9 à 10,3 mmol/dl. Les niveaux de TG sont généralement normaux mais ils peuvent augmenter chez certains patients. Cette augmentation pourrait être due à un défaut d'ordre génétique ou à des facteurs environnementaux (alcool, surpoids et diabète sucré) (Goldstein *et al.*, 2001). Également, les xanthomes tendineux sont observés dans la HF ; leur identification n'est pas toujours facile car ils sont considérés comme des marqueurs de diagnostic insensibles vu leur forte variabilité chez les patients atteints de la HF (Descamps *et al.*, 2001). Depuis 2004, une plateforme de génétique moléculaire appelée Lipo-chip (Progenika-Biopharma, Derio, Espagne) a été développée pour le diagnostic de la HF. Elle permet la détection des mutations au niveau des gènes codant pour le LDLR et l'apoB (Tejedor *et al.*, 2005). Cette plateforme a permis la caractérisation génétique d'environ 5000 patients en Espagne. Même si le diagnostic de la HF basé sur la détection d'une mutation fonctionnelle au niveau du gène du LDLR ou de l'apoB est la procédure recommandée dans la plupart des cas de la FH, il ne pourrait pas être recommandé pour tous les cas d'hypercholestérolémie à cause de la complexité et le coût des tests génétiques. Pour ces raisons, le diagnostic clinique reste toujours le choix le plus important (Civeira., 2004).

8. Approches thérapeutiques pour contrôler le niveau du cholestérol sanguin

Présentement, plusieurs classes de médicaments hypolipémiants sont utilisées pour diminuer le niveau de LDL-c plasmatique. Ces médicaments sont classés selon leur mécanisme d'action, leur type de modification du profil lipidique et le type de lipoprotéines

qu'ils affectent. Ils englobent les statines, les fibrates, les résines échangeuses d'anions et l'acide nicotinique.

8.1. Les statines

Les statines sont les médicaments de premier choix pour le traitement des patients atteints de maladies coronariennes à travers le monde. Ces inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) ont révolutionné le traitement de l'hypercholestérolémie et des MCV depuis plus de 30 ans. Les statines sont les agents les plus efficaces permettant la réduction du taux de cholestérol plasmatique (LDL-c) (Vaughan *et al.*, 2000), de plus, elles stimulent la synthèse des particules HDL-c (Stancu and Sima., 2001). Ces médicaments ciblent préférentiellement les hépatocytes et inhibent la synthèse des précurseurs de cholestérol par la HMG-CoA en modifiant sa conformation ce qui l'empêche d'avoir une structure fonctionnelle et bloque la fixation du substrat normal au niveau de son site actif (Corsini *et al.*, 1999). Parmi les statines disponibles actuellement sur le marché et utilisées en clinique on trouve : la lovastatine (Mevacor), la pravastatine (Lipostat, Pravachol), la simvastatine (Zocor), la fluvastatine (Lescol) et l'atorvastatine (Sortis, Lipitor). Lors du traitement, l'atorvastatine, la fluvastatine et la pravastatine sont administrées sous leur forme active (la forme acide) alors que la lovastatine et la simvastatine deviennent actives après hydrolyse enzymatique (Blumenthal., 2000) (**Figure 9**).

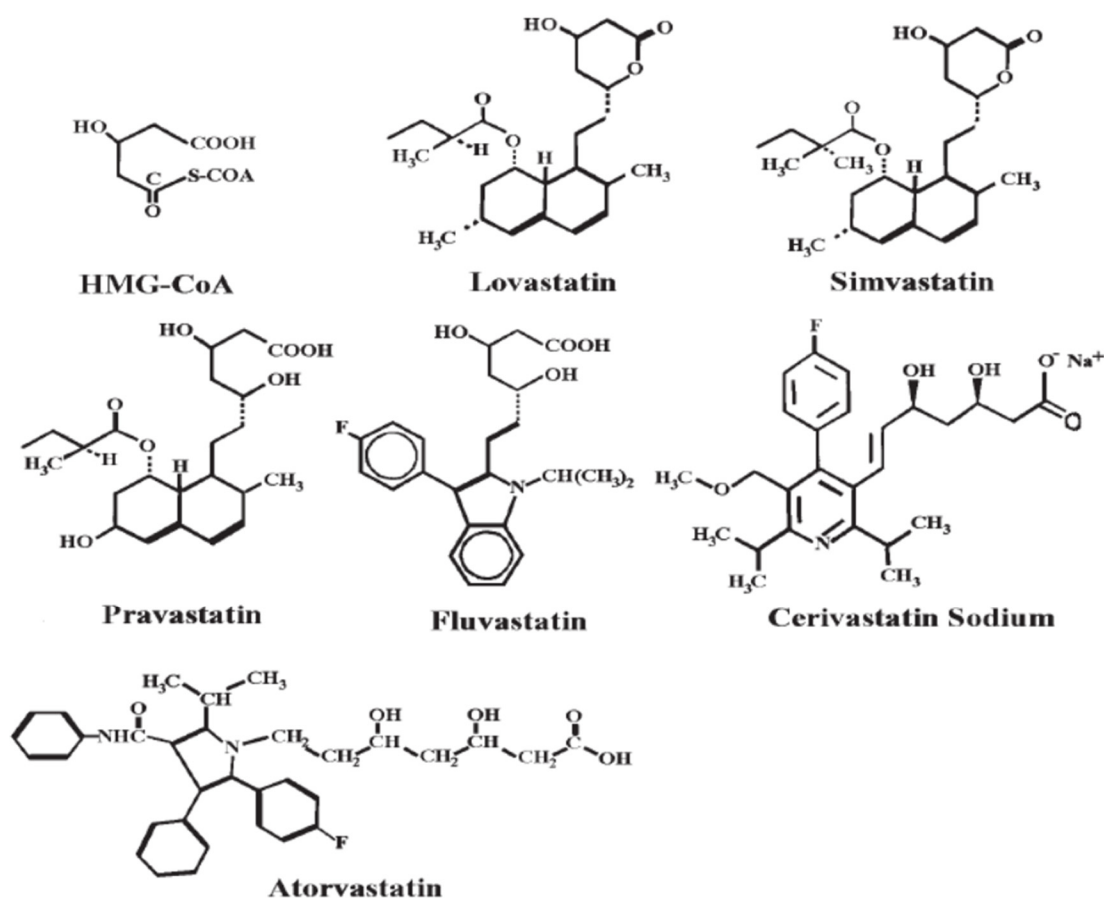


Figure 9 : Structure chimique de la HMG-CoA et de différentes classes des statines (Source : Stancu et Sima., 2001).

8.2. Les résines échangeuses d'anions

Les résines échangeuses d'anions interagissent au niveau de l'absorption du cholestérol à partir de l'intestin. Elles sont capables de réduire le niveau de LDL-c de 10 à 15 % mais elles ne présentent aucun effet sur le HDL-c. Le cholestyramine et le colestipol sont les résines échangeuses d'anions les plus testées. Le principal inconvénient de cette technique consiste à la faible tolérance des patients traités qui se manifeste par des effets secondaires au niveau gastro-intestinal (Black., 2002).

8.3. L'acide nicotinique

L'acide nicotinique permet de diminuer les taux de LDL-c et de TG de 15% et 25% respectivement. Jusqu'à présent, l'acide nicotinique est considéré comme étant l'agent le

plus puissant en clinique, après les statines, permettant une forte augmentation du niveau de HDL-c. La combinaison de l'acide nicotinique avec les statines est très efficace surtout dans le cas des patients ayant un niveau faible de HDL-c, cependant quelques effets secondaires tels que le «*flushing*» (Brown *et al.*, 2001).

8.4. Les fibrates

Les fibrates agissent par activation du PPAR- α dans plusieurs tissus tels que les muscles et le foie. Ils diminuent principalement la sécrétion hépatique de VLDL et des TG plasmatiques (Barter and Rye., 2006). L'activation de la voie de signalisation de PPAR par les fibrates entraîne l'activation des lipases et par conséquent l'augmentation de la clairance de VLDL. Il en résulte également l'augmentation du taux de HDL dans le sérum. Bien que les événements cardiovasculaires aient été réduits dans certains essais cliniques, les fibrates restent toujours moins efficaces que les statines (Frick *et al.*, 1987).

8.5. Les inhibiteurs de l'absorption du cholestérol

L'ézetimibe, inhibiteur du transporteur de cholestérol intestinal (NPC1L1), est le médicament le plus important dans ce groupe. Ce composé n'agit pas seulement par inhibition de l'absorption du cholestérol à partir de l'intestin mais il agit également au niveau de l'élimination du cholestérol par la bile. L'ézetimibe réduit le niveau du LDL-c d'une moyenne de 18%. Il est souvent prescrit pour une utilisation combinée avec les statines (Bays and Neff., 2008).

II. Le récepteur de lipoprotéines de basse densité (LDLR)

1. Historique

En 1972, deux professeurs adjoints en médecine à l'Université du Texas «*Southwestern Medical Center*» à Dallas, Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein, ont axé leur recherche sur l'élucidation des causes de la maladie de la HF, caractérisée par une concentration de cholestérol dans le sang beaucoup plus élevée que chez les individus normaux et une incidence de MCV à un très jeune âge (Goldstein and Brown., 2009).

Brown et Goldstein ont focalisé leurs travaux sur l'activité de l'HMG-CoA reductase au lieu de mesurer la synthèse du cholestérol à partir de l'acétate. Les études faites sur des fibroblastes humains normaux cultivés en présence de sérum ont montré une très faible activité de la HMG-CoA réductase. Par contre, quand les particules de LDL-c ont été retirées du milieu de culture, l'activité de la HMG CoA réductase a été augmentée de 50 fois pendant 24 heures (Brown *et al.*, 1973).

Brown et Goldstein ont noté que la HMG-CoA réductase a été inhibée seulement suite à l'ajout du LDL et non du HDL dans le milieu. Cette spécificité s'est avérée être le premier indice suggérant qu'un récepteur à haute affinité pourrait être impliqué. Le deuxième indice était l'importance des particules LDL dans le milieu même à des concentrations faibles (5 µg de protéines par ml, soit $\sim 10^{-9}$ M). L'idée d'élucider les mécanismes impliquant les récepteurs des particules LDL a émergé en 1973 lors de l'étude des cellules de patients porteurs de la forme homozygotes de la HF. Brown et Goldstein ont remarqué qu'en présence du sérum, l'activité de la HMG-CoA réductase a été augmentée de 50 à 100 fois en comparant avec les cellules cultivées sans sérum. Par contre, ils ont remarqué que cette activité n'a pas augmenté de manière significative lorsque les lipoprotéines ont été retirées du milieu de culture. Également, ils ont constaté que chez les patients ayant la forme homozygote de la HF, les particules de LDL-c n'étaient pas éliminées du milieu (Goldstein and Brown., 1973).

L'existence du LDLR a été officiellement démontrée en 1974 par Brown et Goldstein grâce au marquage des particules LDL avec de l'iode-125 (125-I). Les deux chercheurs ont constaté que les cellules normales contenaient plus de sites de liaison des molécules 125-I-LDL que les cellules portant la forme homozygote de la HF (Goldstein and Brown.,

1974). À l'aide de nouvelles techniques, les résultats ont rapporté que les particules LDL liées au récepteur LDL restaient à la surface cellulaire pendant une période de 10 minutes en moyenne puis la plupart d'entre-elles entraient dans les cellules. Au cours des 60 minutes supplémentaires, la composante protéique de 125-I-LDL était complètement digérée en acides aminés et le 125-I, initialement attaché aux résidus de tyrosine des particules LDL, était libérée dans le milieu de culture comme du 125-I-monoiodotyrosine (Goldstein and Brown., 1974 ; Goldstein and Brown., 1976). Le LDLR a été purifié pour la première fois à partir des glandes surrénales chez les bovins en 1982 (Schneider *et al.*, 1982). Le clonage de l'ADNc humain du récepteur a été réalisé en 1984 (Yamamoto *et al.*, 1984) et le gène a été isolé en 1985 (Sudhof *et al.*, 1985).

2. Structure du récepteur LDL

Le récepteur LDL est synthétisé sous forme d'une protéine de 120 KDa. Après glycosylation, le récepteur mature de 150 KDa atteint la membrane cellulaire puis, il est dirigé vers les puits revêtus de clathrines pour lier les lipoprotéines riches en apoB et apoE *via* son domaine extracellulaire. Après endocytose, le complexe migre vers l'endosome où les particules LDL sont libérées à pH acide et ensuite dégradées dans le lysosome et le LDLR retourne à la membrane cellulaire pour entrer dans un nouveau cycle (De Kastro-Oros *et al.*, 2010) (**Figure 5**).

Le gène codant pour le LDLR est situé sur le chromosome 19p13.1-13.3, il s'étend sur 45000 paires de bases et code pour une glycoprotéine transmembranaire omniprésente de 839 acides aminés (Goldstein and Brown., 1974). Il contient 18 exons et 17 introns codant pour les six domaines fonctionnels de la protéine maure; le peptide signal, le domaine de liaison aux ligands, le précurseur du facteur de la croissance épidermique «*EGF-like*», le domaine de liaison du sucre «*O-linked sugar*», le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (De Kastro-Oros *et al.*, 2010) (**Figure 10**).

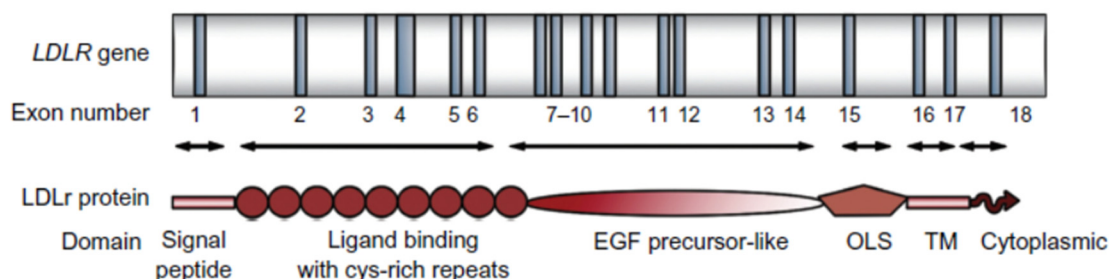


Figure 10 : Structure du récepteur LDL (Source : De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

L'exon numéro 1 code pour le peptide signal, une séquence hydrophobe de 21 acides aminés qui subit un clivage et se détache de la protéine pendant sa translocation dans le RE. Jusqu'à aujourd'hui, 79 variants ont été décrits dans cet exon (4,6% de tous les variants déjà décrits) (De Kastro-Oros *et al.*, 2010). Les exons 2, 3, 4, 5 et 6 codent pour le domaine de liaison au ligand et ils contiennent 40 acides aminés répétés sept fois en tandem. Dans chaque séquence de 40 acides aminés, il existe un groupe d'acides aminés à charge négative, Asp-X-Ser-Asp-Glu et six résidus de cystéine pour former les trois ponts disulfures obligatoires (Aengevaeren *et al.*, 1996). La liaison des lipoprotéines au LDLR semble être médiée par l'interaction entre les résidus acides dans le domaine de liaison du LDLR et les résidus basiques de l'apoE et de l'apoB-100 (Esser *et al.*, 1988). Toute délétion au niveau des séquences répétées (de la 3ème (R3) à la 7ème séquence (R7)) inhibe l'interaction du LDLR avec l'apoB-100 des particules LDL. Par contre, les séquences R4 et R5 sont suffisantes pour la liaison du récepteur à l'apoE (Fisher *et al.*, 2004). Récemment, un nouveau mécanisme de libération des particules LDL dans l'endosome a été identifié. Il se base sur l'instabilité de la séquence R5 quand le pH et la teneur en Ca^{2+} sont faibles dans l'endosome. Dans ces conditions, la R5 devient incapable de lier le Ca^{2+} et apparaît sous une conformation dépliée l'empêchant de se lier aux particules LDL. À ce jour, 693 variants alléliques ont été identifiés dans cette région (Arias-Moreno *et al.*, 2008). Le deuxième domaine du récepteur LDL humain contient une séquence de 411 acides aminés codée par les exons 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14. Cette séquence est caractérisée par 33% d'homologie avec le facteur de la croissance épidermique humain (EGF) «EGF-like». Tout comme le domaine de liaison au ligand, cette région contient trois répétitions de 40 à 50 acides aminés avec des séquences riches en cystéine (De Kastro-Oros *et al.*, 2010). De

plus, elle contient un segment de tétrapeptides (tyrosine-tryptophane-thréonine-aspartique (YWTD)) (Davis *et al.*, 1987b). Ce domaine semble être important pour la dissociation des particules LDL du récepteur et des vésicules de clathrines dans l'endosome (Davis *et al.*, 1987a; De Kastro-Oros *et al.*, 2010). Le troisième domaine du LDLR est constitué d'une région de 58 acides aminés riche en résidus thréonine et sérine codée par l'exon numéro 15. La fonction de ce domaine est encore inconnue et sa délétion n'avait aucun effet sur la fonction du récepteur dans les fibroblastes en culture. Cette séquence pourrait être impliquée dans la stabilisation du récepteur. Actuellement, 41 variants alléliques de l'exon 15 ont été enregistrés dans la base de données du récepteur LDL (<http://www.ucl.ac.uk/ldlr>). Concernant le domaine transmembranaire du LDLR, il est codé par l'exon 16 et par la fin 5' de l'exon 17 et il contient 22 acides aminés hydrophobes. Ce domaine est nécessaire pour ancrer le récepteur à la membrane cellulaire. La séquence cytoplasmique du récepteur est codée par le reste de la région 3' de l'exon 17 et par la fin 5' de l'exon 18 et elle contient 50 résidus d'acides aminés. Le domaine cytoplasmique est caractérisé par la présence de deux séquences signales asparagine-proline-x-tyrosine (NPxY) qui jouent un rôle clef dans la localisation du récepteur au niveau de la surface cellulaire et dans les vésicules de transport. C'est la région la plus conservée du récepteur LDL (Dudley *et al.*, 2002; De Kastro-Oros *et al.*, 2010).

L'organisation structurale du récepteur LDL a permis de le classer dans une famille de protéines ayant certaines homologues au niveau de la structure. Le LDLR montre beaucoup d'homologies structurelles avec les protéines liant les particules LDL «*Low-density lipoprotein receptor-related protein*» LRP-1 et LRP-2 et moins d'homologies avec d'autres membres plus éloignés tels que LRP-3, 4, 5, 6 et 9 et 11 (Dudley *et al.*, 2002) (**Figure 11**).

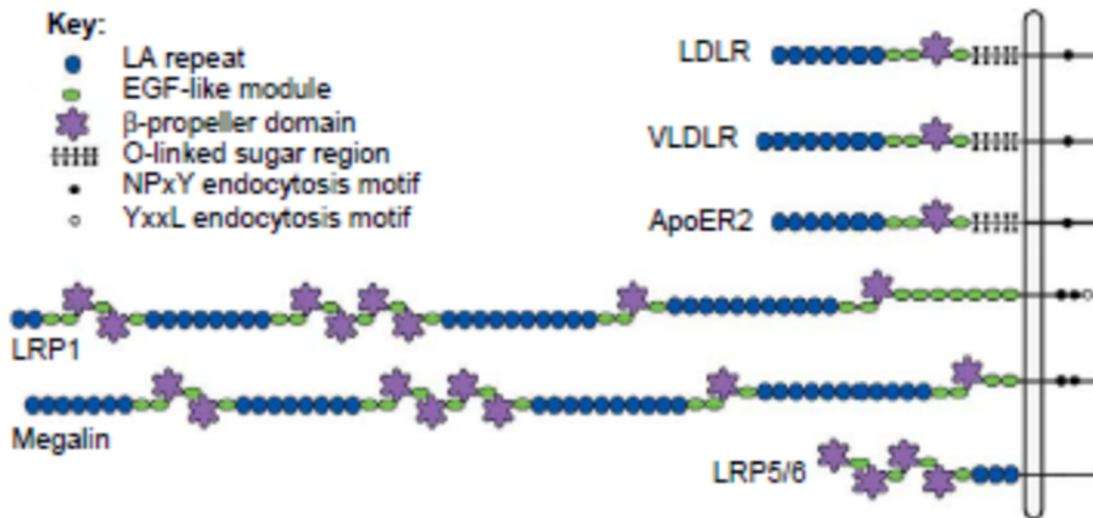


Figure 11 : L'homologie de structure des membres de la famille du récepteur LDL
(Source : Beglova et Blacklow., 2005).

3. Internalisation du LDLR: Origine du concept de l'endocytose

L'internalisation des particules LDL liées au récepteur LDL implique un mécanisme spécial pour les transporter de la surface cellulaire vers le lysosome connue sous le terme endocytose. Ce processus d'internalisation cellulaire a été démontré par cinématographie des cellules phagocytaires dans les années 1930 et il est apparu universellement dans les années 1950 grâce à la technique de microscopie électronique de Palade. Avant 1975, l'endocytose était considérée comme un processus non spécifique qui transporte les molécules en vrac vers l'intérieur des cellules. Pour s'assurer de l'implication de l'endocytose dans l'absorption des particules LDL *via* le LDLR, Brown et Goldstein en collaboration avec Richard G.W. Anderson ont employé des particules LDL couplées à la ferritine (LDL-Ferritine). Grâce aux résultats obtenus, ils ont constaté que l'efficacité de l'absorption dépendait de la formation des puits recouverts (puits mantelés) de clathrine et de vésicules d'endocytose (Anderson *et al.*, 1976).

III. La régulation du récepteur LDL

1. Régulation transcriptionnelle du LDLR

1.1. Les protéines de liaison aux éléments régulateurs de stérol (SREBPs)

Le cholestérol est connu depuis longtemps pour son rôle primordial dans la modulation de la fluidité de la membrane plasmique des cellules animales. Pour assurer cette fonction, le cholestérol membranaire doit être maintenu à un niveau constant (Deaux., 1993). En effet, l'homéostasie du cholestérol est médiée par un système de rétrocontrôle qui détecte le niveau de cholestérol constituant la membrane cellulaire et module par conséquent la transcription des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse du cholestérol et l'absorption des lipoprotéines plasmatiques (Brown and Goldstein., 1997). Donc, comment une cellule mesure-t-elle le niveau de cholestérol dans ses membranes et comment cette information est-elle transmise au noyau pour réguler la transcription des gènes ?

La première réponse a été rapportée en 1993 par l'équipe de Yokoyama et ses collaborateurs quand ils ont isolé le régulateur clé de l'homéostasie du cholestérol. Ils ont identifié le facteur de transcription appartenant à la famille des protéines de liaison aux éléments régulateurs de stérol «*Sterol Regulatory Element-binding Protein-1*» (SREBP-1) comme un modulateur clé de l'homéostasie de cholestérol (Yokoyama *et al.*, 1993). SREBP-1 a été premièrement isolé à partir du noyau des cellules dépourvues de cholestérol (Wang *et al.*, 1993) et la protéine purifiée avait une masse moléculaire d'environ 60 KDa. Le résultat du clonage de l'ADNc de SREBP était surprenant parce qu'il a montré que la protéine purifiée à partir du noyau ne présente qu'un seul segment de la protéine totale ayant 125 KDa de masse moléculaire (Yokoyama *et al.*, 1993).

1.2. L'activation de SREBP par une cascade protéolytique

Les facteurs de transcription SREBPs sont des protéines ayant trois domaines d'environ 1,150 acides aminés liés à la membrane du RE et à l'enveloppe nucléaire dans une conformation en épingle à cheveux. Les domaines NH₂ et COOH- terminaux de 480 et 590 acides aminés, respectivement, sont projetés dans le cytosol et ancrés à la membrane du RE par un domaine central de 80 acides aminés. Grâce à son domaine NH₂-terminal, SREBP est classé parmi les membres de la famille des facteurs de transcription appelée

«*basic-helix-loop-helix-leucine zipper family*» (bHLH-ZIP), ayant le motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH-Zip) (Brown and Goldstein., 1997). L'extrémité NH₂ contient une séquence d'acides aminés responsable du recrutement des coactivateurs transcriptionnels (Naar *et al.*, 1998). Le motif bHLH-Zip est impliqué dans l'entrée dans le noyau et la liaison à l'ADN. La substitution de l'arginine, qui caractérise ce motif, en tyrosine permet aux SREBPs de reconnaître des segments spécifiques de l'ADN appelés «*Sterol regulatory elements*» (SRE) (Kim *et al.*, 1995), initialement identifiés au niveau des séquences «*enhancers*» des gènes codant pour le LDLR et pour la HMG-CoA (Smith *et al.*, 1988).

Après l'étape de traduction, le facteur de transcription SREBP se lie, grâce à son domaine COOH-terminal, à une protéine membranaire du RE appelée «*SREBP Cleavage Activating Protein*» (SCAP) (Hua *et al.*, 1996 ; Sakai *et al.*, 1998a). La boucle cytosolique de SCAP contient une séquence de six acides aminés permettant sa liaison à un complexe de protéines appelé COPII (Sun *et al.*, 2007). Ce dernier forme des vésicules de transport du complexe SCAP/ SREBP vers l'appareil de Golgi. À ce niveau, SREBP subit deux clivages protéolytiques successifs par les protéases site-1 protéase (S1P) et site-2 protéase (S2P). La S1P est une serine protéase liée à la membrane et qui clive SREBP dans la boucle luminale (Sakai *et al.*, 1998b). Ce premier clivage engendre deux segments de SREBP où le domaine NH₂-terminal reste lié à la membrane. Le deuxième clivage est effectué par la métalloprotéase S2P (Rawson *et al.*, 1997). La S2P clive la moitié NH₂-terminale de SREBP en libérant par conséquent le segment cytosolique actif pour la transcription afin qu'il puisse entrer dans le noyau pour activer la machinerie transcriptionnelle des gènes tels le récepteur LDL (Brown *et al.*, 2000) (**Figure 12**).

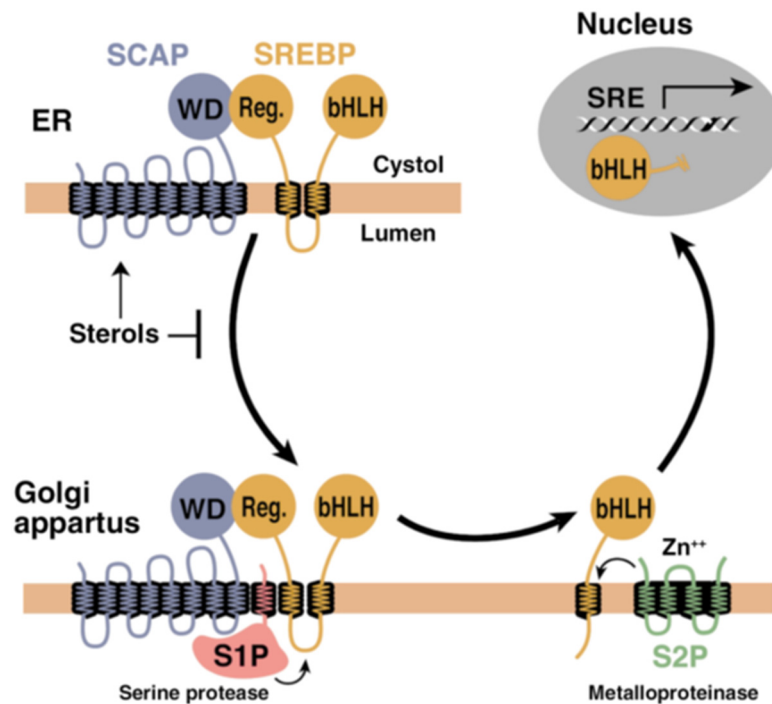


Figure 12: Clivage protéolytique du facteur de transcription SREBP
(Source : Brown and Goldstein., 2008).

1.3. SREBP : deux gènes, trois protéines

Actuellement, trois isoformes de SREBP sont connus. Les isoformes SREBP-1a et SREBP-1c qui sont le produit du même gène, ils ont été clonés à partir des cellules humaines et de souris (Yokoyama *et al.*, 1993). Par contre, le troisième isoforme, SREBP-2, est codé par un autre gène distinct (Hua *et al.*, 1995) (**Figure 13**).

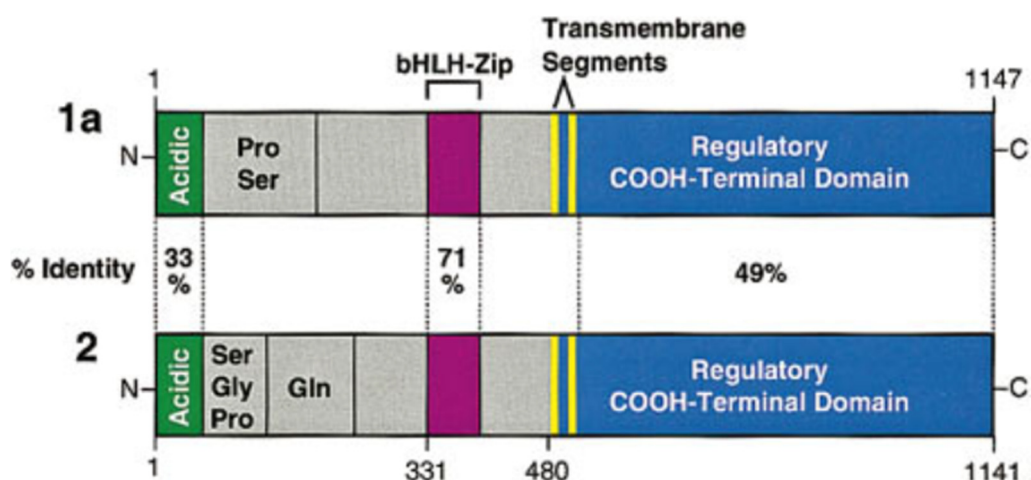


Figure 13 : Structures de SREBP-1a et SREBP-2 humains. La séquence de SREBP-1c (non représentée) est identique à celle de SREBP-1a à l'exception du domaine NH2-terminal (24 acides aminés dans SREBP-1c et 42 acides aminés dans SREBP-1a) (Source : Brown and Goldstein., 1997).

1.4. La voie de SREBP : SCAP en tant que capteur de stérol

La première avancée dans la compréhension du mécanisme régulant SREBPs a été réalisée grâce à l'isolement de l'ADNc codant pour une protéine activatrice du clivage de SREBP appelée SCAP. Cette protéine régulatrice est nécessaire pour le premier clivage effectué par S1P (Hua *et al.*, 1996). Elle s'agit d'une protéine membranaire de 1276 acides aminés avec deux domaines différents ; un domaine NH2-terminal de 730 acides aminés, caractérisé par l'alternance de séquences hydrophiles et hydrophobes (Nohturfft *et al.*, 1998). Ce domaine ancre SREBP dans la membrane du RE. Elle possède également un domaine COOH-terminal de 550 acides aminés qui se projette dans le cytosol et contient cinq séquences WD de 40 acides aminés de longueur chacune. Ces séquences interviennent souvent au niveau des interactions protéines- protéines (Neer *et al.*, 1994). L'association de SREBP et de SCAP est due à l'interaction entre le domaine régulateur COOH-terminal de SREBP et le domaine WD de SCAP. La formation de ce complexe est nécessaire pour que le premier clivage de SREBP puisse avoir lieu. En effet, le complexe SCAP-SREBP est le véritable substrat pour la protéase S1P (Sakai *et al.*, 1997).

Les expériences réalisées par Axel Nohturfft dans lesquelles il a étudié la glycosylation de SCAP ont montré que dans les cellules dépourvues de stérols, les sucres liés aux atomes de nitrogène deviennent résistants à l'endoglycosidase H. Par contre dans le cas inverse,

ils restent toujours dans une forme sensible (Nohturfft *et al.*, 1998). Ces expériences ont fourni la première preuve que le complexe SCAP/SREBP se déplace du RE vers l'appareil de Golgi d'une manière sensible aux stérols puisque la résistance à l'endoglycosidase H nécessite le traitement des glucides dans l'appareil de Golgi (Nohturfft *et al.*, 2000).

1.5. La voie de SREBP : Identification de INSIG

Bien que les mécanismes cellulaires de régulation par le stérol fussent bien élucidés, les connaissances des mécanismes moléculaires étaient peu connues. L'équipe de Yang et ses collaborateurs, avait remarqué l'absence de la régulation du stérol en sur-exprimant la protéine SCAP dans les cellules par transfection. Grâce à cette observation, ils avaient suggéré la présence d'une protéine de rétention de SCAP au niveau de la membrane de RE en présence de stérols. Lorsque SCAP est surexprimée, la protéine de rétention devient saturée et l'excès de SCAP se déplace vers l'appareil de Golgi même en présence de stérols (Yang *et al.*, 2000). Les résultats de co-immunoprécipitation de la protéine SCAP en présence de stérols ont montré l'interaction de SCAP avec une protéine nommée «*Insulin induced gene*» (INSIG) (Diamond *et al.*, 1993).

Finalement, les différents morceaux du puzzle ont été rassemblés afin d'élucider le mécanisme de régulation de la SREBP. Le processus commence par la détection du niveau du cholestérol par la protéine SCAP grâce à sa localisation membranaire et son domaine SRE (Radhakrishnan *et al.*, 2004). L'augmentation du niveau de cholestérol dans le RE au-dessus de 5% des lipides totaux permet sa liaison avec la première boucle luminale de la protéine SCAP (Motamed *et al.*, 2011). Cette liaison déclenche par la suite un changement de conformation au niveau de la sixième boucle luminale qui entoure le site de liaison des protéines COPII. Grâce à cette nouvelle conformation, SCAP se lie à INSIG qui l'empêche de lier les protéines COPII. Par conséquent, le complexe SCAP/SREBP reste piégé dans le RE ce qui empêche son transport vers l'appareil de Golgi et diminue la transcription de certains gènes tels que le gène codant pour le LDLR. La transcription ne s'active que lorsque le niveau de cholestérol dans le RE diminue et le complexe SCAP/SREBP puisse lier les protéines COPII (Sun *et al.*, 2007) (**Figure 14**).

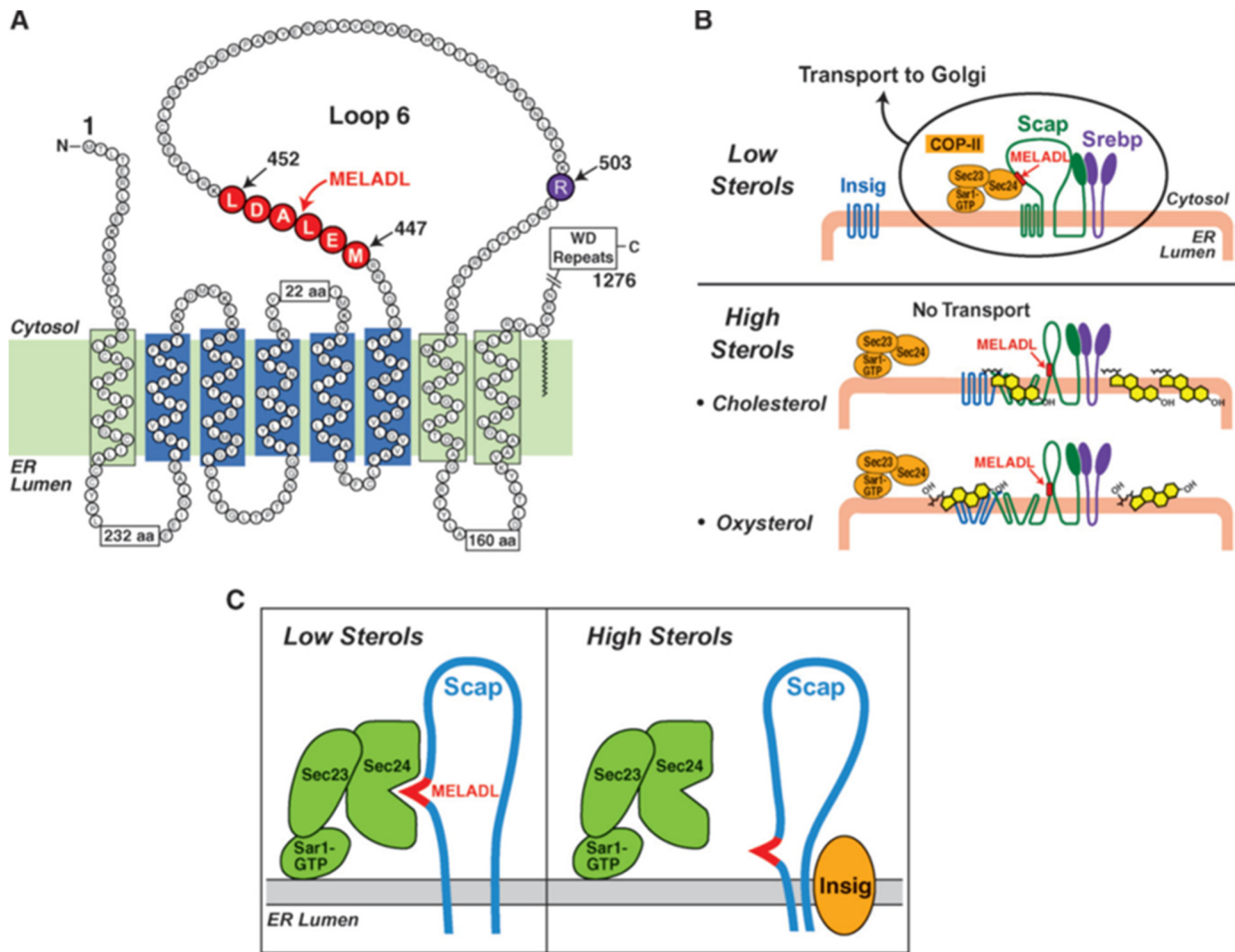


Figure 14 : Mécanismes de modification de la conformation de SCAP en présence de stérols et l'inhibition du transport de SREBP du RE vers l'appareil de Golgi. **A)** La séquence en acides aminés et la topologie du domaine membranaire de SCAP, le domaine de détection de stérol et représenté en bleu, la séquence d'acides aminés 447-452 représentée en rouge représente le domaine peptidique MELADL qui lie SCAP aux COPII. **B-C)** Liaison différentielle du cholestérol et des oxystérols à SCAP et INSIG, respectivement. Lorsque la concentration de cholestérol dans la membrane du RE est faible, le peptide MELADL dans la boucle 6 de Scap se lie au complexe (Sar1 / Sec23 / Sec24) de COPII. Cette liaison permet la séquestration du complexe SCAP/SREBP dans les vésicules de COPII et le transport vers l'appareil de Golgi. Le cholestérol et les oxystérols favorisent la liaison SCAP-INSIG par différentes façons. Le cholestérol se lie directement à SCAP puis il déclenche la liaison de SCAP à INSIG alors que les oxystérols se lient directement à INSIG puis ils déclenchent la liaison de INSIG à SCAP. Dans les deux cas, le résultat final est un changement de conformation de la sixième boucle cytoplasmique de SCAP qui empêche les protéines COPII d'accéder à la séquence MELADL (Source : Brown et Goldstein., 2009).

2. Régulation post-traductionnelle du LDLR

2.1. La proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)

PCSK9 a été identifiée pour la première fois en 2003 par le groupe du Dr. Nabil Seidah comme une protéine importante pour la régénération hépatique et la différenciation neuronale. Elle a été initialement considérée comme une convertase impliquée dans la régulation du processus apoptotique au niveau des neurones d'où son nom initial «*Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1*» (NARC-1) (Seidah *et al.*, 2003). Parallèlement, elle a été identifiée comme étant un gène régulé par SREBP2 et le cholestérol ester (Horton *et al.*, 2004) et comme le troisième gène impliqué dans l'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH) (Abifadel *et al.*, 2003).

2.1.1. Structure de PCSK9

PCSK9 est le neuvième membre de la famille des protéines convertases. Elle appartient à la famille des protéases à sérine de type subtilisine qui peut être divisée en deux sous familles ; la S8A et la S8B (Rawlings *et al.*, 2008). PCSK9 diffère des autres membres de la famille des subtilisines par sa structure et ses spécificités autocatalytiques. Typiquement, ces protéines ont la capacité de couper leurs substrats ce qui entraîne leur activation ou leur inactivation. Les protéines appartenant à ces deux sous-familles contiennent un pro-domaine de type subtilisine et un domaine catalytique. La sous-famille S8B comprend les enzymes de clivage couplées aux acides aminés basiques : la furine (PCSK3), les protéines convertases PCSK1, PCSK2, PCSK4, PCSK5 (également connue sous le nom de PCSK6/ PACE4) et PCSK7 / PCSK8. Les sept membres de la sous-famille S8B ont des similarités structurales caractérisées par la présence du domaine P au niveau de la partie C terminale et catalytiques qui consistent au clivage du substrat après les résidus basiques. Néanmoins, l'isoenzyme-1 de subtilisine kexine (SKI-1, également appelé Site-1-protease, S1P) et PCSK9 appartiennent à la sous-famille S8A mais elles ne possèdent pas de domaine P nécessaire pour la régulation de l'activité protéase des autres proprotéines convertases. En plus, elles séparent leurs substrats après des résidus non basiques. PCSK9 contient une séquence signal (les 30 acides aminés N-terminaux), suivie d'un pro-domaine (acides aminés 31-152), un domaine catalytique (acides aminés 152-425) et une longue séquence C-terminale de 279 acides aminés (Costet *et al.*, 2008) (**Figure 15**).

PCSK9 diffère de toutes les autres protéines convertases parce qu'elle n'a qu'un seul substrat, son propre pro-domaine (Seidah *et al.*, 2008).

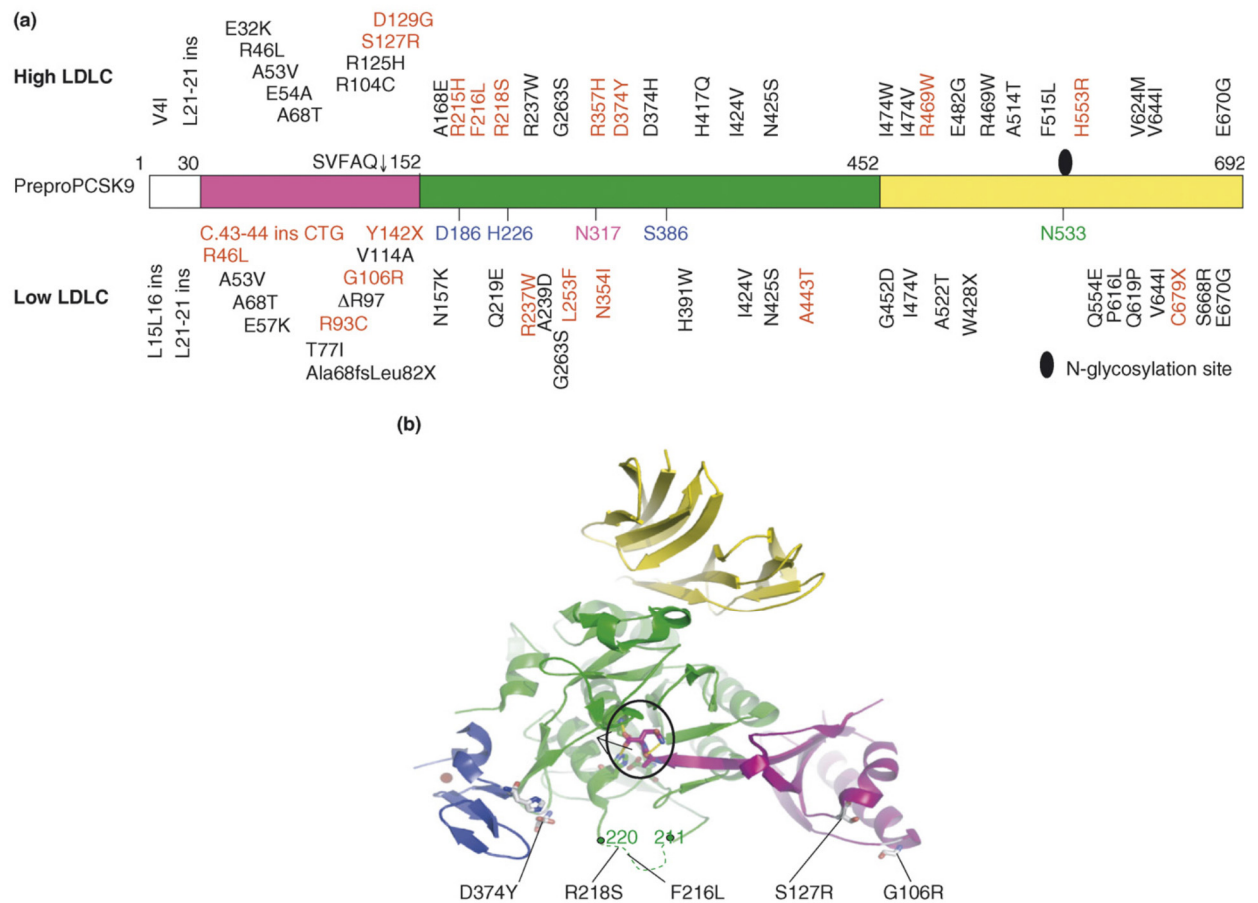


Figure 15: Variations des séquences de PCSK9, **a)** La po-protéine PCSK9 (préproPCSK9) contient un peptide signal (blanc) suivi d'un domaine pro-domaine (rose), d'un domaine catalytique (vert) et d'un domaine C-terminal (jaune). **b)** Structure cristalline de PCSK9 (Source : Costet *et al.*, 2008).

La pro-PCSK9 de 74 KDa initialement synthétisée dans le RE, subit un clivage au niveau du site VFAQ-SIP dans le RE (Naureckiene *et al.*, 2003) et les fragments de 14 KDa (pro-domaine) et de 60 KDa (domaine catalytique) résultants sortent de la cellule *via* la voie de sécrétion constitutive (Benjannet *et al.*, 2004). Le pro-domaine (14 KDa) reste lié à la protéine mature (63 KDa) pendant son transport à travers les voies de sécrétion, et donc, la

protéine est sécrétée sous une forme inactive. PCSK9 diffère de la plupart des protéines convertases par son site de clivage (Val-Phe-Ala-Gln/Ser-Ile-Pro) (Basak., 2005) et par un clivage auto-catalytique calcium-indépendant. Avant d'être sécrétées, PCSK9 et son pro-domaine subissent une sulfatation des résidus tyrosine dans le complexe de Golgi. Généralement, une telle modification post-traductionnelle permet d'améliorer les interactions protéines-protéines (Benjannet *et al.*, 2004). PCSK9 purifiée reste liée à son pro-domaine ce qui rend son site catalytique inaccessible contrairement aux pro-protéines convertases classiques qui contiennent un deuxième site de clivage dans leur pro-domaine permettant un accès subséquent du substrat au site catalytique (Rawlings *et al.*, 2008). Elle est caractérisée par la présence d'une triade catalytique (Ser386-His226-Asp186) similaire à celle de la protéinase K. Cependant, tant que le site catalytique de la protéine sécrétée est actif, l'extension N-terminale du pro-domaine pourrait accéder à la triade catalytique (Cunningham *et al.*, 2007).

2.1.2. Régulation de l'expression de PCSK9

Chez les souris adultes, PCSK9 est fortement exprimée au niveau du foie et aussi exprimée au niveau du cerveau, du rein et de l'intestin grêle (Tavori *et al.*, 2013). Dans certaines conditions pathophysiologiques, PCSK9 pourrait être exprimée dans d'autres types cellulaires. Par exemple, en cas de lésions vasculaires athérosclérotiques chez l'homme, PCSK9 pourrait être détectée dans des cellules musculaires lisses vasculaires (Ferri *et al.*, 2012). De même, les concentrations élevées de LDL-c oxydé induisent l'expression de PCSK9 dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (Schlüter *et al.*, 2016).

2.1.2.1. Les facteurs de transcription SREBP-2 et SREBP1c

La synthèse de PCSK9 est modulée par les facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines de liaison aux éléments régulateurs de stérol SREBP-2 et SREBP1c. Ces gènes sont les principaux activateurs des protéines impliquées dans la biosynthèse du cholestérol et dans le métabolisme des AG, respectivement (Hua *et al.*, 1993). Le promoteur proximal du gène *PCSK9* contient un élément régulateur de stérol fonctionnel qui réagit aux changements dans les concentrations de cholestérol

intracellulaire (Careskey *et al.*, 2008). Le mécanisme de régulation est le même que celui du LDLR.

2.1.2.2. Le facteur nucléaire hépatocytaire 1 α (HNF1 α)

Le promoteur proximal de PCSK9 est caractérisé par la présence d'un motif SRE-1 pour la liaison du facteur SREBP-2, d'un site SP1 et d'un site de liaison du facteur nucléaire hépatocytaire 1 α (HNF1 α). Ce facteur de transcription coopère avec SREBP-2 pour assurer la transcription basale de PCSK9 (Li *et al.*, 2009). En plus de PCSK9, HNF1 α est responsable de la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cholestérol, des acides biliaires et des lipoprotéines dans le foie (Armendariz and Krauss., 2009). Le rôle du HNF1 α dans la régulation de PCSK9 a été initialement démontré avec la berbérine (BBR), un composé naturel qui inhibe l'activation de l'expression de l'ARN messenger (ARNm) de PCSK9 par le facteur de transcription HNF1 α (Li *et al.*, 2009). Une étude réalisée par Ai *et al.* en 2012 a montré une diminution de l'expression de l'ARNm de PCSK9 d'environ 60% chez un modèle de souris souffrant du diabète de type 2 lié à l'obésité (T2D). Des analyses plus détaillées avaient révélé que l'origine de cette diminution était liée au facteur HNF1 α (Ai *et al.*, 2009).

2.1.3. Dégradation du récepteur LDL par PCSK9

Suite à sa glycosylation, le récepteur LDL mature atteint la surface cellulaire et lie l'apoB et l'apoE grâce à son domaine extracellulaire. Après endocytose, le complexe migre vers les endosomes *via* les vésicules de clathrine. L'acidification du pH endosomal entraîne la libération et la dégradation des particules LDL dans le lysosome. Quant à lui, le LDLR, retourne à la membrane cellulaire pour entrer dans un nouveau cycle (Jeon and Blacklow., 2005). La surexpression de PCSK9 a démontré que son activité visait la forme mature du LDLR (Maxwell *et al.*, 2005). A la surface des hépatocytes, PCSK9 est capable de lier le LDLR au niveau de son site EGF-A. La liaison se fait essentiellement entre les résidus 367-381 du domaine EGF-A du LDLR et les résidus Arg194 et Asp238 du domaine catalytique de PCSK9 (Kwon *et al.*, 2008). Il en résulte une diminution du recyclage du récepteur LDL à la surface cellulaire à cause de sa dégradation accrue dans le lysosome (Zhang *et al.*, 2007) (**Figure 16**).

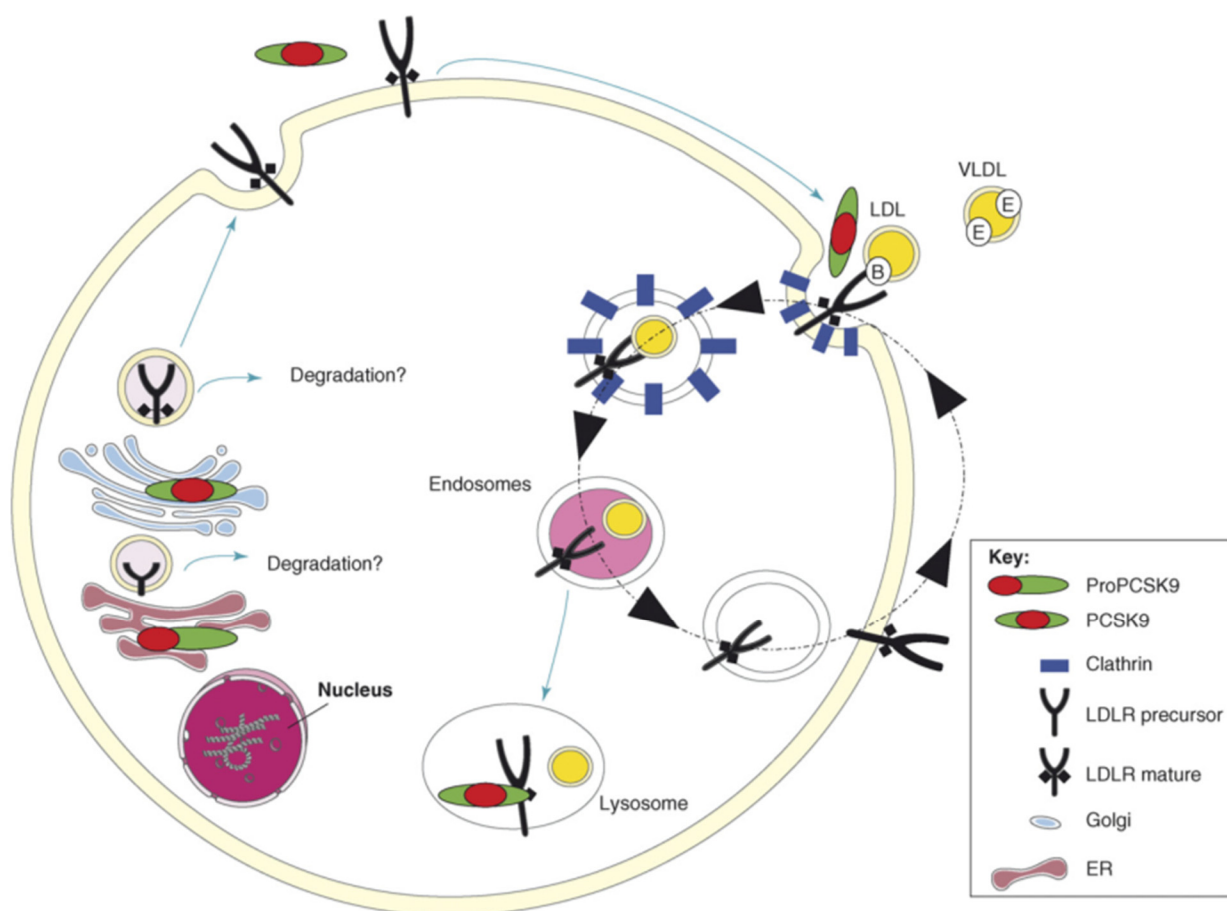


Figure 16: Mécanisme de régulation de l'expression du LDLR par PCSK9
(Source : Costet *et al.*, 2008).

Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer le rôle des mutations de PCSK9 qui pourraient affecter la régulation du LDLR (Costet *et al.*, 2008) (**Figure 17**). Le premier modèle a été établi en se basant sur la mesure de l'affinité d'interaction entre PCSK9 et le LDLR et il a montré que l'affinité entre les deux protéines variait de 169 nM à 840 nM à un pH plasmatique neutre et augmente considérablement quand le pH endosomal diminue. Ces résultats indiquent clairement que les deux protéines restent liées lors de l'endocytose (Cunningham *et al.*, 2007).

Des études d'association génomiques ont permis d'identifier les polymorphismes de PCSK9 impliqués dans les maladies cardiovasculaires. Généralement, les mutations de perte de fonction «*loss-of-function*» (LOF) de PCSK9 semblent être protectrices contre la cardiopathie ischémique (-88%) (Cohen *et al.*, 2006). Par contre, les mutations de gain de

fonction «*gain-of-function*» (GOF) de PCSK9 engendrent souvent une HF ou des MCV. Les études réalisées sur les mutations de PCSK9 ont bel et bien fourni des preuves directes de la diminution de la dégradation du LDLR et la prévention des MCV grâce à l'inhibition de PCSK9 (Maxwell *et al.*, 2005).

Parmi les différents mutants GOF testés, le variant D374Y a été identifié comme étant le variant le plus actif pour la liaison et la dégradation du récepteur LDL. A pH neutre, il présente une affinité 28 fois plus importante pour LDLR en comparant avec le variant sauvage de PCSK9 (Cunningham *et al.*, 2007). Cependant, le variant R46L appartenant aux mutants LOF a une affinité inférieure à la normale pour le récepteur LDL (Fisher *et al.*, 2007). Bien que les modèles basés sur l'affinité puissent expliquer clairement l'effet de PCSK9 sur la dégradation du LDLR et de certains mutants GOF et LOF, ils ne représentent pas nécessairement le seul mécanisme. Par exemple, le variant GOF F216L a une affinité égale à celle de la forme sauvage de PCSK9 pour le LDLR (Cunningham *et al.*, 2007). Le deuxième modèle a été proposé par Benjannet *et al.* en 2006. Il est basé sur le clivage de PCSK9 par deux autres pro-protéines convertases, la furine et la PC5/6A au niveau du résidu Arg218 générant ainsi une forme inactive de PCSK9 de 53 KDa (Benjannet *et al.*, 2006). Un troisième modèle basé sur l'oligomérisation de PCSK9 a été suggéré. En effet, Fan *et al.* 2008 ont constaté que PCSK9 est capable de s'auto-associer d'une manière dépendante de la concentration, du pH et de la température, ce qui pourrait mener à l'amélioration de la dégradation du récepteur LDL (Fan *et al.*, 2008).

La plupart des études ont été faites sur l'interaction entre PCSK9 et le LDLR au niveau de la surface cellulaire. Cependant, certaines études ont démontré la dégradation du LDLR par PCSK9 dans le milieu intracellulaire (Maxwell *et al.*, 2005) et plus précisément de l'appareil de Golgi vers les lysosomes (Poirier *et al.*, 2009). D'autres études ont montré que l'ajout de PCSK9 purifiée dans le milieu de culture des hépatocytes ayant la mutation ARH n'avait pas provoqué la dégradation du LDLR. Ces résultats montrent que PCSK9 sécrétée lie le LDLR au niveau de la surface membranaire et est internalisé avec le récepteur (Lagace *et al.*, 2006). Néanmoins, la surexpression de PCSK9 par des adénovirus chez les souris ARH^{-/-} favorise la dégradation du LDLR dans les lysosomes (Park *et al.*, 2004).

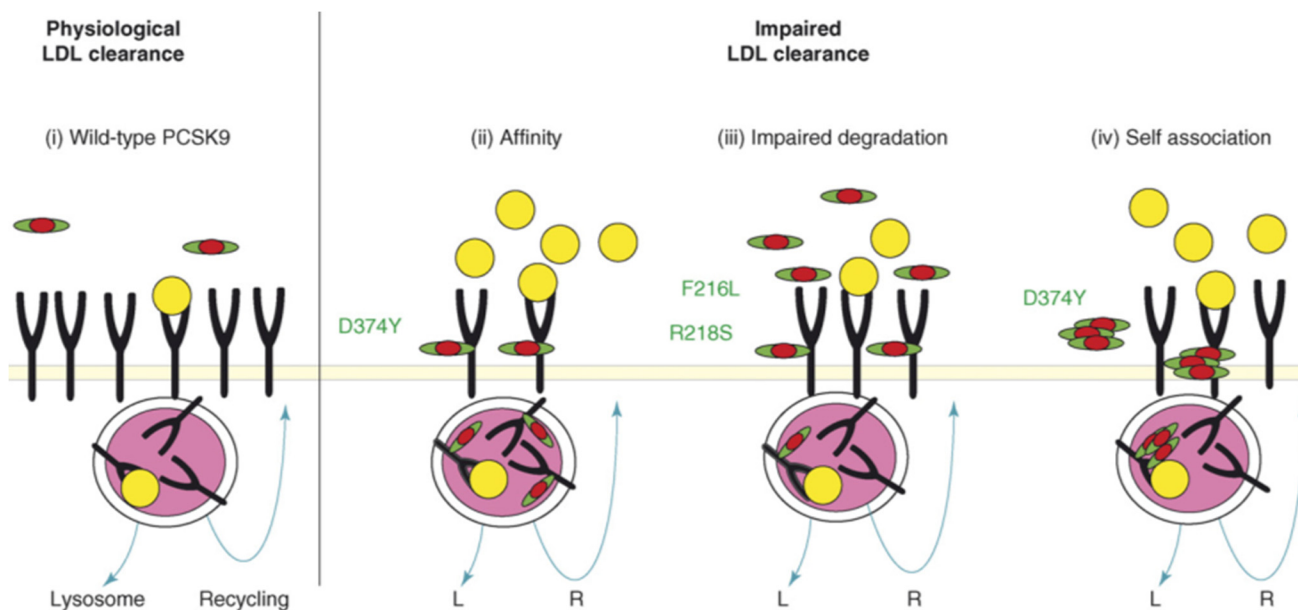


Figure 17: Les différents modèles de dégradation du récepteur LDL par PCSK9
(Source : Costet *et al.*, 2008).

2.1.4. Les autres récepteurs / canaux / enzymes affectés par PCSK9

PCSK9 agit également d'une façon indépendante du LDLR car elle interfère avec le transport intracellulaire et la dégradation des particules VLDL (Kysenius *et al.*, 2012). Chez les souris, PCSK9 provenant du foie régule le taux de VLDLR dans le tissu adipeux, limitant ainsi l'adipogenèse viscérale. Chez les souris qui n'expriment pas PCSK9 (PCSK9 Knock-out), une accumulation de 80% de tissu adipeux viscéral a été remarquée en comparant avec les souris de type sauvage. Ceci a été associé à une hypertrophie adipocytaire et une augmentation de l'absorption des acides gras *in vivo* et à la synthèse de TG *ex vivo* (Roubtsova *et al.*, 2011). PCSK9 interagit également avec d'autres récepteurs tels que la protéine-1 liée au récepteur LDL, la LRP1 (Canuel *et al.*, 2013) et le récepteur de l'apoprotéine E, l'Apo-ER2 (Poirier *et al.*, 2008). Certaines interactions de PCSK9 nécessitent la liaison au domaine EGF-A (LDLR et VLDLR) alors que d'autres ne dépendent que de l'activité catalytique de PCSK9 telle que «*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*» (LRP1). En outre, PCSK9 est capable d'interagir et de modifier le récepteur CD81 du virus de l'hépatite C dans les hépatocytes (Labonté *et al.*, 2009), le

récepteur CD36 au niveau des adipocytes et du foie de souris (Demers *et al.*, 2015). Chez les souris PCSK9 Knock-out, l'augmentation de l'expression du récepteur CD36 hépatique favorise l'absorption des AG et l'accumulation de TG et de gouttelettes lipidiques (Demers *et al.*, 2015 ; Cagnon *et al.*, 2016). Elles présentent également une réduction significative de la sécrétion lymphatique d'apoB par rapport aux souris sauvages (Le May *et al.*, 2009). Au niveau des cellules intestinales, les mutations GOF de PCSK9 augmentent l'expression du transporteur de cholestérol «*Niemann-Pick C1-like protein 1*» (NPC1L1) et augmentent donc l'absorption du cholestérol de façon LDLR- indépendant (Levy *et al.*, 2013).

2.2. Le dégradeur inductible du récepteur LDL (IDOL)

Le dégradeur inductible du récepteur LDL (IDOL) encore appelé «*Myosin regulatory light chain interacting protein*» (MYLIP) a été récemment identifié comme une E3-ubiquitine ligase impliquée dans le métabolisme du cholestérol en régulant la stabilité du récepteur LDL (Zelcer *et al.*, 2009).

2.2.1. Structure de l'ubiquitine ligase IDOL

La protéine IDOL contient une séquence d'acides aminés N-terminaux ayant une forte homologie avec le domaine globulaire N- terminal FERM (4.1 band, ezrin, radixin, and moesin). Ce domaine joue un rôle important dans l'interaction entre les protéines et la membrane cellulaire. Egalement, IDOL est caractérisé par la présence d'un domaine en doigt de zinc (RING) à son extrémité C-terminale (Olsson *et al.*, 1999). Les protéines qui possèdent le domaine FERM sont capables d'interagir avec les parties cytoplasmiques des protéines transmembranaires et les relier au cytosquelette pendant la signalisation cellulaire. Il est intéressant de noter que IDOL est la seule protéine qui contient à la fois un domaine FERM et un domaine en doigt de zinc (RING) (McClatchey *et al.*, 2009).

2.2.2. Régulation de l'expression de la protéine IDOL par le récepteur nucléaire LXR

Les récepteurs nucléaires des oxystérols ou encore appelés «*liver X receptor*» (LXR α) et (LXR β) fonctionnent en complémentarité avec les facteurs de transcription SREBPs pour maintenir l'homéostasie du cholestérol. Lorsque le niveau de cholestérol cellulaire augmente, les oxystérols formés servent de ligands pour les récepteurs LXRs (Janowski *et al.*, 1999).

La voie de signalisation LXR joue également un rôle important dans l'absorption cellulaire du cholestérol par le récepteur LDL. Le traitement de différentes lignées cellulaires telles que les macrophages et les hépatocytes avec le GW3965 et le T0901317, des agonistes de LXR, inhibait d'une manière remarquable la liaison et l'absorption des particules LDL par les cellules. Cet effet se produisait sans affecter l'ARNm du récepteur LDL. De plus, l'activation de la voie LXR engendrait une diminution rapide de l'expression du récepteur LDL au niveau de la surface cellulaire. Grâce à des études de profil de transcription et à des analyses de gènes candidats, l'ubiquitine ligase E3 a été identifiée comme le médiateur principal des effets de LXR sur le récepteur LDL (Zelcer *et al.*, 2009). Le promoteur du gène IDOL est une cible directe pour la liaison et la régulation par les hétérodimères du récepteur LXR. En effet, l'expression de l'ARNm de IDOL pourrait être activée par des agonistes de LXR dans de multiples types cellulaires, *in vitro* et des tissus, *in vivo*, y compris l'intestin, les macrophages et les tissus adipeux (Zelcer *et al.*, 2009).

2.2.3. Ubiquitination et dégradation du LDLR par IDOL

La dégradation du LDLR par IDOL a été tout d'abord révélée par une série d'expériences *in vitro* et *in vivo*. En effet, la transfection de l'ADNc de IDOL dans les cellules cultivées ou sa surexpression dans le foie de souris *via* un vecteur adénoviral augmentait la dégradation du récepteur LDL et augmentait par conséquent, le taux de cholestérol plasmatique chez la souris. De plus, la diminution de l'expression de IDOL par un si-ARN spécifique augmentait le niveau du LDLR et améliorait l'absorption des particules LDL. Ces résultats suggèrent que IDOL joue un rôle important dans la régulation du LDLR endogène (Zelcer *et al.*, 2009). La présence du domaine en doigt de zinc suggère fortement que IDOL pourrait avoir les mêmes fonctions que l'ubiquitine ligase E3. Zelcer *et al.* 2009 ont montré que l'ubiquitination du récepteur LDL était considérablement renforcée par la surexpression de IDOL. De plus, le blocage du domaine catalytique de IDOL par la mutation ponctuelle (C387A) réprimait l'activité de la ligase E3 envers LDLR. La queue cytoplasmique du récepteur LDL est la seule partie accessible à la protéine cytosolique IDOL. Des analyses mutationnelles avaient révélé que la présence des résidus K830 ou C839 intacts au niveau de la queue cytosolique du LDLR est nécessaire

pour l'ancrage de l'ubiquitine ligase E3 et pour la dégradation lysosomale du LDLR. Tout comme les autres ubiquitines ligases, IDOL subit une auto-dégradation au niveau du protéasome (Zelcer *et al.*, 2009) (**Figure 18**).

Les travaux récents indiquaient que, en plus du LDLR, IDOL est capable d'ubiquitiner et de dégrader deux autres membres étroitement liés à la famille du récepteur LDL, qui sont les récepteurs VLDLR et Apo-ER2 (Hong *et al.*, 2010). En outre, les données disponibles suggéraient que LDLR, VLDLR et Apo-ER2 sont les seules cibles pour IDOL chez les mammifères (Calkin *et al.*, 2011).

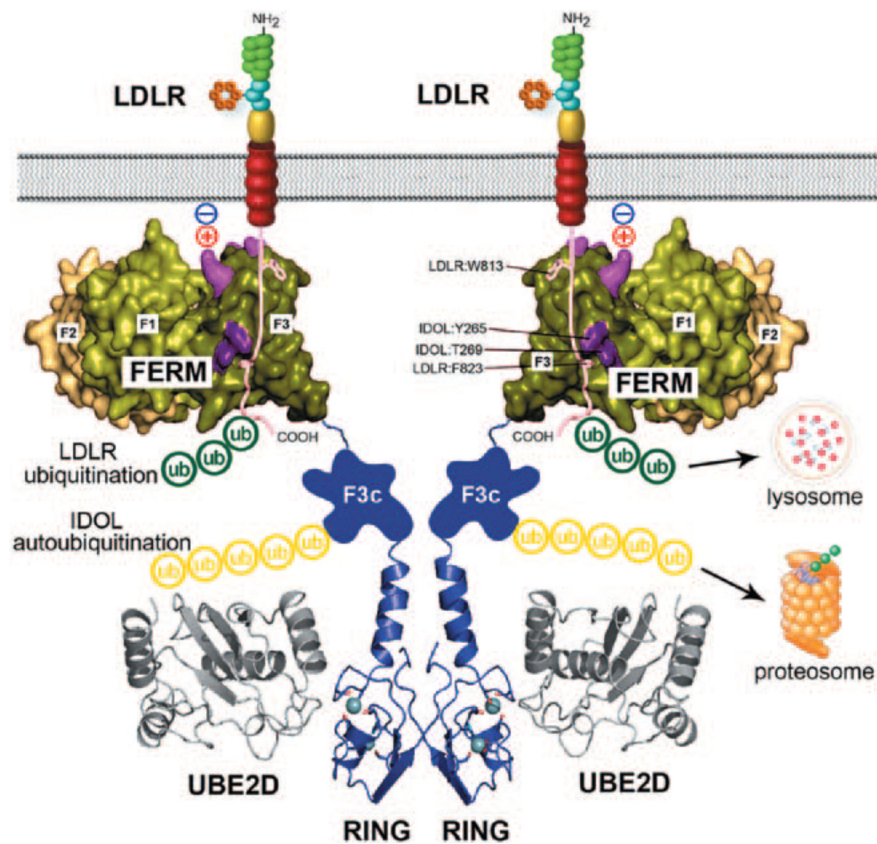


Figure 18: Le mécanisme de reconnaissance et d'ubiquitination du récepteur LDL par IDOL (Source : Zhang *et al.*, 2012).

3. Régulation post-transcriptionnelle du LDLR

Dans les cellules eucaryotes, l'expression des gènes est contrôlée à plusieurs niveaux tels que la transcription, l'épissage alternatif, la polyadénylation, le transport et la stabilité de l'ARNm et au cours de la traduction. Le but ultime d'une telle régulation est d'assurer une répartition spatio-temporelle correcte des protéines codées. A ce jour, plusieurs études ont mis l'accent sur les mécanismes contrôlant la transcription des gènes et leur traduction en protéines, mais récemment, l'implication des modifications post-transcriptionnelles dans la régulation de l'expression génique est devenue de plus en plus étudiée (Dreyfuss *et al.*, 1996; Jacobson *et al.*, 1996; Wickens *et al.*, 1997; Yashiro *et al.*, 2013).

3.1. La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm

L'expression des gènes est un processus complexe et étroitement régulé. En plus de la transcription, les mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans la stabilité et le transport de l'ARN semblent être aussi essentiels pour contrôler l'expression des gènes. Parmi les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, on trouve les protéines de liaison de l'ARN «*RNA-binding Proteins*» (RBPs). Ces protéines appartiennent à plusieurs familles dont nous pouvons trouver des facteurs de stabilisation et/ ou de déstabilisation de l'ARNm. La régulation post-transcriptionnelle des gènes pourrait être aussi modifiée par les micro-ARN (miARN) qui fonctionnent généralement comme des déstabilisants de l'ARNm tout en diminuant sa demi-vie. En effet, la demi-vie d'un ARNm particulier dépend des séquences situées généralement dans sa séquence non traduite «*3'-untranslated region*» (3'UTR) au niveau de laquelle se fixent les RBPs (Wilusz *et al.*, 2001). Certains ARNm sont caractérisés par une demi-vie très courte d'où leur instabilité alors que d'autres sont assez stables grâce à leur longue durée de demi-vie (Ross *et al.*, 1995). La région riche en adénylate-uridylylate (ARE) est la séquence de 3'UTR la plus étudiée et la plus impliquée dans l'instabilité de l'ARNm (Shaw and Kamen., 1986 ; Chen and Shyu., 1995). Initialement, les AREs ont été identifiés dans les gènes oncogènes et les cytokines, mais présentement, ils sont reconnus dans de multiples familles de gènes (Frevel *et al.*, 2003) (**Figure 19**).

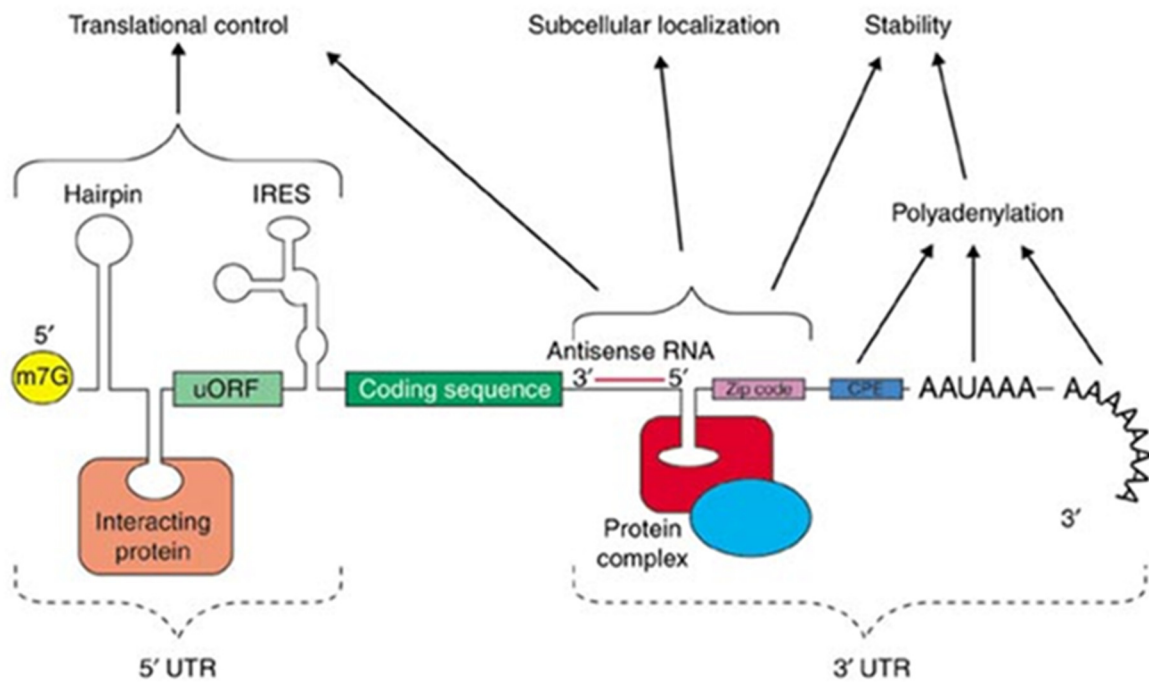


Figure 19: La structure générique de l'ARNm chez les eucaryotes

(Source : https://www.researchgate.net/figure/11466788_fig2_Figure-1-The-generic-structure-of-a-eukaryotic-mRNA-illustrating-some).

3.1.1. Les mécanismes de régulation de la stabilité de l'ARNm

Les voies de dégradation de l'ARNm chez la plupart des mammifères commencent par une déadénylation exonucléolytique 3'-5' de la queue poly-A suivie d'une dégradation rapide de l'ARNm restant par des exonucléases 3'-5' ou dans certains cas par des endonucléases (Ross, 1995). Au niveau de l'extrémité 5', la coiffe de la 7-méthylguanosine pourrait être éliminée par le complexe Dcp1/ Dcp2, ce qui permettrait la dégradation de l'ARNm par l'exonucléase 5'-3', Xrn1. Le complexe Dcp1 / Dcp2 et l'exonucléase Xrn1 se trouvent dans un plus grand complexe avec les protéines Lsm1-7, qui se colocalisent dans le compartiment cytoplasmique pour former le corps (P) (Cougot *et al*, 2004). Le clivage exonucléolytique de l'ARNm est assuré par l'exosome, un grand complexe multi-protéique contenant différentes exonucléases et représentant ainsi la principale voie de dégradation de l'ARNm contenant les motifs AREs (Butler, 2002). Certains homologues exosomaux humains avaient été démontrés capables de se lier d'une façon spécifique aux motifs AREs ce qui permettait une dégradation de l'ARNm ARE-dépendante. De même, l'interaction

spécifique avec certaines protéines de liaison avait favorisé la dégradation exosomale de l'ARNm en question (Chen *et al.*, 2001). Par contre, d'autres protéines permettaient de masquer le site spécifique des endonucléases par la liaison de l'ARNm et le protégeaient ainsi du clivage endonucléolytique, d'où sa stabilisation (Hollams *et al.*, 2002).

Les membres de la famille de protéines de liaison de la queue poly-A de l'ARNm «*poly-A-binding protein*» (PABP) ou encore appelées protéines de liaison de l'ARNm (RBPs) sont des facteurs très importants dans la régulation de l'expression de l'ARNm. En outre, elles pourraient être impliquées dans la stabilisation et/ ou la déstabilisation de l'ARNm grâce à la présence de la queue poly-A au niveau de l'extrémité 3' (Ross, 1995).

3.1.2. Les différentes classes d'AREs

De nombreuses études ont identifié des éléments d'action en cis au niveau de la région 3'UTR de nombreux ARNm comme étant des facteurs importants dans la régulation de la stabilité de l'ARNm. Ils ont été décrits pour la première fois par Shaw et Kamen en 1986. Les AREs ont été identifiés dans la séquence 3'UTR des ARNm codant pour les cytokines (Gillis and Malter, 1991), les proto-oncogènes (Wilson and Treisman, 1988), les facteurs de croissance (Levy *et al.*, 1996), les lymphokines, etc... (Gillis and Malter, 1991). Généralement, la présence des motifs AREs est liée à une réduction de la stabilité de l'ARNm (Shaw and Kamen, 1986).

En se basant sur leur différence de longueur et de séquence (le contenu en AU), les motifs AREs sont divisés en plusieurs classes. En effet, les AREs de classe I contiennent plusieurs copies du motif AUUUA en pentamères regroupés et répétés en tandem. Les AREs de classe II contiennent seulement quelques motifs AUUUA en pentamères dispersés au niveau de la séquence 3'UTR et couplés à des séquences riches en U (Chen and Shyu, 1995). En revanche, les AREs de classe III ne contiennent pas de motif AUUUA mais elles contiennent d'autres éléments régulateurs en cis tels que les motifs UUAUUUA (U/A) (U/A) ou UUAUUUAUU (Lagnado *et al.*, 1994). En outre, un ARNm pourrait contenir plusieurs motifs AREs qui agissent indépendamment l'un de l'autre, ce qui permettrait d'avoir une diversité dans la régulation de l'expression de l'ARNm (Akashi *et al.*, 1994). Dans certains cas, les ARE voisins peuvent interagir fonctionnellement les uns avec les

autres comme dans le cas de l'ARNm codant pour « c-Jun *N-terminal kinases* » (JNK) (Chen *et al.*, 1994). La formation des structures secondaires au niveau du 3'UTR est nécessaire pour l'assemblage des protéines de liaison aux motifs AREs. Ces structures rendent le mécanisme de régulation plus complexe (Bevilacqua *et al.*, 2003). Par exemple, la présence des grappes de motifs AUUUA au niveau de l'ARNm permettent la formation de complexes de liaison ayant une affinité de liaison supérieure en comparant avec les séquences d'ARNm possédant peu de motifs AUUUA (Gillis and Malter, 1991).

La demi-vie d'un ARNm spécifique pourrait donc être déterminée principalement par des interactions coopératives entre différents éléments d'action en *cis* qui donnent lieu à un schéma complexe de redondance ou d'additivité fonctionnelles nécessaires au niveau des motifs AREs. En outre, la décision de savoir si un ARNm est finalement stabilisé ou déstabilisé pourrait également dépendre de l'action combinée de différents facteurs de liaison de l'ARNm agissant simultanément sur différentes formes d'AREs dans l'ARNm (Yeap *et al.*, 2002).

3.1.3. Les protéines de liaison de l'ARNm «RBPs»

Bien que de nombreuses protéines de liaison des motifs AREs (RBPs) aient été identifiées, l'importance fonctionnelle et physiologique de ces interactions demeure ambiguë (Dreyfuss *et al.*, 2002). En effet, ces protéines peuvent fonctionner comme des régulateurs primaires de l'expression des gènes en contrôlant des processus tels que l'épissage, le transfert de l'ARNm, la localisation, la polyadénylation, la dégradation et la traduction (Glisovic *et al.*, 2008) (**Figure 20**).

Le génome humain contient environ 1000 RBPs, dont une grande partie fonctionne d'une manière très spécifique avec les motifs AREs de l'ARNm (Uren *et al.*, 2011). Les protéines de liaison les plus importantes incluent des membres de la famille des protéines Hu impliquées dans la stabilisation de l'ARNm, comme la HuR (HuA), la HuB, la HuC et la HuD. Les autres protéines de liaison appartiennent à des familles différentes mais elles engendrent la dégradation de l'ARNm après leur interaction avec les motifs AREs. Parmi ces protéines nous pouvons citer le facteur de dégradation ARE/poly (U) (hnRNPD) ou (AUF-1), la tristétraproline (TTP), la protéine régulatrice de l'épissage (KSRP), l'antigène

intracellulaire des cellules T (TIA)-1, la protéine de choc thermique 70 (Hsp70) et la GAPDH (Dreyfuss *et al.*, 2002). Certaines RBPs se déplacent entre le noyau et le cytoplasme et elles ne peuvent être associées qu'avec leur ARNm cible. La liaison transitoire et spécifique des protéines RBPs à l'ARN permet son transport nucléocytoplasmique et lui offre une protection efficace contre les processus de dégradation (Dreyfuss *et al.*, 2002). Cette spécificité pourrait être expliquée par la présence de différentes RBPs telles que les protéines nucléaires, hnRNPs, et d'autres protéines liant le pré-ARNm et/ou l'ARNm (Burd and Dreyfuss., 1994) contenant un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN tels que le domaine RBD, également connu sous le nom du domaine RNP ou le motif RRM, le domaine K-homologie (KH) (type I et type II), le domaine en doigts de zinc (ZnF), le domaine Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), etc... (Chen and Varani., 2005), d'où vient leur diversité et spécificité fonctionnelles (Lunde *et al.*, 2007). Les modifications post-traductionnelles des RBPs pourraient également expliquer leur spécificité fonctionnelle car elles peuvent modifier l'affinité de liaison à l'ARN, la fonction et la localisation des RBPs. Nous trouvons trois types de modifications des RBPs: la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination (Leffers *et al.*, 1995).

Aujourd'hui, nous trouvons plusieurs techniques disponibles pour identifier les protéines RBPs; certaines d'entre elles ne peuvent détecter que les molécules recombinantes *in vitro*, d'autres sont capables de détecter les molécules recombinantes et endogènes, tandis que certaines d'autres ne détectent que des molécules endogènes. Par exemples: la technique de l'évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel (SELEX), le dosage de l'ARN biotinylé, le dosage de l'immunoprécipitation de l'ARN (RIP), l'analyse de la mobilité électrophorétique (EMSA), l'analyse de l'empreinte de l'ARN et diverses méthodes de réticulation et d'immunoprécipitation par la lumière ultraviolette (CLIP), PAR-CLIP et iCLIP (Popova *et al.*, 2015).

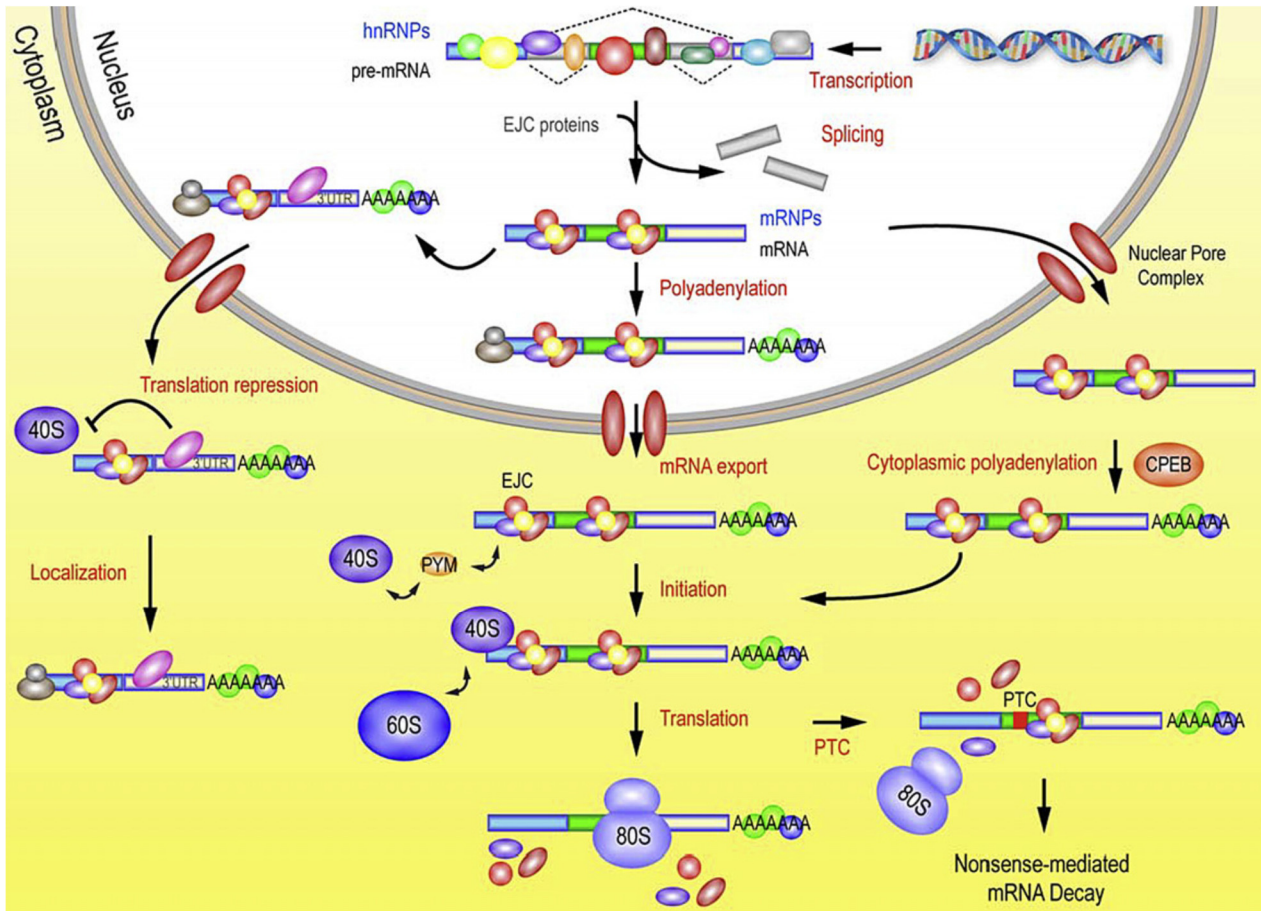


Figure 20: Les différentes fonctions des protéines RBPs dans la régulation post transcriptionnelle de l'expression des gènes
(Source : Glisovic *et al.*, 2008).

Puisque la liste des protéines de liaison de l'ARNm (RBPs) est trop longue, nous allons nous focaliser dans la partie suivante aux protéines les plus étudiées et les mieux caractérisées.

3.1.3.1. Les protéines Hu de la famille «*ELAV-Like/Hu Protein Family*»

Les protéines RBPs appartenant à la famille des protéines Hu ou «*ELAV-Like/Hu Protein Family*» ont été identifiées pour la première fois chez les patients atteints d'encéphalomyélite paranéoplasique (Dalmau *et al.*, 1990). Chez les mammifères, quatre protéines ont été identifiées, y compris la HuR (également connue sous le nom de la HuA), la HuB (encore appelée Hel-N1), la HuC et la HuD. Trois de ces protéines (la HuB, la HuC

et la HuD) sont régulées au cours du développement et représentent l'un des premiers marqueurs exprimés dans les neurones chez la drosophile. Par contre, la protéine HuR est exprimée dans plusieurs tissus (Okano and Darnell., 1997). Il a été suggéré que la protéine HuR est capable de cibler une grande partie du transcriptome (environ 15%) (Uren *et al.*, 2011). Au niveau moléculaire, les protéines appartenant à cette famille contiennent trois motifs de reconnaissance de l'ARNm de 80 acides aminés fortement conservés (Kenan *et al.*, 1991). Les protéines Hu se lient préférentiellement aux AREs situés au niveau de la séquence 3'UTR et stimulent l'initiation de la traduction de plusieurs ARNm codant pour des protéines impliquées dans la croissance, la prolifération cellulaire et l'inflammation (Wilusz and Wilusz., 2004 ; Polacek *et al.*, 2009). La protéine HuR est exprimée principalement au niveau du noyau et fait des navettes vers le cytosol (Peng *et al.*, 1998) pour stabiliser l'ARNm d'un grand nombre de protéines (Babu *et al.*, 2015). La protéine HuC se trouve aussi bien dans le compartiment nucléaire que cytosolique, tandis que les protéines HuB et HuD sont exprimées essentiellement dans le cytosol (Hinman *et al.*, 2013). Récemment, il a été suggéré que la liaison de la protéine HuD à la séquence 3'UTR de l'ARNm favorisait le processus de la traduction en interagissant avec le facteur eIF4A (Fukao *et al.*, 2009). A son tour, la protéine HuD pourrait assurer d'autres fonctions telles que le transport et la localisation de l'ARNm (Yoo *et al.*, 2013).

Le transport des protéines Hu du noyau vers le cytoplasme est réalisé en réponse à divers stimuli activant des voies de signalisation intracellulaires spécifiques telles que les MAP kinases (MAPK) (Winzen *et al.*, 1999), les kinases activées par l'AMP (AMPK) (Wang *et al.*, 2000) ainsi que différents membres de la famille des protéines kinases C (PKC) (Pascale *et al.*, 2005). Par conséquent, les différences dans la liaison des motifs AREs et la régulation de l'ARNm peuvent être dues à la modulation différentielle de ces voies de signalisation en réponse aux stimuli extracellulaires. Certaines études ont montré l'interaction directe des protéines HuR avec des protéines de transport telles que les protéines SET α , SET β , pp32 et les protéines riches en leucine (APRIL) (Brennan *et al.*, 2000).

3.1.3.2. La protéine AUF-1 « *Adenylate - uridyate – rich elements (ARE)/poly (U) – binding degradation factor-1* »

La protéine AUF-1, également appelée hnRNP, est un membre de la famille des protéines hnRNP qui joue un rôle central dans la réparation de l'ADN, la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription et la traduction. La protéine AUF-1 est une des protéines de liaison des AREs les plus largement caractérisées et impliquées dans le contrôle de l'expression de l'ARNm de courte durée de vie (Dreyfuss *et al.*, 2002). AUF-1 a été initialement identifiée comme un facteur qui favorise la dégradation exosomale de l'ARNm cible (Ross, 1995) et déstabilise l'association du polyribosome aux transcrits d'ARNm (Chen *et al.*, 2001). Contrairement aux protéines HuR, l'AUF-1 se lie exclusivement aux classes I et II des AREs (Barreau *et al.*, 2005). Elle partage la même structure globale des protéines de liaison de l'ARN avec une différence au niveau de deux sites de reconnaissance de l'ARNm et la présence d'une région supplémentaire riche en glutamine dans l'extrémité C-terminale qui semble être nécessaire pour la liaison des motifs AREs. L'épissage différentiel des transcrits AUF-1 donne différents ARNm, codant pour 4 isoformes qui pourraient agir de différentes manières selon la nature du stimuli et le type cellulaire (Misquitta *et al.*, 2001). Il est à noter que les isoformes d'AUF-1 pourraient subir différentes modifications post-traductionnelles, y compris la glycosylation, la méthylation et la phosphorylation, ce qui pourrait affecter l'affinité de liaison de l'ARNm, le trafic intracellulaire ou l'affinité de liaison aux autres protéines (Loflin *et al.*, 1999). La phosphorylation du résidu sérine Ser⁸³ et Ser⁸⁷ de l'isoforme p40^{AUF1} de l'AUF a été identifiée comme une étape importante dans la régulation de sa liaison à l'ARN, ce qui met en exergue les inhibiteurs des protéines kinases comme cibles prometteuses pour une intervention pharmacologique permettant d'empêcher la dégradation de l'ARNm par l'AUF-1 (Wilson *et al.*, 2003). Par contre, les effets déstabilisants de l'ARNm par l'AUF-1 sont souvent combinés avec les effets stabilisants dépendants de la HuR, ce qui indique l'existence d'une régulation mutuelle de la stabilité de l'ARNm par ces deux facteurs (Bevilacqua *et al.*, 2003).

En outre, les protéines AUF-1 et HuR peuvent compétitionner dans certains cas pour se lier à des motifs AREs similaires et le résultat de cette compétition dépendrait fortement

de la voie des protéines kinase activée. Cependant, le décalage dans le temps de liaison de ces protéines à l'ARNm peut déterminer si la demi-vie d'un certain ARNm pourrait être réduite ou augmentée (Bevilacqua *et al.*, 2003). Les changements affectant la phosphorylation de l'AUF-1 peuvent influencer les mécanismes de régulation de l'ARNm tels que la modulation de l'affinité de liaison à l'ARN, les changements conformationnels de la structure des ribonucléoprotéines (RNP) et par des interactions spécifiques avec les protéines et les facteurs associés (Wilson *et al.*, 2003).

3.1.3.3. La tristétraproline (TTP)

La protéine TTP appartient à la famille des protéines à doigts de zinc Cys-Cys-Cys-His (CCCH). Elle est connue comme une protéine de déstabilisation de l'ARNm tels que l'ARNm codant pour le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et le facteur de transcription c-fos. La protéine TTP cible principalement les motifs AREs de classe II (Blackshear, 2002). Elle lie les motifs AREs de l'ARNm du gène *TNF- α* et de quelques cytokines et favorisent leur déadénylation et leur dégradation (Gherzi *et al.*, 2004). Elle est rapidement induite en réponse à différents stimuli tels que l'insuline et d'autres facteurs de croissance (Carballo *et al.*, 2001). Tout comme les protéines AUF-1 et HuR, la protéine TTP se trouve aussi bien dans le compartiment nucléaire que cytosolique. Le transport nucléo-cytoplasmique de la TTP s'effectue grâce à une séquence d'exportation nucléaire (NES) et il est réalisé par différents stimuli mitogènes comprenant le sérum, les facteurs de croissance et les esters de phorbol (Taylor *et al.*, 1995).

3.1.3.4. La protéine KSR «*K homology-type splicing regulatory protein*»

La KSR a été initialement identifiée comme une composante activant des complexes d'épissage au niveau des neurones (Min *et al.*, 1997). Par la suite, elle a été identifiée comme une protéine de liaison à l'ARN largement exprimée et impliquée dans le raccourcissement de la queue poly (A) et la dégradation exosomale des ARNm contenant les motifs AREs de classe I, II et III. La KSR contient 4 motifs KH impliqués dans la liaison de l'ARN et nécessaires pour son interaction avec d'autres protéines de liaison de l'ARN (Chen *et al.*, 2001). Parmi les ARNm cibles de la KSR, nous trouvons les ARNm codant pour les gènes *c-fos*, *p21*, et le *TNF- α* (Gherzi *et al.*, 2004). De même, la KSR et la HuR

peuvent lier le même motif ARE et en cas d'augmentation du niveau de la protéine TTP au niveau du cytoplasme, l'ARNm cible quitte le complexe KSR/exosome ce qui favoriserait la liaison de la protéine HuR à l'ARNm en question tel que l'ARNm codant pour l'inducteur de l'oxide nitrique synthase humain (iNOS) (Linker *et al.*, 2005). La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes KSR-dépendante, tel que le gène *p21* (Briata *et al.*, 2005).

3.1.4. Protéines RBPs vs les micro-ARN

La stabilité des transcrits d'ARNm peut être également régulée par des ARN courts de 21 à 23 nucléotides appelés micro-ARN. Les RBPs et les micro-ARN peuvent reconnaître des séquences spécifiques dans les transcrits d'ARNm grâce à la séquence nucléotidique et /ou la structure secondaire. Bien que les RBPs et les micro-ARN aient généralement été considérés comme des voies distinctes de la dégradation de l'ARNm, récemment, il est devenu plus clair que les RBPs peuvent réguler l'activité des micro-ARN et changer le destin de l'ARNm (Jiang and Coller., 2012).

Les micro-ARN sont des séquences d'ARN d'environ 22 nucléotides qui s'hybrident à des séquences complémentaires principalement au niveau de la séquence 3'UTR de l'ARNm. Cette interaction permet le plus souvent, de déstabiliser l'ARNm cible ou d'empêcher sa traduction par le ribosome, ce qui provoque une diminution de la traduction des protéines correspondantes. Récemment, il a été démontré que la déstabilisation de l'ARNm est l'effet prédominant de la liaison des micro-ARN, (Eichhorn *et al.*, 2014), bien que selon la théorie de la complémentarité, certains micro-ARN semblent agir de manière préférentielle *via* la répression de la traduction (Lee *et al.*, 2015). Les micro-ARN fonctionnent dans le contexte d'un complexe ribonucléoprotéique appelé «*RNA-induced silencing complex*» (RISC), qui comprend les protéines Argonautes (Ago). Jusqu'à aujourd'hui, environ 2000 micro-ARN ont été identifiés dans le génome humain. Certaines d'entre elles peuvent cibler des séquences similaires à celles des RBPs et affecter la fonction des protéines RBPs correspondantes (Jacobsen *et al.*, 2010). Comme indiqué ci-dessus, les protéines Hu fonctionnent le plus souvent comme des facteurs de stabilisation mais il a été démontré dans la littérature qu'elles pourraient compétitionner avec différents micro-ARN pour contrôler l'expression de certains gènes. Par exemple, dans le cas du stress

au niveau de la cellule, la HuR peut stabiliser l'ARNm du transporteur d'acide cationique 1 (CAT1) et empêcher sa répression par le micro-ARN miR-122 (Bhattacharyya *et al.*, 2006). La HuR favorisait également la traduction de l'ARNm codant pour la topoisomérase II (TOP2A) en inhibant l'effet déstabilisant du micro-ARN miR-548c-3p (Srikantan *et al.*, 2011).

En plus de la compétition entre les micro-ARN et les RBPs, ils existent quelques exemples dans lesquels ces molécules coopèrent pour réprimer l'expression de certains gènes. Par exemple, le micro-ARN miR-16 contient une séquence complémentaire à la séquence ARE du 3'UTR qui lui permet de dégrader plusieurs ARNm. Cet effet nécessite son interaction avec le complexe RISC et la protéine TTP (Jing *et al.*, 2005). Le deuxième exemple que nous pouvons citer est celui de la protéine HuR et le micro-ARN let-7 qui sont capables de réprimer l'expression du gène *c-myc* dans les cellules Hela (Kim *et al.*, 2009). L'explication possible de ces effets inattendus de la HuR est qu'elle modifie la conformation de l'ARNm après sa liaison ce qui permet de démasquer les nouveaux sites de liaison spécifique des micro-ARN (Kim *et al.*, 2009). Il a été démontré que la protéine HuD contient trois principaux motifs de liaison, une séquence riche en CU (motif 1), une séquence riche en GU (motifs 2) et une séquence riche en AU (motif 3) (Bolognani *et al.*, 2010). Plusieurs micro-ARN, tels que miR-149-3p, miR-495-3p et miR-590-3p, contiennent des séquences complémentaires à ces motifs, respectivement, ce qui leur permet d'être des concurrents potentiels de la HuD dans certaines conditions. Enfin, il est important de savoir que les micro-ARN peuvent affecter directement le niveau d'expression des RBPs tels que le cas du miR-16 et la HuR (Xu *et al.*, 2010), miR-375 et la HuD (Abdelmohsen *et al.*, 2010) et miR-206 et la KSRP (Amirouche *et al.*, 2014) (**Figure 21**).

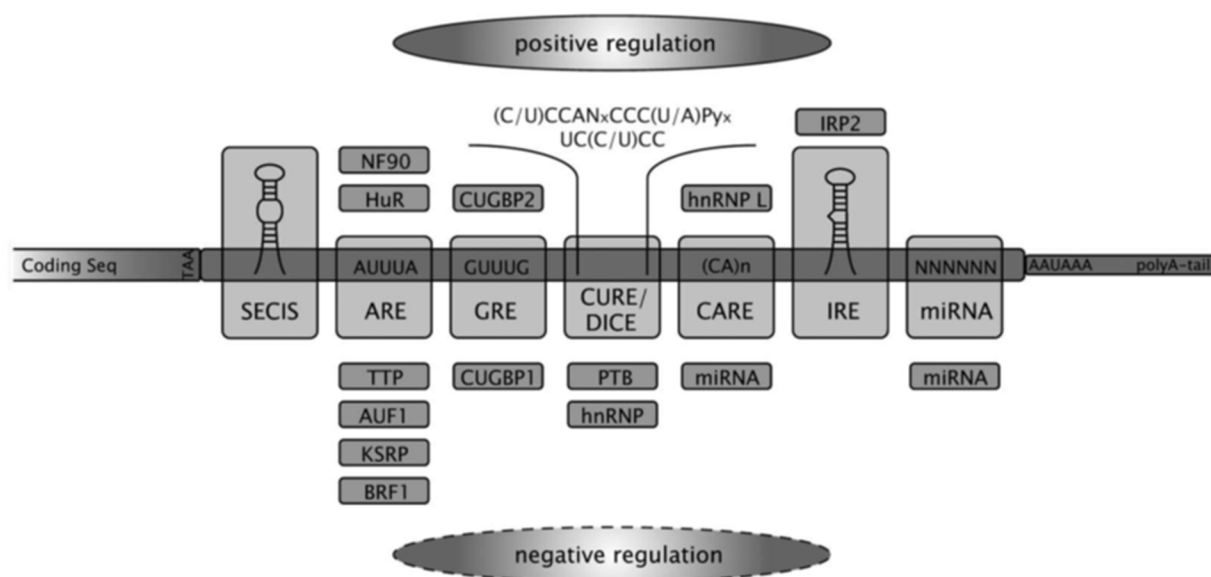


Figure 21: Illustration schématique de la séquence 3'UTR avec ses éléments régulateurs (agissant en *cis*) et leurs principaux partenaires d'interaction (éléments à effet *trans*) (Source : Matoulkova *et al.*, 2012).

3.1.5. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la stabilité de l'ARNm par les RBPs

La liste des stimuli régulant la stabilité de l'ARNm est très diversifiée et devient de plus en plus longue. En dépit de leur grande hétérogénéité, ces stimuli sont classés en différentes catégories, y compris les cytokines, les facteurs de croissance, les médiateurs du stress cellulaire et les hormones. En plus de ces facteurs intrinsèques, de nombreux agents environnementaux peuvent moduler la stabilité de l'ARNm tels que le choc thermique (DiDomenico *et al.*, 1982), les rayonnements UV (Wang *et al.*, 2000), l'hypoxie (Guhaniyogi and Brewer, 2001) et l'absence de nutriments (Yaman *et al.*, 2002). Tous ces stimuli convergent vers un nombre limité de cascades de signalisation qui permettent de réguler les fonctions des protéines RBPs. Bien que les événements moléculaires par lesquels ces voies de signalisation modulent l'expression de l'ARNm sont largement inconnus, deux mécanismes principaux pourraient être distingués: 1) la modification de l'abondance générale des protéines RBPs et, 2) la modification de leurs propriétés de liaison de l'ARNm (Suswam *et al.*, 2005).

3.1.5.1. Les voies des MAP Kinases

3.1.5.1.1. La voie des MAP Kinases p38

Il a été rapporté que l'inhibition de la voie des MAP kinases p38 par l'inhibiteur SB20358 entraînait une diminution substantielle de la demi-vie de plusieurs ARNm contenant les motifs ARE, tels que l'ARNm codant pour le TNF α (Mahtani *et al.*, 2001) et la COX-2 (Ridley *et al.*, 1998). Étant donné que le renouvellement de l'ARNm régulé par les ARE est fortement activé en réponse à des stimuli inflammatoires, il n'est pas surprenant que la voie p38 soit impliquée dans la stabilisation de l'ARNm codant pour les protéines inflammatoires. Ces gènes cibles comprennent l'interféron-gamma (*IFN γ*) (Mavropoulos *et al.*, 2005), l'*IL-3*, l'*IL-6* et d'autres (Dean *et al.*, 2004). Contrairement à la HuR et l'AUF-1, la régulation des fonctions de la protéine TTP par la voie p38 a été bel et bien décortiquée dans plusieurs études. En outre, ces études suggèrent que la voie p38 joue un rôle important dans la dégradation du gène *TNF α* par la TTP et que la phosphorylation de la TTP est directement liée à la réduction de son affinité de liaison aux motifs ARE (Mahtani *et al.*, 2001).

3.1.5.1.2. La voie « *c-Jun N-terminal Kinase* » (JNK)

Outre la voie p38, la voie de signalisation JNK est impliquée dans la transduction des signaux régulant la stabilisation de l'ARNm de l'*IL-2* (Chen *et al.*, 2000), l'*IL-3* (Ming *et al.*, 1998) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Pages *et al.*, 2000). Il a été démontré que la régulation de la stabilité de l'ARNm de l'*IL-3* par la voie JNK dépendait exclusivement de la séquence 3'-UTR (Ming *et al.*, 1998).

3.1.5.1.3. La voie « *Extracellular signal- regulated kinases* » (ERK1/2)

L'importance de la voie de signalisation ERK1/2 dans la régulation de l'expression de l'ARNm contenant les motifs ARE est peu documentée. Une étude antérieure faite sur les cellules cancéreuses du poumon humain a démontré que la liaison et la stabilisation de l'ARNm codant pour le gène *p21* par la protéine HuR dépendait de l'activation de la voie ERK1/2 par la prostaglandine (Yang *et al.*, 2004).

3.1.5.2. La voie de l'AMP kinase

La voie de l'AMP Kinase est critique pour la stabilité de l'ARNm dans des conditions physiologiques et pathologiques diverses. Elle peut être activée par de nombreuses conditions de stress telles que l'hypoglycémie, le stress oxydant, le choc thermique et l'hypoxie, ce qui provoque l'appauvrissement cellulaire de l'adénosine 5-triphosphate (ATP). L'augmentation de l'activité de l'AMP Kinase par l'élévation du rapport AMP/ATP est également impliquée dans la sénescence des fibroblastes par un mécanisme nécessitant l'inhibition de la protéine HuR. Par contre, l'inhibition de l'AMP Kinase par les UV provoque une forte augmentation du taux cytoplasmique de la HuR et par conséquent, la stabilisation de l'ARNm de plusieurs transcrits tels que le gène *p21* et les cyclines A et B1 (Wang *et al.*, 2002).

3.1.5.3. La protéine kinase C (PKC)

Plusieurs membres de la famille des PKC sont impliqués dans la régulation post-traductionnelle de l'ARNm *via* les motifs ARE, y compris ceux codant pour la protéine associée à la croissance (GAP)-43 (Perrone-Bizzozero *et al.*, 1993) et le p21 (Park *et al.*, 2001). La phosphorylation de la protéine TTP par la PKC δ semble être une étape clé dans la déstabilisation de l'ARNm induite par la TTP (Gringhuis *et al.*, 2005). Une autre étude a démontré que l'activation de la PKC α était critique pour la stabilisation de la GAP-43 par les protéines ELAV neuronales en réponse à leur activation par l'ester de phorbol (Mobarak *et al.*, 2000).

3.2. Les protéines RBPs et les maladies cardiovasculaires

Le rôle de la séquence 3'UTR dans le contrôle de l'expression de l'ARNm a été élucidé en étudiant l'expression des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur, des cytokines et des facteurs de transcription. Plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'étude des protéines dont l'expression est contrôlée par les RBPs et le 3'UTR dans le développement des maladies cardiovasculaires (**Tableau 2**).

Tableau 2: Le rôle des RBPs dans le développement des maladies cardiovasculaires (Source : Babu *et al.*, 2015, modifié).

<i>Maladies et gènes cibles</i>	<i>RBPs</i>	<i>Mécanisme d'action</i>
<i>Infarctus du myocarde</i> <i>Cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-6...)</i>	HuR	L'IL-10 inhibe la stabilisation des cytokines pro-inflammatoires par la HuR → diminution de la taille de l'infarctus.
<i>Les récepteurs β-adrénergiques</i>	HuR, AUF1, hnRNP-A1	Dégradation de l'ARNm du récepteur.
<i>SERCA</i>	HuR	Régulation de la translocation de la HuR et de la demi-vie de l'ARNm de SERCA2 par la protéine kinase C.
<i>L'hypertension</i>		
<i>La guanylate cyclase soluble (sGC) ↓</i>	HuR	Diminution de l'expression de la HuR → Diminution de l'expression de la sGC.
<i>L'hypertrophie</i>		
<i>Le transporteur du glucose (Glut1)</i>	HuR	Stabilisation de l'ARNm du Glut1.
<i>Le récepteur TLR4</i>	HuR	Stabilisation de l'ARNm du TLR4 en cas de pression.
<i>L'inflammation</i>		
<i>TNFα, IL-6</i>	HuR, TTP	Contrôle de l'ARNm du TNF α et l'IL-6.
<i>L'homéostasie endothéliale</i>		
<i>eNOS, ↓ICAM-1, VCAM-1</i>	HuR	La HuR inhibe eNOS et stabilise ICAM-1 et VCAM-1 et favorise l'adhésion des leucocytes endothéliaux.
<i>L'angiogenèse</i>		
<i>VEGF ↑</i>	PAIP2, HuR 76/NF90	PAIP2 et HuR coopèrent pour stabiliser l'ARNm de VEGF.

<i>HIF1α</i>	(DRBP76) HuR, PTB	76/NF90 stabilise l'ARNm de VEGF dans le cas d'hypoxie. HuR et PTB stabilisent HIF1 α dans le cas d'hypoxie.
La fibrose <i>TGFβ, MMP9</i> \uparrow	HuR	Contrôle le facteur TGF β et la MMP9.

Légende : (\uparrow) sur-expression, (\downarrow) sous-expression.

3.2.1. Les RBPs et l'infarctus du myocarde (IM)

L'infarctus du myocarde (IM) est une maladie du cœur caractérisée par la nécrose d'une partie plus ou moins importante du muscle cardiaque (myocarde). Il consiste à l'activation d'une réponse inflammatoire associée au dysfonctionnement du ventricule gauche. Il a été démontré que l'expression de la protéine HuR augmente au niveau du myocarde après une lésion ischémique (Krishnamurthy *et al.*, 2010). L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire joue un rôle important dans l'inhibition de l'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoire dans les monocytes humains et dans les macrophages de souris en provoquant la diminution de la protéine stabilisatrice de l'ARNm de ces cytokines, la HuR, et en inhibant la voie de signalisation p38 (Kishore *et al.*, 1999). En outre, le knock-out de l'IL-10 chez la souris provoque une augmentation de la réponse inflammatoire du myocarde, le dysfonctionnement du ventricule gauche ainsi qu'une fibrose achevée par la mort cellulaire. Ces changements sont associés à une augmentation de l'expression de la protéine HuR au niveau du myocarde (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Les récepteurs β -adrénergiques sont une classe de récepteurs couplés à la protéine G qui, lors de la stimulation avec l'isoprotérénol et d'autres agents vasoactifs, contribuent à différentes maladies, y compris des défauts de la fonction cardiovasculaire (Krishnamurthy *et al.*, 2007). La régulation négative de ces récepteurs dans le cœur provoque l'insuffisance cardiaque et l'IM (Castellano *et al.*, 1997). Quelques études ont montré que la stabilité de l'ARNm du récepteur β 1-adrénergique est contrôlée par les protéines AUF1, HuR et hnRNP-A1 (Misquitta *et al.*, 2001). D'autres études ont démontré que la demie-vie de l'ARNm de la pompe SERCA, qui assure le transport du calcium du RE vers le cytoplasme

pour maintenir la contraction normale des cardiomyocytes, est contrôlée par la protéine HuR *via* la voie de signalisation de la PKC (Doller *et al.*, 2008).

3.2.2. Les RBPs et l'hypertension

L'hypertension est associée au dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et à l'épaississement de la couche de muscle lisse autour du vaisseau (Suresh Babu *et al.*, 2012). L'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) exprimé dans l'endothélium des vaisseaux sanguins et du cœur, joue un rôle crucial dans l'homéostasie cardiovasculaire. En effet, la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) par l'eNOS est importante pour la vascularisation et empêche la prolifération des CMLs (Vanhoutte., 1996). L'expression de l'ARNm de l'eNOS peut être modifiée par des conditions d'hypoxie ou de stress (Forstermann *et al.*, 1998). En cas d'hypertension, l'expression de la HuR est associée à la réduction de l'expression de la guanylyl cyclase soluble (sGC), récepteur du NO endogène chez les mammifères (Kloss *et al.*, 2004).

3.2.3. Les RBPs et l'hypertrophie

L'hypertrophie cardiaque est une réponse adaptée aux stimuli hémodynamique et non hémodynamique, comme l'hypertension et l'IM, et constitue un facteur de risque majeur pour l'insuffisance cardiaque et la mort (Suresh Babu *et al.*, 2012). Les récepteurs de l'angiotensine II (AngII) ont un rôle pathophysiologique important dans l'hypertension, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (Lauth *et al.*, 2001). Le récepteur de l'Ang II type 1 (AT1R) est responsable de la majorité des effets de l'AngII sur le cœur, y compris la contractilité et la croissance des cardiomyocytes (Booz *et al.*, 1996). La surexpression de la HuR conduisait à une augmentation de l'expression de l'AT1R d'une manière dépendante de la séquence 3'UTR et stabilisait son ARNm dans les CMLs de l'artère coronaire (Paukku *et al.*, 2012). De plus, la HuR augmentait la stabilité de l'ARNm du récepteur TLR4 *via* son 3'UTR, ce qui causait une prolifération accrue des CMLs dans les poumons de rats avec hypertrophie du ventricule gauche (Lin *et al.*, 2006).

3.2.4. Les RBPs et la fibrose

La fibrose contribue au dysfonctionnement de la contraction et à l'insuffisance cardiaque (Watson *et al.*, 2012). Des études sur la fibrogenèse ont montré que la fibrose

rénale induite par l'Ang II est caractérisée par la surexpression des gènes pro-fibrinogènes et pro-inflammatoires. Il a été démontré que l'expression de ces derniers est médiée par l'activation de la HuR dans des conditions pathologiques (Doller *et al.*, 2009). De plus, la HuR contrôle l'activité fibrotique du facteur de croissance TGF- β dans le foie (Woodhoo *et al.*, 2012). En outre, des études antérieures ont suggéré que la HuR contrôlait l'expression de la MMP9 (Huwiler *et al.*, 2003), qui est fortement associée à l'augmentation de la réponse fibrotique dans le cœur (Krishnamurthy *et al.*, 2007).

Ces résultats suggèrent que la HuR et les RBPs pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles pour contrôler les maladies cardiovasculaires (**Figure 22**).

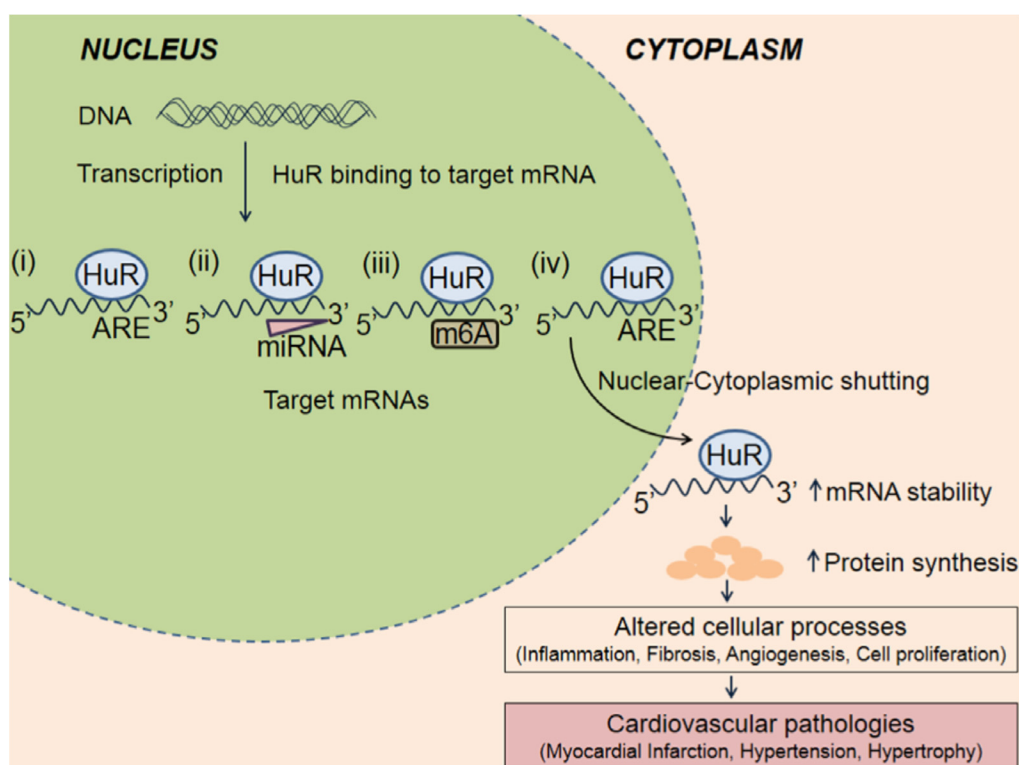


Figure 22 : Mécanismes de stabilisation de l'ARNm par la protéine HuR
(Source : Babu *et al.*, 2015).

3.3. Régulation de l'expression du récepteur LDL *via* son 3'UTR

D'après la littérature, un grand nombre de gènes sont régulés par les motifs AREs de la séquence 3'UTR de leur ARNm, y compris les cytokines, les facteurs de croissance, les gènes suppresseurs de tumeur, les proto-oncogènes, les gènes régulateurs du cycle

cellulaire, les facteurs de transcription et les récepteurs et les protéines membranaires (Eberhardt *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont démontré que l'ARNm du récepteur LDL est labile et possède une demi-vie d'environ 3 h (Nakahara *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2004; Poirier *et al.*, 2014). En outre, certaines de ces études ont démontré que l'activité du récepteur LDL pourrait être régulée par des mécanismes post-transcriptionnels. Par exemple, le traitement des cellules HepG2 avec le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) augmente la stabilité de l'ARNm du récepteur LDL de 2 à 2,5 fois (Wilson *et al.*, 1997). Egalement, Goto *et al.* (1997) ont montré que le médicament gemfibrozil, utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'homme, permettait d'améliorer la stabilité de l'ARNm du récepteur LDL dans les cellules d'hépatome humain en l'augmentant de 4 à 6 fois sans changer le processus de la transcription (Goto *et al.*, 1997). Plusieurs autres molécules induisent la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL *via* son 3'UTR telles que la BBR (Kong *et al.*, 2004), l'acide chenodésoxycholique (CDCA) (Nakahara *et al.*, 2002) et le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) (Yashiro *et al.*, 2013) (Les mécanismes de régulation correspondants sont détaillés dans le chapitre 4).

3.3.1. Structure de la séquence 3'UTR du LDLR

L'ARNm du LDLR est caractérisé par la présence d'une séquence 3'UTR de 2,5 kb de longueur (Yamamoto *et al.*, 1984), dans laquelle trois motifs ARE ont été identifiés grâce à leur ressemblance avec le motif classique UUAUUUAUU; le motif ARE1 (UUUUAUAUAUUUAUU): de +2690 à +2704, le motif ARE2 (UUAUAUAUUUAUUA): de +3257 à +3270 et le motif ARE3 (AUUUGUGUUAUAUUUU): de +3438 à +3454 (Wilson *et al.*, 1998) (**Figure 23**).



Figure 23: Structure de la région 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL
(Source : Kong *et al.*, 2004).

3.3.2. Les RBPs impliquées dans la régulation du LDLR

L'analyse des résultats de spectrométrie de masse réalisée sur la séquence 3'UTR du récepteur LDL a permis d'identifier un total de 35 protéines de liaison à la séquence 3'UTR seule et/ou avec la région codante du récepteur LDL. Ceci suggère que la régulation de la stabilité de l'ARNm du LDLR est médiée par une multitude de facteurs (**Tableau 3**) (Li *et al.*, 2009).

Tableau 3 : Effet de la sous-expression de quelques RBPs sur l'expression de l'ARNm du récepteur LDL (Source : Li *et al.*, 2009, modifié).

<i>si-ARN</i>	<i>Expression du LDLR</i>
<i>Contrôle</i>	+
<i>AUH</i>	-
<i>CPSF1</i>	-
<i>ELAV1/ HUR</i>	+
<i>GRSF1</i>	-
<i>hnRNP D</i>	++
<i>hnRNP I</i>	++
<i>hnRNP L</i>	+
<i>hnRNP M</i>	+
<i>IMP3</i>	++
<i>KSRP</i>	++
<i>SF1</i>	+

Légende : (-) : diminution significative de l'expression du LDLR, (+) aucun effet significatif sur l'expression du LDLR, (++) augmentation significative de l'expression du LDLR.

Parmi ces protéines, au moins 11 RBPs ont été identifiées comme protéines impliquées dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm du LDLR en réponse au traitement avec la BBR. Ces protéines appartiennent à différentes classes ce qui rend le mécanisme de régulation de l'expression de l'ARNm du LDLR complexe. Les protéines hnRNP D, hnRNP I et KSRP régulent négativement l'expression du LDLR en favorisant sa dégradation (Li *et al.*, 2009). La protéine hnRNP D se trouve sous quatre isoformes de 37, 40, 42 et 45 kDa. Dans certains cas, le niveau d'expression de ces isoformes détermine la fonction de la hnRNP D dans la stabilisation ou la déstabilisation de l'ARNm. Il a été

démontré que les isoformes p37 et p42 ont une affinité de liaison plus élevée pour les motifs ARE et ont un effet plus important sur la dégradation de l'ARN (Raineri *et al.*, 2004). Li *et al.* (2009) ont montré que la hnRNP I assurait la dégradation de l'ARNm du LDLR après sa liaison au motif ARE1 alors que la KSR avait plus d'affinité pour les motifs ARE1 et ARE3 (Li *et al.*, 2009). Par contre, Yashiro *et al.* (2013) ont identifié la protéine HuR comme une protéine de liaison au motif ARE1 et ayant un pouvoir stabilisant sur l'expression de l'ARNm du LDLR après traitement des hépatocytes avec AICAR (Yashiro *et al.*, 2013).

4. Les micro-ARNs vs la stabilité de l'ARNm du LDLR

Plusieurs micro-ARN sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'homéostasie du cholestérol, tels que miR-122, miR-370 et miR-33 (Esau *et al.*, 2006). Récemment, deux membres de la famille miR-27 des micro-ARN (miR-27a et miR-27b) ont été identifiés comme des régulateurs importants de l'homéostasie des lipides (Chen *et al.*, 2012). Les données bibliographiques actuelles montrent que l'expression de l'ARNm du LDLR est négativement régulée par miR-27a (Choi *et al.*, 2014) et miR-27b (Chen *et al.*, 2012). MiR-27a pourrait agir directement sur l'expression du LDLR après interaction avec la séquence 3'UTR ou indirectement par l'augmentation de l'expression de PSCK9 (Li and Li., 2015). Yang *et al.* (2014) ont trouvé que miR-185 diminuait l'expression du LDLR d'une façon indirecte, en ciblant la séquence 3'UTR de l'ARNm de SREBP-2 (Yang *et al.*, 2014). De plus, miR-185 régule indirectement l'expression du LDLR par un mécanisme impliquant la protéine KSR (Jiang *et al.*, 2015). Étant donné que le niveau d'expression d'un ARNm spécifique diffère d'un tissu cellulaire à un autre et d'une lignée cellulaire à une autre, l'effet des micro-ARN peut être tissus et cellules spécifique. Par exemple miR-17 est capable de réprimer l'expression du LDLR dans les cellules HeLa, mais il n'a aucun effet dans les cellules HepG2 (Jiang *et al.*, 2015).

CHAPITRE 2 : RÉSUMÉ DU PROJET DE RECHERCHE ET MISE EN CONTEXTE

1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité et de morbidité au Canada et à travers le monde. L'analyse des données démographiques et cliniques ont démontré que la réduction du niveau de cholestérol associé aux LDL-c représente une des plus efficaces stratégies pour ralentir le processus athérosclérotique et réduire la mortalité associée aux maladies coronariennes (Homma., 2004; Nakajima *et al.*, 2008).

Le récepteur des particules LDL, LDLR, est une glycoprotéine transmembranaire présente à la surface des hépatocytes et responsable de la clairance des particules de LDL-c par endocytose. Chez les humains, le récepteur LDL se trouve abondamment au niveau du foie et assure 70 % à 80 % de la clairance totale de LDL-c à partir du plasma. Dans les cas d'hypercholestérolémie où ce mécanisme ne suffit pas, l'augmentation du niveau d'expression hépatique du récepteur LDL pourrait assurer une meilleure clairance de LDL-c de la circulation sanguine. La quantité du récepteur LDL exprimée à la surface des hépatocytes est un déterminant majeur des niveaux de LDL-c dans la circulation. En effet, il existe une corrélation directe entre l'augmentation de l'expression du récepteur LDL dans le foie et la diminution accrue des taux plasmatiques de LDL-c (Brown and Goldstein., 1986; Goldstein and Brown., 1990; Spady., 1992), réduisant ainsi le risque des maladies coronariennes (Grundy., 1998; Ansell *et al.*, 1999; Bays and Stein., 2003).

Durant les deux dernières décennies, plusieurs équipes de recherche se sont focalisées sur les mécanismes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle du récepteur LDL. Il a été démontré que l'extrémité 3' de l'ARNm du récepteur LDL contient une séquence non traduite de 2.5 Kb de longueur dite 3'UTR. Les trois motifs ARE identifiés dans cette séquence jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de l'ARNm du récepteur LDL (Wilson *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998). En effet, les motifs AREs peuvent favoriser la stabilisation ou la déstabilisation de l'ARNm du LDLR après interaction avec les protéines de liaison de l'ARN, les RBPs ou les ARE-BPs (Meyer *et al.*, 2004). Certaines ARE-BPs sont considérées comme des facteurs favorisant la

dégradation de l'ARNm telles que la KSRP et la TTP (Dreyfuss *et al.*, 2002 ; Briata *et al.*, 2011), par contre, d'autres, peuvent stabiliser l'ARNm en augmentant sa demi-vie telles que les protéines appartenant à la famille des Hu (Dreyfuss *et al.*, 2002).

Depuis 1997, les chercheurs se sont penchés sur l'étude des mécanismes de régulation de l'expression du récepteur LDL *via* son 3'UTR. D'ailleurs, plusieurs substances ont été testées telles que le PMA qui a été le premier agent montrant un effet régulateur sur l'expression du récepteur LDL *via* la stabilité de son ARNm (Wilson *et al.*, 1997). D'autres substances ont également montré le même effet sur la régulation de l'expression du LDLR à travers la séquence 3'UTR comme le gemfibrozil (Goto *et al.*, 1997), le CDCA (Nakahara *et al.*, 2002), la BBR (Kong *et al.*, 2004) et l'AICAR (Yashiro *et al.*, 2013). L'effet de la plupart de ces substances sur l'expression du récepteur LDL dépendait fortement de l'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 (Nakahara *et al.*, 2002 ; Kong *et al.*, 2004 ; Yashiro *et al.*, 2013).

2. Problématique

Actuellement, les inhibiteurs de la HMG-CoA, les statines, sont les médicaments les plus répandus et les plus utilisés pour diminuer la concentration plasmatique de LDL-c afin de réduire le taux de morbidité causées par les maladies coronariennes (Moghadasian., 2002; Klotz., 2003).

Cependant, beaucoup de patients traités avec les statines ont montré une certaine résistance au traitement parce qu'ils n'arrivent pas à atteindre une diminution suffisante du taux de LDL-c. D'autres ne tolèrent pas la dose thérapeutique de statines et développent des effets indésirables tels que la myopathie et l'activation accrue des enzymes au niveau du foie (Reiner., 2014). Cette résistance peut être liée à différents facteurs tels que l'absorption, le transport, le métabolisme intra-hépatique et l'excrétion du médicament (Lyudmila *et al.*, 2015).

À la lumière des effets indésirables et inattendus des statines sur la santé, plusieurs équipes de recherche, y compris la nôtre, se sont intéressées à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de diminuer le niveau de LDL-c d'une façon plus efficace et avec moins de risques sur la santé.

3. Hypothèses

Dans notre laboratoire, nous décortiquons de nouveaux mécanismes qui pourraient moduler l'expression du LDLR au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Nous avons récemment identifié la 5-AzaC comme un régulateur positif de l'expression de l'ARNm du LDLR hépatique. La 5-azaC est un analogue nucléosidique de la cytidine qui peut être incorporé dans l'ADN et l'ARN et agit comme un agent de modification épigénétique en inhibant l'activité de l'ADN méthyltransférase (DNMT). Elle est caractérisée par un pouvoir diméthylant peu efficace ($\approx 10\%$ seulement incorporés dans l'ADN). De plus, la 5-AzaC est un antimétabolite capable de perturber le métabolisme des pyrimidines contribuant ainsi à un effet antinéoplasique.

En se basant sur les études antérieures et nos résultats préliminaires qui montraient l'augmentation de l'expression de certains gènes (**Figure 24**) et l'activation de la voie de signalisation (ERK1/2) après 24 h de traitement avec la 5-AzaC, nous avons émis l'hypothèse principale que la 5-AzaC stabiliserait l'ARNm du LDLR *via* la séquence non traduite 3'UTR et que cet effet nécessiterait l'activation de la voie ERK1/2 par un mécanisme impliquant IRE1 α et EGFR.

4. Les objectifs du projet

Les objectifs de ce projet de doctorat sont regroupés en trois volets.

- Dans le premier volet, les objectifs étaient d'élucider les voies de signalisation activées par la 5-AzaC et leurs rôles dans la stabilisation du LDLR.
- Dans le second volet, les objectifs étaient de savoir si l'effet de la 5-AzaC sur le LDLR est dépendant du stress au niveau du RE pour pouvoir expliquer l'augmentation de l'expression du gène IRE1 α .
- Dans le troisième volet, les objectifs étaient d'étudier la régulation post-transcriptionnelle du LDLR *via* la séquence 3'UTR et d'identifier le mécanisme de cette régulation.

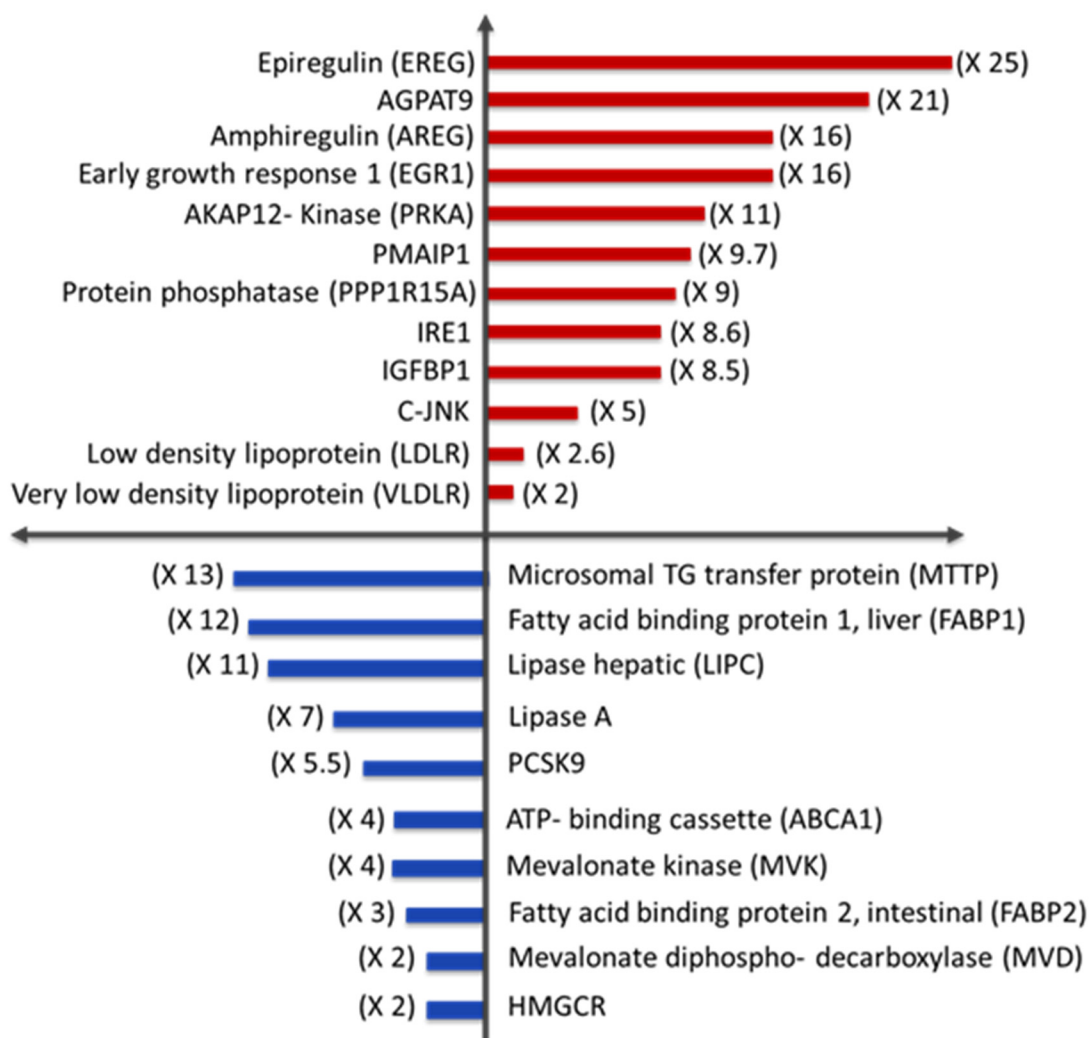


Figure 24 : Profils de l'expression des gènes après 24h de traitement des cellules HepG2 avec 10 μM de la 5-AzaC. (Source : Poirier *et al.*, 2014).

CHAPITRE 3 : CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

1. Article 1

TITRE

5-Azacytidine Engages an IRE1 α -EGFR-ERK1/2 Signaling Pathway that Stabilizes the LDL Receptor mRNA.

AUTEURS

Nourhen Mnasri, Maya Mamarbachi, Bruce G. Allen et Gaétan Mayer.

JOURNAL

Publié dans le journal « *BBA Gene Regulatory Mechanisms 1861 (2018) 29–40* ».

5-Azacytidine Engages an IRE1 α -EGFR-ERK1/2 Signaling Pathway that Stabilizes the LDL Receptor mRNA

Nourhen Mnasri^{1,4}, Maya Mamarbachi², Bruce G. Allen^{3,5}, Gaétan Mayer^{1,6,*}

¹Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Montreal Heart Institute, Montréal, QC, Canada.

²Molecular Biology Core Facility, Montreal Heart Institute, Montréal, QC, Canada.

³Laboratory of Cell Biology, Montreal Heart Institute, Montréal, QC, Canada.

Departments of ⁴Biomedical Sciences and ⁵Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

⁶Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

* Corresponding author: Gaétan Mayer, email gaetan.mayer@icm-mhi.org

Running title: A Novel Signaling Pathway for LDLR mRNA Stabilization

Keywords: Low-density lipoprotein receptor (LDLR), Hepatocytes, 5-Azacytidine, mRNA stabilization, 3'-UTR, AU-rich elements, IRE1 α /EGFR

Authorship: NM designed and performed experiments, interpreted the results and wrote the manuscript. MM helped in generating cDNA constructs. BGA provided samples and revised the manuscript. GM designed the experiments, interpreted the results and wrote the manuscript.

Abstract

Hepatic low-density lipoprotein receptor (LDLR) is the primary conduit for the clearance of plasma LDL-cholesterol and increasing its expression represents a central goal for treating cardiovascular disease. However, LDLR mRNA is unstable and undergoes rapid turnover mainly due to the three AU-rich elements (ARE) in its proximal 3'-untranslated region (3'-UTR). Herein, our data revealed that 5-azacytidine (5-AzaC), an antimetabolite used in the treatment of myelodysplastic syndrome, stabilizes the LDLR mRNA through a previously unrecognized signaling pathway resulting in a strong increase of its protein level in human hepatocytes in culture. 5-AzaC caused a sustained activation of the inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) kinase domain and c-Jun N-terminal kinase (JNK) independently of endoplasmic reticulum stress. This resulted in activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) that, in turn, stabilized LDLR mRNA. Systematic mutation of the AREs (ARE1-3) in the LDLR 3'UTR and expression of each mutant coupled to a luciferase reporter in Huh7 cells demonstrated that ARE1 is required for rapid LDLR mRNA decay and 5-AzaC-induced mRNA stabilization *via* the IRE1 α -EGFR-ERK1/2 signaling cascade. The characterization of this pathway will help to reveal potential targets to enhance plasma LDL clearance and novel cholesterol-lowering therapeutic strategies.

Introduction

The discovery of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) and the subsequent elucidation of its mode of action *in vitro* and *in vivo* have provided a conceptual framework for understanding the mechanisms that control the concentration of the most important cholesterol-carrying lipoproteins in human blood (Goldstein and Brown, 2009). LDLR is a transmembrane glycoprotein that mediates the clearance of lipoprotein particles composed of apolipoprotein B100 (ApoB100) such as low-density lipoproteins (LDL) or apolipoprotein E such as chylomicron-remnants and intermediate-density lipoproteins (IDL) from the plasma. LDLs are the major cholesterol carriers in the blood and transport approximately 65-70% of plasma cholesterol in humans. Numerous genetic and epidemiological studies have provided conclusive evidence that levels of circulating LDL-cholesterol (LDLc) are strongly and positively correlated with atherosclerosis progression and higher risk of major cardiovascular events (O'Keefe et al., 2004; Teslovich et al., 2010). Therefore, management of cholesterol levels is essential for the prevention and treatment of cardiovascular disease (Baigent et al., 2010).

In humans, more than 70% of the total clearance of plasma LDL occurs through the LDLR in the liver (Spady, 1992). Cell surface LDLR binds LDL particles through ApoB100, the sole protein constituent of LDL, and the complexes are internalized through clathrin-dependent endocytosis. At the acidic pH of endosomes, the LDL particle dissociates from the receptor and is delivered to lysosomes where it is hydrolyzed into amino acids, fatty acids and free cholesterol. The LDLR can escape lysosomal degradation and is recycled to the cell surface for another cycle. The intracellular LDL-derived cholesterol suppresses the activation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and blunts transcription of LDLR and enzymes involved in cholesterol biosynthesis (Brown and Goldstein, 1999).

A single copy of mutant *LDLR* gene can result in dysfunctional LDLR and cause heterozygous familial hypercholesterolemia (FH), the most common autosomal dominant disorder, which affects about 1 in 200-250 individuals and even more in certain populations (Bouhairie and Goldberg, 2015). Mutations in *ApoB100* or in *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*, a natural inducer of LDLR degradation, are the two other known causes of FH. FH heterozygotes, which inherit one mutant *LDLR* allele, have a 50%

deficiency of LDLR and exhibit a two- to five-fold increase in plasma LDLc from birth. These individuals are at high risk of heart attacks as early as ~30 years of age. In the United States and Western Europe, about 5% of all individuals who have a myocardial infarction before age 60 are FH heterozygotes (Bouhairie and Goldberg, 2015). The receptor defect impairs the catabolism of LDL, and the resultant elevation in plasma LDLc promotes deposition of cholesterol in coronary arteries and premature atherosclerosis (De Castro-Oros et al., 2010). Homozygous FH, which is very rare and a much more severe form of the disease, affect ~1 in 1 million people worldwide. FH homozygotes often develop skin and tendon xanthomas by age 10, and untreated people rarely live beyond age 30.

The expression of LDLR is regulated at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels. At the transcriptional level, *LDLR* gene expression is mainly controlled by the transmembrane transcription factor SREBP-2 in response to the accumulation or depletion of intracellular cholesterol (Horton et al., 2003; Maxwell et al., 2003). In cholesterol-depleted cells, SREBP-2 is transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex where it undergoes two proteolytic cleavages. A cytosolic N-terminal fragment, representing the active basic helix-loop-helix transcription factor, is released and enters the nucleus to activate transcription of genes encoding all the enzymes of cholesterol biosynthesis as well as the LDLR. In cholesterol-rich cells, the transport of SREBP-2 to the Golgi complex is blocked and the transcription of the target genes declines, thus preventing cholesterol overload. This mechanism is essential for the action of statin drugs in lowering plasma LDLc levels in individuals at risk for coronary heart disease. Ingested statin drugs are routed primarily to the liver and lower cholesterol production through 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibition. This decrease in liver cholesterol activates SREBP-2 processing as described above and increase the number of LDLR displayed on liver cell membranes (Goldstein and Brown, 2009).

At the post-translational level, PCSK9 and the inducible degrader of LDLR (IDOL) are involved in the lysosomal degradation of LDLR through different mechanisms (Poirier and Mayer, 2013; Zelcer et al., 2009). PCSK9 binds to the LDLR-EGF-A domain at the cell surface and, following endocytosis of the complex, inhibits LDLR endosomal recycling thereby targeting the receptor for lysosomal degradation. IDOL-mediated LDLR

degradation is activated by the sterol-sensitive nuclear liver X receptor. LXR ligands induce the transcription of IDOL, an E3 ubiquitin ligase, which triggers ubiquitination of the cytosolic tail of LDLR and its lysosomal degradation.

The control of mRNA stability is a critical regulatory mechanism of gene expression (Barreau et al., 2005). However, little is known about the precise mechanism involved in post-transcriptional regulation of LDLR mRNA. Several studies including our own have shown that LDLR mRNA is degraded at a relatively rapid rate with a half-life of approximately 1-2 hours in human hepatic HepG2 cells (Kong et al., 2004; Poirier et al., 2014; Yashiro et al., 2013). It has been previously reported that the plant alkaloid compound berberine can regulate LDLR gene expression through mRNA stabilization in an ERK1/2-dependent manner (Kong et al., 2004). We recently showed that the DNA methylation inhibitor 5-Azacytidine (5-AzaC), an anti-cancer drug that has been approved for the treatment of patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) (Estey, 2013), increases LDLR expression in HepG2 cells (Poirier et al., 2014). While the expression of several genes involved in lipid metabolism (e.g. PCSK9, HMG CoA reductase and SREBP-2) was strongly decreased, we showed that, independently of its DNA demethylating activity, 5-AzaC selectively stabilized LDLR mRNA and greatly increased its protein expression level.

Previous studies showed that stability of rapidly degraded mRNA is controlled through the 3'-untranslated region (3'UTR) that contains AU-rich elements (AREs) (Caput et al., 1986). In LDLR, three AREs, named ARE1, 2 and 3, were identified in the proximal 3'UTR based on their similarity to the nonameric motif UUAUUUAUU. Insertion of only one copy of this element into a heterologous fusion mRNA significantly accelerates fusion mRNA turnover and multiple overlapping copies are even more potent at destabilizing the mRNA (Wilson et al., 1998; Zubiaga et al., 1995). It was shown that insertion of the ARE1 sequence of LDLR-3'UTR into a β -globin fusion mRNA increased its turnover rate by 3-fold, whereas constructs with all three AREs have a 10-fold higher mRNA turnover rate (Wilson et al., 1998). Several ARE-binding proteins (ARE-BP) have been shown to regulate the fate of target ARE-containing mRNAs (Abdelmohsen et al., 2007; Hitti et al., 2006). Some ARE-BP, such as the ubiquitously expressed RNA-binding protein HuR, bind and stabilize ARE-containing mRNAs (Abdelmohsen et al., 2007). In contrast, others,

including tristetraprolin and KH-type splicing regulatory protein, are decay promoting factors that interact with AREs and recruit the mRNA degradation machinery (Gherzi et al., 2004).

In this study, we sought to elucidate the mechanism by which 5-AzaC up-regulates LDLR expression in human hepatocytes. Our results show that 5-AzaC-induced LDLR mRNA stabilization is triggered by the activation of the inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) kinase domain independently of its RNase domain and of ER stress. IRE1 α kinase activity recruited a signaling pathway resulting in the activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), which induced LDLR mRNA stabilization. Our data demonstrate that LDLR-3'UTR ARE1 is required for 5-AzaC-induced mRNA stabilization *via* the IRE1 α -EGFR-ERK1/2 signaling cascade.

Results

5-AzaC-induced upregulation of hepatic LDLR expression requires ERK1/2 activation

We previously observed that treatment with 5-AzaC lead to increased LDLR mRNA and protein levels in human hepatic cell lines (Poirier et al., 2014). Therefore, herein we sought to determine the mechanism(s) leading to the increase in LDLR expression. Treatment of HepG2 and Huh7 cell lines with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours increased LDLR protein levels by ~3-fold (Figure 1A, upper and lower panels), which is correlated with significant stabilization of its mRNA (Figure 1B). Similar to the alkaloid compound berberine, which stabilizes LDLR mRNA through an ERK-dependent pathway (Kong et al., 2004), increased LDLR protein levels following treatment with 5-AzaC were concomitant to the activation of ERK1/2 (Figure 1A, upper and lower panels). Our results also showed that 5-AzaC increases LDLR and p-ERK1/2 expression in a time-dependent manner and that ERK1/2 activation occurred 2 hours before the increase in LDLR protein level (Figure 1C, upper and lower panels). Confocal immunofluorescence microscopy showed that 5-AzaC increased intracellular and cell surface LDLR in both Huh7 and HepG2 cell lines compared with DMEM treated cells (control; Figure 1D). In comparison with berberine, 5-AzaC induced a greater increase in both LDLR and p-ERK1/2 protein expression; in both cases, pretreatment with the MEK1/2 inhibitor U0126 abolished this increase (Figure 1E).

EGFR and JNK signaling pathways are involved in LDLR upregulation

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) is a direct activator of protein kinase C and a potent activator of ERK1/2 signaling (Verin et al., 2000). However, incubation of Huh7 cells with PMA, which transiently activated ERK1/2, did not increase LDLR protein level (Supplementary Figure S1A and S1B). In addition, a previous study reported that 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), an activator of AMP kinase, stabilizes LDLR mRNA via an ERK-dependent pathway in HepG2 cells (Yashiro et al., 2013). After 24 hours of treatment in Huh7 cells, AICAR and 5-AzaC increased ERK1/2 phosphorylation to similar levels; however, AICAR failed to increase LDLR protein expression (Supplementary Figure S1C). In the same vein, inhibition of AMP kinase activity with Compound C (Zhou et al., 2001) had no effect on the 5-AzaC-induced increase in LDLR protein expression (Supplementary Figure S1D).

ERK1/2 signaling can be increased when a specific receptor tyrosine kinase is activated by its extracellular ligand (McKay and Morrison, 2007). Data extracted from our previous genome-wide microarray analyses of 5-AzaC-treated hepatocytes (Poirier et al., 2014) showed a strong increase in amphiregulin (AREG) (16-fold increase) and epiregulin (EREG) (25-fold increase) mRNA (Table 1). AREG and EREG are ligands for the epidermal growth factor receptor (EGFR), a receptor tyrosine kinase, and are involved in multiple biological responses, including cell survival and proliferation (Berasain and Avila, 2014; Riese and Cullum, 2014). We first confirmed that AREG and EREG mRNA expression was strongly upregulated by 5-AzaC using real-time quantitative PCR (qPCR) and noted that their expression greatly increased, from 75- to 25-fold, after 6 and 24 hours of treatment (Figure 2A). We next examined the effect of 5-AzaC on EGFR autophosphorylation (phosphoY1068) (p-EGFR) after 6 and 24 hours of treatment in the absence or presence of the specific EGFR tyrosine kinase inhibitor, PD153035 (Bridges et al., 1996). A 2-fold increase in p-EGFR level was observed after 6 hours of treatment with 5-AzaC (Figure 2B), which was then reduced after 24 hours (Figure 2C). The reduction of EGFR and p-EGFR likely represent the ligand-stimulated endocytosis of occupied receptors and subsequent intracellular degradation of both ligand and receptor (Zwang and Yarden, 2009). The use of PD153035 (10, 15 or 20 μ M) abolished the effect of 5-AzaC on EGFR phosphorylation (Figures 2B and 2C) and prevented the increase in LDLR protein

expression and ERK1/2 activation (Figure 2D). Cell treatment with PD153035 alone did not affect the protein level of LDLR despite a decrease in its mRNA expression (Supplementary Figures S2A and S2B).

C-Jun is a transcription factor activated downstream of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling. Expression of c-Jun increased by 5-fold in hepatocytes treated with 5-AzaC (Table 1). C-Jun was previously found to modulate EREG expression (Auf et al., 2013) and binds AREG promoter (Rosenbloom et al., 2013) (UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>) thus providing a possible molecular pathway for the observed increase in expression of EGFR ligands (Figure 2A). Therefore, we used the pan-JNK inhibitor SP600125, which was shown previously to repress EREG expression (Auf et al., 2013), to examine the possible involvement of c-Jun in 5-AzaC-induced stabilization of LDLR mRNA. Treatment of Huh7 cells with SP600125 partially prevented 5-AzaC-mediated increase in AREG mRNA expression by ~50% ($p < 0.01$) and the same tendency was found for EREG mRNA expression, which was decreased by ~40% but did not reach statistical significance (Figure 2E). While cell treatment with SP600125 alone had no effect on LDLR protein and mRNA expression (Supplementary Figures S2C and S2D), it resulted in the inhibition of 5-AzaC-induced ERK1/2 activation and upregulation of LDLR mRNA and protein expression (Figure 2E and 2F).

5-AzaC activates IRE1 α kinase domain but not ER stress

Our microarray results showed an 8.6-fold increase in inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1 α) (also called ER to nucleus signaling 1 (ERN1)) mRNA expression after treatment of HepG2 cells with 5-AzaC for 24 hours (Table 1). In Huh7 cells treated with 5-AzaC, our qPCR data showed a 2-fold increase in IRE1 α mRNA expression, which was likely not caused by the stabilization of its mRNA (Supplementary Figures S3A and S3B). IRE1 α is an ER-resident transmembrane protein that possesses both intrinsic endoribonuclease and kinase activities. It is important in altering gene expression and JNK activation in response to ER-based stress signals (Urano et al., 2000). To determine if 5-AzaC induces ER stress and activates IRE1 α through the unfolded protein response (UPR), which could then activate the JNK pathway and the expression of EGFR ligands, we first compared its effect with that of thapsigargin, a positive control for ER stress induction (Poirier et al., 2015).

While both 5-AzaC and thapsigargin increased the level of IRE1 α (Figure 3A), only thapsigargin induced the accumulation of ER-stress markers CHOP, p-eIF2 α and GRP78 (Figure 3A-C). In addition to inducing ER stress, and in contrast to 5-AzaC, thapsigargin caused a decrease of LDLR protein expression and did not activate the ERK pathway (Figure 3C). In the UPR, IRE1 α undergoes oligomerization and trans-autophosphorylation, resulting in conformational changes and activation of the endoribonuclease domain (Papa et al., 2003). Through its RNase activity, IRE1 α removes a 26-nucleotide intron from the X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA, converting unspliced XBP1 (uXBP1: inactive) into spliced XBP1 (sXBP1: active), which then drives the transcription of ER-stress responsive genes (Yoshida et al., 2001). As expected, thapsigargin induced IRE1 α RNase activity and splicing of XBP1, as shown by the appearance of sXBP1 mRNA, but, surprisingly, no XBP1 splicing was found in 5-AzaC-treated Huh7 cells (Figure 3D). Furthermore, to verify if ER stress is involved in the signaling pathway activated by 5-AzaC, we used the bile acid tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a chemical chaperone and inhibitor of ER stress (Malo et al., 2010). In control experiments with thapsigargin, which reduced LDLR protein level and increased IRE1 α and GRP78 expression, TUDCA significantly decreased GRP78 level, indicating reduced ER stress (Figure 3E). However, TUDCA had no effect on the 5-AzaC-induced activation of ERK1/2 and increase in LDLR expression (Figure 3F). Taken together, these data demonstrate that 5-AzaC induces the expression of IRE1 α but not ER stress.

To determine if IRE1 α plays a role in 5-AzaC-induced ERK1/2 activation and LDLR expression, we tested the function of its endoribonuclease and kinase domains using specific inhibitors. We first used the IRE1 α kinase inhibitor Kira 6 (IRE1 α Kinase Inhibiting RNase Attenuator 6) (Ghosh et al., 2014), which did not significantly reduced LDLR protein expression while slightly decreasing its mRNA level by ~20% when incubated alone with Huh7 cells (Supplementary Figure S3C and S3D). Inhibition of IRE1 α kinase activity, which is required for IRE1 α autophosphorylation and RNase activity in the UPR, prevented thapsigargin from inducing XBP1 splicing and the expression of ER stress markers GRP78 and IRE1 α , demonstrating the efficiency of Kira 6 (Figure 4A and 4B). We next examined the effects of inhibiting IRE1 α kinase activity on the actions of 5-AzaC. Treatment of cells with Kira 6 significantly decreased the ability of

5-AzaC to increase AREG, EREG and LDLR mRNA levels (Supplementary Figure S4A-C). Importantly, in 5-AzaC-treated cells, Kira 6 completely prevented the increase in LDLR and IRE1 α protein levels and ERK1/2 activation (Figure 4C). In support of these data, an siRNA-mediated knockdown of IRE1 α , which decreased IRE1 α expression by ~70% and reduced LDLR protein expression and ERK1/2 activation by ~50% under basal conditions, significantly blunted the increase in LDLR protein expression following treatment with 5-AzaC (Supplementary Figure S4D). However, possibly because of the incomplete knockdown, the decrease in IRE1 α expression only partially inhibited ERK1/2 activation in 5-AzaC-treated cells. Similar to the pharmacological blockade of IRE1 α with Kira 6, the use of a specific inhibitor of the IRE1 α RNase domain, STF-083010 (Papandreou et al., 2011), significantly blocked the effect of thapsigargin and ER stress on GRP78 and IRE1 α expression and on XBP1 splicing (Figure 4D and 4E). However, STF-083010, which slightly reduced LDLR protein level but not its mRNA when incubated alone with Huh7 cells (Supplementary Figure S3E and S3F), did not prevent the effects of 5-AzaC on LDLR and IRE1 α expression and ERK1/2 activation (Figure 4F). Consistent with these results, both transient and stable overexpression of IRE1 α with an inactivated endonuclease domain (IRE1 α -K907A), which do not induce XBP1 splicing as compared to thapsigargin or IRE1 α -WT overexpression, did not modify the response of Huh7 cells following a 24-hour treatment with 10 μ M 5-AzaC (Supplementary Figure S4E-I). Taken together, these data indicate that the kinase activity of IRE1 α is specifically involved in the 5-AzaC-induced increases in EGFR ligands and LDLR expression and ERK activation.

5-AzaC increases the stability of LDLR mRNA through the 5' proximal region of its 3'UTR

The stability of LDLR mRNA is regulated by cis-acting elements in its 3'UTR (Wilson et al., 1998). LDLR mRNA contains a 2.5-kb-long 3'UTR harboring three ARE in the 5' proximal region (Figure 5A), which are responsible for the rapid degradation of LDLR mRNA. To determine if the 3'UTR ARE mediate the stabilization of LDLR mRNA induced by 5-AzaC, we inserted the first 904 base pairs of hLDLR-3'UTR, which contain the three ARE (ARE1-ARE3), into the Gaussia luciferase reporter plasmid in 3' to the luciferase coding sequence (pLuc-hLDLR 3'UTR) (Figure 5A). Huh7 cells were transfected either with the control plasmid (pLuc) or with pLuc-hLDLR 3'UTR and, 24

hours after transfection, the cells were treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for another 24 hours. Cell media were recovered and secreted Gaussia luciferase activity was measured and normalized to the total cell protein content. Our results showed that 5-AzaC increased the luciferase activity by 2.5-fold specifically in the media of pLuc-hLDLR 3'UTR transfected cells (Figure 5B and C) but not in cells transfected with the luciferase without hLDLR 3'UTR (pLuc) (Figure 5D). Hence, as pLuc and pLuc-hLDLR 3'UTR were both under control of a CMV promoter, 5-AzaC increased the stability of the luciferase-hLDLR 3'UTR transcript through regulatory sequences present in the 5' proximal region of the hLDLR 3'UTR (nt 1-904). Importantly, the inhibitors of MEK1/2 (U0126) and EGFR tyrosine kinase activity (PD153035) completely reversed the effect of 5-AzaC on luciferase activity as measured in the media of cells transfected with pLuc-hLDLR 3'UTR (Figures 5B and 5C). Therefore, these findings are in agreement with the involvement of EGFR and ERK1/2 signaling pathways in the stabilization of LDLR mRNA and subsequent increase in LDLR expression induced by 5-AzaC (Figures 1E and 2D).

ARE1 is crucial for the 5-AzaC-induced LDLR mRNA stabilization

To determine the region in the 3'UTR of the LDLR transcript that is targeted by the actions of 5-AzaC, we generated mutants of the hLDLR 3'UTR in the first (Mut-ARE1), second (Mut-ARE2) or third (Mut-ARE3) ARE (Figure 6A). In addition, four repeats of the tetranucleotide UCAU are clustered between ARE1 and ARE2 and are known to be required for the regulation of some mRNAs (Sugiura et al., 2003). These UCAU repeats were mutated alone (Δ UCAU) or together with ARE1 (Mut-ARE1- Δ UCAU) (Figure 6A). Wild-type (WT) hLDLR-3'UTR or each of the mutant constructs, inserted in the Gaussia luciferase plasmid, was transiently transfected into Huh7 cells and the cells were treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. The analysis of luciferase activity in cell media revealed that ARE3, ARE2 and Δ UCAU mutants had only a small influence on the ability of 5-AzaC to increase luciferase activity in the media. However, in 5-AzaC-treated cells expressing the ARE1 mutants, hLDLR 3'UTR-Mut-ARE1 or hLDLR 3'UTR-Mut-ARE1- Δ UCAU, the luciferase activity was not significantly higher than control (DMEM)-treated cells (Figure 6B). Therefore, these results strongly suggest that ARE1 in

the 5' proximal region of the 3'-UTR in LDLR mRNA is required for 5-AzaC to increase the stability of the LDLR mRNA.

Discussion

In humans, a high concentration of LDLc in the blood is directly involved in the development of premature atherosclerosis and is a strong predictor of the risk of major coronary events such as myocardial infarction. LDLR-mediated plasma LDLc clearance is of utmost importance to prevent early death from cardiovascular disease. Pharmacological approaches that increase LDLR expression are required to treat hypercholesterolemia and orally ingested small molecule therapy such as statin therapy is the most convenient approach. In the present study, we uncovered a new signaling pathway, triggered by the small molecule 5-AzaC, which stabilizes LDLR mRNA and results in a strong increase of its protein level in hepatocytes. Our results showed that 5-AzaC specifically activates the IRE1 α kinase domain independently of ER stress. IRE1 α kinase activity, an upstream mediator of JNK signaling (Urano et al., 2000), induced the expression of EGFR ligands AREG and EREG. The resulting activation of EGFR, which triggers the classical Ras-Raf-MEK-ERK pathway (McCubrey et al., 2007; Roberts and Der, 2007), provoked the stabilization of the LDLR mRNA through the ARE1 motif in its 3'UTR sequence (Figure 7).

Previous studies reported that the LDLR mRNA is labile but that it can be stabilized in the presence of different small molecule compounds such as berberine (Kong et al., 2004), canadine (Abidi et al., 2006), AICAR (Yashiro et al., 2013), gemfibrozil (Goto et al., 1997) or chenodeoxycholic acid (Nakahara et al., 2002). While the mechanism of LDLR mRNA stabilization by canadine and gemfibrozil is still unknown, berberine, AICAR and chenodeoxycholic acid stabilize LDLR mRNA through an ERK1/2-dependent pathway and involve the LDLR 3'UTR. We previously demonstrated that the effect of 5-AzaC on LDLR expression is independent of SREBP-mediated transcriptional regulation as 5-AzaC reduced SREBP activation and downregulated the expression of genes controlled by this transcription factor (Poirier et al., 2014). In this study, we showed that 5-AzaC induces a strong increase of LDLR protein levels by stabilizing its mRNA and thereby increasing its protein expression by ~3-fold. Our findings indicate that 5-AzaC promotes LDLR mRNA stabilization through an AMPK- and PKC-independent pathway. Indeed, 5-AzaC-induced

LDLR stabilization was not affected by the use of the PKC activator PMA or by activating or inactivating AMPK with AICAR or with Compound C, respectively, after 24 hours of treatment (Supplementary Figure S1A-D). It was reported previously that PMA treatment stabilized and increased LDLR mRNA level in HepG2 cells after 4 hours but that it returned to basal levels after 24 hours (Wilson et al., 1997). In agreement, our results showed that PMA, which activated ERK1/2 within 15 min, did not raise phospho-ERK1/2 and LDLR expression after 24 hours of treatment (Supplementary Figure S1A and S1B). In addition, unlike 5-AzaC, it was shown that PMA-induced stabilization of LDLR mRNA requires sequences in the distal region of the UTR, near Alu-like repetitive elements (Wilson et al., 1998). Similarly, AICAR-dependent LDLR mRNA and protein up-regulation was shown to be transient when measured over 8 hours in HepG2 cells (Yashiro et al., 2013). Accordingly, our results showed that 24 hours after treatment with 0.5 mM AICAR, ERK1/2 was still activated but LDLR expression was not increased (Supplementary Figure S1C). This is in contrast to 5-AzaC for which ERK1/2 activation, detected within 2 hours after treatment, was sustained and was required for LDLR stabilization after 24 hours of treatment (Figures 1C and 1E).

Cognate EGFR ligands AREG and EREG were found to be the most upregulated genes associated with 5-AzaC treatment in HepG2 cells, indicating a possible ligand-driven EGFR signaling and activation (Table 1) (Poirier et al., 2014). Herein, we confirmed that 5-AzaC strongly increased the mRNA expression of AREG and EREG as well as the activation of EGFR after 6 hours of treatment in Huh7 cells (Figures 2A and 2B). In support of a possible link between EGFR signaling and LDLR expression, Guo and colleagues reported a rapid increase in the mRNA expression and protein level of LDLR after stimulating U87 glioblastoma cells with EGF to activate the EGFR (Guo et al., 2011). EGFR signaling is well known to induce the activation of ERK1/2, (Roberts and Der, 2007) and, indeed, inhibition of EGFR phosphorylation with PD153035 was found to antagonize 5-AzaC-induced ERK1/2 activation and LDLR up-regulation (Figure 2B-D).

5-AzaC raised c-Jun expression 5-fold in HepG2 cells, indicating that the JNK pathway could be involved in LDLR regulation (Table 1). A previous study demonstrated that treatment of HepG2 cells with PMA transiently stabilized LDLR mRNA through the activation of JNK and that sustained activation of this signaling pathway enhanced the

production of functional LDLR (Vargas et al., 2009). Moreover, the JNK pathway is involved in the stabilization of other ARE-containing mRNAs, including those of IL-2, IL-3 and inducible nitric oxide synthase (Chen et al., 1998; Korhonen et al., 2007; Ming et al., 1998). Interestingly, among potent activators of JNK are UV irradiation, reactive oxygen species, cytokines, and ER stress (Kyriakis et al., 1994; Srivastava et al., 1999). Activation of JNK by ER stress was shown to require IRE1 α (Urano et al., 2000), which is markedly increased in hepatocytes treated with 5-AzaC (Table 1 and Figures 3 and 4). In addition, chemical inhibition of JNK using the SP600125 compound was shown to significantly reduce AREG and EREG expression (Auf et al., 2013; Meng et al., 2015) demonstrating a link between JNK activation, IRE1 α and the expression of growth factors AREG and EREG (Auf et al., 2013). Our data showed that blockade of the JNK pathway with the SP600125 compound greatly reduced the effect of 5-AzaC on the expression of AREG and followed the same trend for EREG (Figure 2E). Inhibition of JNK also significantly decreased the 5-AzaC-induced ERK1/2 activation and LDLR mRNA and protein expression (Figures 2E and 2F) strongly supporting the involvement of the JNK pathway in LDLR stabilization.

We initially suspected that 5-AzaC could induce ER stress, since IRE1 α mRNA expression was highly increased after 24h of treatment (Table 1). ER stress is triggered under various physiological and pathological conditions, such as exposure to chemotherapeutic agents and accumulation of misfolded proteins. Accumulation of misfolded proteins in ER lumen causes UPR and results in the expression of proteins such as GRP78 and CHOP, phosphorylation of eIF2 α or activation of IRE1 α RNase domain and XBP1 mRNA splicing (Hetz, 2012). However, unlike thapsigargin, a known inducer of ER stress, the treatment of Huh-7 cells with 5-AzaC did not increase GRP78, p-eIF2 α or CHOP protein levels (Figure 3A-C) and did not activate the splicing of XBP1 (Figure 3D). Pre-treatment of Huh-7 cells with TUDCA, a specific inhibitor of total ER stress, significantly decreased the effect of thapsigargin on the expression of GRP78 but did not affect 5-AzaC-induced IRE1 α expression, ERK1/2 activation and LDLR upregulation (Figures 3E and 3F). In addition, Huh-7 cells transiently or stably expressing the IRE1 α K907A (RNase-defective) mutant (Tirasophon et al., 2000) still responded to 5-AzaC treatment by increasing ERK1/2 activation and LDLR expression (Supplementary Figure S4E-G).

Altogether, these results indicated that ER stress and IRE1 α RNase activity are not involved in 5-AzaC-induced LDLR mRNA stabilization. Indeed, inhibition of IRE1 α RNase domain by ST-083010, which reversed the effect of thapsigargin and prevented XBP1 splicing, did not reduce the effect of 5-AzaC on ERK1/2 activation and LDLR levels (Figure 4D-F). Next, we evaluated the possible contribution of IRE1 α kinase domain for LDLR stabilization. The specific IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 significantly decreased the effect of 5-AzaC on p-ERK1/2, IRE1 α and LDLR levels (Figure 4C) strongly suggesting that the IRE1 α kinase domain plays a major role in LDLR mRNA stabilization. Other examples of unconventional activation and alternative role of the IRE1 α kinase domain were recently reported. Independently of ER stress, a small molecule ATP-mimic can activate the IRE1 α kinase domain (Mendez et al., 2015). Similarly, Auf et al. showed that the IRE1 α kinase domain, independently of the RNase domain, is capable of mediating JNK activation, EREG production and EGFR signaling to promote autocrine growth of human U87 glioma cells (Auf et al., 2013).

The 3'UTR ARE sequences are the most studied and most important 3'UTR regions in determining mRNA stability (Shaw and Kamen, 1986; Wilson et al., 1998). A number of mRNA species with a short half-life are degraded in an ARE-dependent manner (Abdelmohsen et al., 2007; Hitti et al., 2006). The 3'UTR of human LDLR mRNA contains three AREs responsible for its rapid turnover (Kong et al., 2004; Yashiro et al., 2011). Two ARE-BP that specifically interact with LDLR mRNA, ZFP36L1 and ZFP36L2, were shown to destabilize LDLR mRNA through binding the ARE1 sequence while ERK activation was shown to inhibit this activity thereby increasing LDLR expression (Adachi et al., 2014). Other 3'UTR ARE-BP may also be involved in LDLR mRNA stability but their selectivity toward LDLR remains unclear (Li et al., 2009). Our results demonstrated that 5-AzaC-induced stabilization of LDLR mRNA involves its 3'UTR and that EGFR and ERK1/2 activation is essential to stabilize the receptor mRNA. We identified the LDLR mRNA ARE1 sequence as a critical cis-regulatory element required for the 5-AzaC-induced LDLR upregulation through the IRE1 α /JNK-EGFR-ERK1/2 signaling pathway. While the LDLR 3'UTR ARE-BP mediating the stabilizing effect this signaling pathway remain to be identified, we surmise that cytoplasmic ARE-BP activated by ERK1/2 signalling, such as HuR (Yashiro et al. 2013), could be involve in 5-AzaC-mediated LDLR

mRNA stabilization. Another possibility would be that 5-AzaC reduces the binding of a destabilizing ARE-BP such as hnRNP I or KSRP to the LDLR mRNA 3'UTR (Li et al., 2009).

In conclusion, small molecule-induced stabilization of LDLR mRNA represents a very attractive approach to increase LDLR protein expression in order to treat hypercholesterolemia. Proof of concept studies have shown that this approach could be successful in lowering plasma cholesterol levels in mice and in humans (Knouff et al., 2001; Kong et al., 2004; Singh et al., 2014). The findings reported herein provide insights into novel therapeutic avenues for treating hypercholesterolemia by targeting the IRE1 α /JNK-EGFR-ERK1/2 signaling pathway to increase liver LDLR expression and blood LDL clearance.

Materials and methods

Reagents, cell culture and transfection

5-Azacytidine (A2385) and berberine (14050) were purchased from Sigma-Aldrich. Thapsigargin (Th) (ab120286) was obtained from Abcam. Other reagents and specific inhibitors are listed in Supplementary Materials and Methods (Table S1). Human hepatoma cell lines HepG2, Huh-7 and derived stable cell lines (see below), were maintained in proliferative conditions at a cell density of <70% confluence in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent). Plasmid transfection was performed using Lipofectamine 3000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Stable transfectants of pcDNA3.1-IRE1 α -WT and pcDNA3.1-IRE1 α -MutK907A were generated in Huh7 cells following G418 selection.

Real-time quantitative PCR

The integrity of total RNA samples, isolated using Trizol (15596026; Invitrogen), was verified by agarose gel electrophoresis. Afterward, cDNA was prepared using SuperScript II reverse transcriptase according the manufacturer's instructions (catalog number 18064-014; Invitrogen). The amplification of XBP1 was performed using PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase (catalog number 600380; Agilent). Quantitative real-time PCR was performed with the MX3000p real-time thermal cycler (Agilent) using PerfeCTa SYBR

Green SuperMix, UNG, Low ROX (catalog number 95070–100; Quanta Biosciences). For each gene of interest, dissociation curves and agarose gel electrophoresis were performed to ensure a unique PCR product. Arbitrary units were determined from PCR duplicates for each sample using the TATA box-binding protein (TBP) as a normalizer. Oligonucleotide sequences are listed in Supplementary Table S2.

Antibodies

The following antibodies were used for Western blotting: goat anti-human LDLR (AF2148, 1:1000) from R&D Systems, rabbit anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (9101S, 1:1000), rabbit anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (9102S, 1:1000), rabbit anti-IRE1 α (14C10) (3294P, 1:1000), rabbit anti-Phospho-eIF2 α (Ser51) (D9G8) XPTM (3398P, 1:1000) and rabbit anti-eIF2 α (9722S, 1:1000) antibodies were from Cell Signaling. Rabbit monoclonal anti-EGFR (phospho Y1068) antibody (ab32430, 1: 10000), rabbit monoclonal anti-EGFR (ab52894, 1:1000) and rabbit anti-GRP78 (ab21685, 1:2500) antibodies were from Abcam. Mouse anti-GADD153 (CHOP) (B-3) (sc-7351, 1:500) was from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit anti- β -actin (A2066, 1:5000) was from Sigma-Aldrich.

Expression plasmids construction

All primers used for plasmid construction are listed in Supplementary Table S3. Nucleotides (nt) 11131317 to 11132220 of chromosome 9, herein referred as nt 1 to 904, corresponding to the proximal 3'UTR of hLDLR immediately following the coding sequence, were PCR-amplified using HepG2 cells genomic DNA as a template. The NotI/XbaI PCR fragments were then subcloned into the NotI/XbaI-digested pCMV-Gussia Luciferase reporter plasmid (pCMV-GLuc) (N8081S; New England Biolabs), which encodes the secreted luciferase from the copepod *Gussia princeps* as a reporter, to produce the pCMV-GLuc-3'UTR-hLDLR-WT plasmid. To generate the pCMV-GLuc-3'UTR-hLDLR- Δ UCAU construct, four AT dinucleotides were sequentially deleted at nt 398-399, 509-510, 570-571 and 622-623 by site directed mutagenesis using PfuUltra high-fidelity DNA Polymerase AD (Agilent). Mutation of hLDLR 3'UTR ARE1 (nt 114-121) and ARE2 (nt 679-686) UAUUUAUU motifs to UACUAGUU (Mut-ARE1 and Mut-ARE2) was generated by overlapping PCRs. Mutation of hLDLR 3'UTR ARE3 UUAUUAUUU (nt 863-871) to UCAGUAGUC (Mut-ARE3) was generated by 2

sequential PCRs using the first amplicon as a template for the second PCR reaction. The final PCR bands were digested with NotI and AflII (Mut-ARE1) or with AflII and XbaI (Mut-ARE2 and Mut-ARE3) and ligated into pCMV-3'UTR-hLDLR-WT digested at the same sites. To generate the double Mut-ARE1- Δ UCAU mutant construct, the Mut-ARE1 sequence was PCR-amplified from pCMV-3'UTR-hLDLR-Mut-ARE1 cDNA template, digested with NotI and EcoNI and ligated into pCMV-3'UTR-hLDLR- Δ UCAU. Human IRE1 α was amplified by PCR from IRE1 α -pcDNA3.EGFP (a gift from Fumihiko Urano (Addgene plasmid # 13009)) and subcloned into HindIII/XhoI-digested pcDNA3.1 neo+ (Invitrogen). The pcDNA3.1-hIRE1 α -mutK907A mutant construct was generated by site directed mutagenesis (Agilent) using the pcDNA3.1-hIRE1 α cDNA template. Clones containing the mutation were confirmed by sequencing.

Gaussia Luciferase Assay

Huh7 cells were seeded in 24-well plates at a density of 1.5×10^5 /well. Twenty-four hours later, cells were transfected in duplicate with the indicated pGLuc construct. After overnight incubation, cells were washed twice with DMEM and incubated in 0.5 ml of DMEM without or with 10 μ M 5-AzaC for 24h. Twenty microliters (20 μ l) of conditioned media were loaded into black 96-well plates and relative activity of secreted Gaussia luciferase was assessed by luminescence measurements using the BioLux kit (E3300L) (New England Biolabs) and a BioTek Synergy 2 microplate reader. Quantification of protein concentration (Bradford) was performed to ensure of cell viability in all conditions and to normalize the luminescence signals.

siRNA mediated knockdown of endogenous IRE1 α (ERN1)

siRNA (25 pmole/24-well plate) for human Hs_ERN1_6 (5'-CAGGACGTGAGCGACAGAATA-3') (catalog number 1027415; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) and control (siGENOME Non-Targeting siRNA; catalog number D-001206-14-05) were transfected into Huh-7 cells using Lipofectamine RNAiMAX (catalog number 13778-075; Invitrogen). The knockdown efficiency was determined by RT-qPCR or western blot analysis.

Western blot

Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in radioimmune precipitation assay buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v) SDS) supplemented with a complete protease inhibitor mixture (catalog number 11 697 498 001; Roche Applied Science). Proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted on nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and blocked for 1 h in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated overnight in TBS-T supplemented with 1% non-fat milk and the indicated antibodies as described above. Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000) (GE healthcare) were used for detection using the Western Lightning Ultra chemiluminescence kit (catalog number NEI112001EA; PerkinElmer Life Sciences) and BioFlex EC Films (catalog number CLEC810; InterScience). Western blot quantification was made using ImageJ software.

Immunocytochemistry

Twenty-four hours after treatment, HepG2 or Huh7 cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes, permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 10 minutes, and incubated with 150 mM glycine to stabilize the aldehydes. The cells were then incubated for 30 minutes with 1% BSA (Fraction V) (Sigma) containing 0.1% Triton X-100, followed by overnight incubation at 4°C with goat anti-human LDLR (1:100) (catalog number AF2148; R&D Systems). Afterward, cells were incubated for 60 minutes with corresponding Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) and mounted in 90% glycerol containing 5% 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Sigma). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1:1000) (Molecular Probes). Immunofluorescence analyses were performed with an Olympus FluoView FV10i confocal microscope.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm S.E.M. of (n) repeats. Statistical comparisons were done by unpaired t-test using GraphPad Prism software. $P < 0.05$ was considered statistically

significant. All experiments were performed at least three times and representative results are shown in all figures.

Supplementary material

Supplementary material is available at BBA Gene Regulatory Mechanisms online.

Acknowledgments

We thank Drs. Annie Demers and Steve Poirier for excellent technical support and helpful advice and Louis Villeneuve for confocal microscopy image acquisition.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant number MOP133598), the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS), and the Montreal Heart Institute Foundation.

References

- Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Lal, A., et al. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*, *25*, 543-557.
- Abidi, P., Chen, W., Kraemer, F. B., Li, H., and Liu, J. (2006). The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new action mechanisms. *J Lipid Res*, *47*, 2134-2147.
- Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., et al. (2014). ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. *Nucleic Acids Res*, *42*, 10037-10049.
- Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., et al. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*, *13*, 597.
- Baigent, C., Blackwell, L., Emberson, J., et al. (2010). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*, *376*, 1670-1681.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H. B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, *33*, 7138-7150.
- Berasain, C., and Avila, M. A. (2014). Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol*, *28*, 31-41.
- Bouhairie, V. E., and Goldberg, A. C. (2015). Familial hypercholesterolemia. *Cardiol Clin*, *33*, 169-179.
- Bridges, A. J., Zhou, H., Cody, D. R., et al. (1996). Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem*, *39*, 267-276.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, 11041-11048.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*, 1670-1674.

- Chen, C. Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., and Karin, M. (1998). Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science*, *280*, 1945-1949.
- De Castro-Oros, I., Pocovi, M., and Civeira, F. (2010). The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet*, *3*, 53-64.
- Estey, E. H. (2013). Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *27*, 1803-1812.
- Gherzi, R., Lee, K. Y., Briata, P., et al. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*, *14*, 571-583.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., et al. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*, *158*, 534-548.
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*, 431-438.
- Goto, D., Okimoto, T., Ono, M., et al. (1997). Upregulation of low density lipoprotein receptor by gemfibrozil, a hypolipidemic agent, in human hepatoma cells through stabilization of mRNA transcripts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *17*, 2707-2712.
- Guo, D., Reinitz, F., Youssef, M., et al. (2011). An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov*, *1*, 442-456.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*, 89-102.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., et al. (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol*, *26*, 2399-2407.

- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., et al. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*, 12027-12032.
- Knouff, C., Malloy, S., Wilder, J., Altenburg, M. K., and Maeda, N. (2001). Doubling expression of the low density lipoprotein receptor by truncation of the 3'-untranslated region sequence ameliorates type iii hyperlipoproteinemia in mice expressing the human apoe2 isoform. *J Biol Chem*, *276*, 3856-3862.
- Kong, W., Wei, J., Abidi, P., et al. (2004). Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*, *10*, 1344-1351.
- Korhonen, R., Linker, K., Pautz, A., Forstermann, U., Moilanen, E., and Kleinert, H. (2007). Post-transcriptional regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by the Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, *71*, 1427-1434.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., et al. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, *369*, 156-160.
- Li, H., Chen, W., Zhou, Y., et al. (2009). Identification of mRNA binding proteins that regulate the stability of LDL receptor mRNA through AU-rich elements. *J Lipid Res*, *50*, 820-831.
- Malo, A., Kruger, B., Seyhun, E., et al. (2010). Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *299*, G877-886.
- Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., and Breslow, J. L. (2003). Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*, *44*, 2109-2119.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, *1773*, 1263-1284.
- McKay, M. M., and Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, *26*, 3113-3121.

- Mendez, A. S., Alfaro, J., Morales-Soto, M. A., et al. (2015). Endoplasmic reticulum stress-independent activation of unfolded protein response kinases by a small molecule ATP-mimic. *Elife*, *4*, e05434.
- Meng, C., Liu, G., Mu, H., Zhou, M., Zhang, S., and Xu, Y. (2015). Amphiregulin may be a new biomarker of classically activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, *466*, 393-399.
- Ming, X. F., Kaiser, M., and Moroni, C. (1998). c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J*, *17*, 6039-6048.
- Nakahara, M., Fujii, H., Maloney, P. R., Shimizu, M., and Sato, R. (2002). Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, *277*, 37229-37234.
- O'Keefe, J. H., Jr., Cordain, L., Harris, W. H., Moe, R. M., and Vogel, R. (2004). Optimal low-density lipoprotein is 50 to 70 mg/dl: lower is better and physiologically normal. *J Am Coll Cardiol*, *43*, 2142-2146.
- Papa, F. R., Zhang, C., Shokat, K., and Walter, P. (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, *302*, 1533-1537.
- Papandreou, I., Denko, N. C., Olson, M., et al. (2011). Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, *117*, 1311-1314.
- Poirier, S., Mamarbachi, M., Chen, W. T., Lee, A. S., and Mayer, G. (2015). GRP94 Regulates Circulating Cholesterol Levels through Blockade of PCSK9-Induced LDLR Degradation. *Cell Rep*, *13*, 2064-2071.
- Poirier, S., and Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther*, *7*, 1135-1148.
- Poirier, S., Samami, S., Mamarbachi, M., et al. (2014). The Epigenetic Drug 5-Azacytidine Interferes with Cholesterol and Lipid Metabolism. *J Biol Chem*, *289*, 18736-18751.
- Riese, D. J., 2nd, and Cullum, R. L. (2014). Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, *28*, 49-56.

- Roberts, P. J., and Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, *26*, 3291-3310.
- Rosenbloom, K. R., Sloan, C. A., Malladi, V. S., et al. (2013). ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update. *Nucleic Acids Res*, *41*, D56-63.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, *46*, 659-667.
- Singh, A. B., Li, H., Kan, C. F., Dong, B., Nicolls, M. R., and Liu, J. (2014). The critical role of mRNA destabilizing protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein d in 3' untranslated region-mediated decay of low-density lipoprotein receptor mRNA in liver tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *34*, 8-16.
- Spady, D. K. (1992). Hepatic clearance of plasma low density lipoproteins. *Semin Liver Dis*, *12*, 373-385.
- Srivastava, R. K., Sollott, S. J., Khan, L., Hansford, R., Lakatta, E. G., and Longo, D. L. (1999). Bcl-2 and Bcl-X(L) block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis. *Mol Cell Biol*, *19*, 5659-5674.
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O., and Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*, *424*, 961-965.
- Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., et al. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, *466*, 707-713.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., and Kaufman, R. J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev*, *14*, 2725-2736.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., et al. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, *287*, 664-666.
- Vargas, N. B., Brewer, B. Y., Rogers, T. B., and Wilson, G. M. (2009). Protein kinase C activation stabilizes LDL receptor mRNA via the JNK pathway in HepG2 cells. *J Lipid Res*, *50*, 386-397.
- Verin, A. D., Liu, F., Bogatcheva, N., et al. (2000). Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *279*, L360-370.

- Wilson, G. M., Roberts, E. A., and Deeley, R. G. (1997). Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J Lipid Res*, *38*, 437-446.
- Wilson, G. M., Vasa, M. Z., and Deeley, R. G. (1998). Stabilization and cytoskeletal-association of LDL receptor mRNA are mediated by distinct domains in its 3' untranslated region. *J Lipid Res*, *39*, 1025-1032.
- Yashiro, T., Nanmoku, M., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. (2013). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside stabilizes low density lipoprotein receptor mRNA in hepatocytes via ERK-dependent HuR binding to an AU-rich element. *Atherosclerosis*, *226*, 95-101.
- Yashiro, T., Yokoi, Y., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. (2011). Chenodeoxycholic acid stabilization of LDL receptor mRNA depends on 3'-untranslated region and AU-rich element-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, *409*, 155-159.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, *107*, 881-891.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*, *325*, 100-104.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, *108*, 1167-1174.
- Zubiaga, A. M., Belasco, J. G., and Greenberg, M. E. (1995). The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol*, *15*, 2219-2230.
- Zwang, Y., and Yarden, Y. (2009). Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*, *10*, 349-363.

Figure legends

Figure 1 Upregulation of LDLR expression by 5-AzaC in human hepatoma cell lines.

(A) HepG2 and Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours and whole cell lysates were analyzed by Western blotting (WB) with the indicated antibodies. Relative protein band intensity was determined by densitometry and normalized to β -actin. *, $p < 0.005$. (B) For mRNA turnover analyses, Huh7 cells were incubated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours and then with 5 μ g/ml actinomycin D for 0, 60, 120, 180 and 240 minutes. Relative mRNA levels of hLDLR were analyzed by real-time quantitative PCR (qPCR). Data expressed as mean \pm SEM. ($n = 3$; analyzed in duplicate). *, $p < 0.01$. (C) Huh7 cells were incubated with 10 μ M 5-AzaC for 0, 2, 4, 6, 8 and 24 hours and whole cell lysates were analyzed by WB with the indicated antibodies. Relative protein band intensity was determined by densitometry and normalized to β -actin. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (D) Huh7 and HepG2 cells were incubated with DMEM (Control) or with 10 μ M 5-AzaC for 24h. LDLR (red) was revealed by immunocytochemistry as described under "Materials and Methods". (-) Triton X-100 indicates non-permeabilized cells and (+) Triton X-100 indicates permeabilized cells. Scale bar, 20 μ m. (E) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 25 μ M or 50 μ M U0126 for 2 hours and then without (-) or with (+) 10 μ M 5-AzaC or with 10 μ g/ml BBR for 24 hours. Total protein was extracted from cells and subjected to WB using the indicated antibodies. WB signals were normalized to β -actin. Data are representative of at least three to four independent experiments. Bars and data from gel quantifications are means \pm S.E.M.

Figure 2 Activation of EGFR and JNK signaling pathways are required for 5-AzaC-induced upregulation of LDLR expression.

(A) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 0, 6 and 24 hours. Relative mRNA levels of hAREG and hEREG were analyzed by qPCR. Data expressed as mean \pm SEM. ($n = 3$; analyzed in duplicate). *, $p < 0.001$. (B), (C) and (D) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 20 μ M PD153035 for 2 hours and then incubated with or without 10 μ M 5-AzaC for the indicated time. Total protein was extracted from cells and subjected to western blotting using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. Analyses were done for representative experiments. (E) Huh7 cells were treated with or without 7.5 μ M

SP600125 for 2 hours and then without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Relative mRNA levels of LDLR, AREG and EREG were analyzed by qPCR. Error bars indicate \pm SEM. (n = 3; analyzed in duplicate). *, p < 0.05. **(F)** Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 7.5 μ M SP600125 for 2h and then incubated with or without 10 μ M 5-AzaC for indicated time. Total protein was extracted from cells and subjected to western blotting using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. *, p < 0.05. Data are representative of at least three to four independent experiments. Bars and data from gel quantifications are means \pm S.E.M.

Figure 3 5-AzaC increases LDLR expression in an ER stress-independent manner.

(A-C) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 1 μ M thapsigargin (Th) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Whole cell lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. **(D)** Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 1 μ M thapsigargin (Th) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Total RNA was prepared and XBP1 mRNA splicing was detected by RT-PCR. The hybrid, unspliced and spliced forms of XBP1 mRNA are referred to as hXBP1, uXBP1 and sXBP1 respectively. GAPDH was used as a control. **(E, F)** Huh7 cells were incubated with or without tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) for 2 hours and then treated without (DMEM) or with 1 μ M thapsigargin (Th) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Total protein was extracted from cells and subjected to WB using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. *, p < 0.02. Data are representative of at least three to four independent experiments. Bars and data from gel quantifications are means \pm S.E.M.

Figure 4 IRE1 α kinase activity is required for 5-AzaC-induced upregulation of LDLR expression.

Huh7 cells were incubated with or without 5 μ M IRE1 α kinase inhibitor Kira 6 **(A-C)** or with or without 60 μ M IRE1 α RNase inhibitor STF-083010 **(D-F)** for 2 hours and then treated without (DMEM) or with 1 μ M thapsigargin (Th) **(A, B, D, E)** or 10 μ M 5-AzaC **(C, F)** for 24 hours. **(A, C, D, F)** Total protein was extracted from cells and subjected to western blotting using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. *, p < 0.01. **(B, E)** Total RNA was prepared and XBP1 mRNA splicing was detected by RT-PCR. The hybrid, unspliced and spliced forms of XBP1 mRNA are referred to as hXBP1, uXBP1 and sXBP1 respectively. GAPDH was used as a control. Data are

representative of at least three to four independent experiments. Bars and data from gel quantifications are means \pm S.E.M.

Figure 5 5-AzaC induces the stabilization of LDLR mRNA through the 5' proximal region of the LDLR mRNA 3'UTR. (A) Schematic diagram of the hLDLR mRNA 3'UTR and the chimeric luciferase-hLDLR proximal 3'UTR (Luc-hLDLR 3'UTR) fusion construct. (B, C) Huh7 cells were transfected with pCMV-GLuc-hLDLR-3'UTR and, after 24 hours, treated without (DMEM) or with 25 μ M U0126 (B) or 20 μ M PD153035 (C) for 2 hours and then with or without 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. (D) Huh7 cells were transfected with the control vector pCMV-GLuc and 24h post-transfection cells were treated with or without 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Luciferase relative activity was measured in cell media and normalized to total protein level. Error bars, SEM. (n=3, analyzed in duplicate). *, $p < 0.02$.

Figure 6 The ARE1 sequence is required for the 5-AzaC-mediated mRNA stabilization. (A) Schematic diagram of the chimeric pCMV-GLuc-3'UTR-hLDLR (WT) mRNA fusion construct and mutants thereof. (B) Huh7 cells were transfected with indicated chimeric luciferase plasmid constructs containing WT 3'UTR-hLDLR or mutants thereof for 24 hours and then treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Luciferase relative activity was measured in cell media and normalized to total protein level. Error bars, SEM. (n=3, analyzed in duplicate). *, $p < 0.03$.

Figure 7 Schematic diagram of the proposed mechanism of LDLR mRNA upregulation by 5-AzaC. 5-AzaC specifically activates the endoplasmic reticulum (ER) resident transmembrane protein IRE1 α , independently of ER stress. IRE1 α kinase domain, an upstream activator of JNK, induces EGFR signaling by increasing EGFR ligands AREG and EREG expression. EGFR signaling activates the classical Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 pathway that provokes modification of the binding properties of ARE-binding proteins (ARE-BP) to the LDLR mRNA 3'UTR ARE1 region resulting in LDLR mRNA stabilization. The target(s) of ERK1/2 directly responsible of LDLR stabilization remain to be identified. Inhibitors used in this study are depicted: TUDCA, ER stress inhibitor; Kira6, IRE1 α kinase domain inhibitor; STF-083010, IRE1 α RNase domain inhibitor; SP600125, JNK inhibitor; PD153035, EGFR inhibitor; U0126, MEK1/2 inhibitor.

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Effect of ERK1/2 and AMPK activation or inhibition on LDLR expression.

Huh7 cells were treated with (A) 10 nM PMA for 24 hours, (B) 10 nM PMA for 15min and 30min, or with (C) AICAR, and (D) compound C (CC) for 24 hours in the presence or absence of 10 μ M 5-AzaC. Total protein was extracted from cells and subjected to Western blotting using the indicated antibodies. Protein expression was normalized to β -actin.

Figure S2. Effect of EGFR inhibitor PD153035 and JNK inhibitor SP600125 on LDLR mRNA and protein expression.

Huh7 cells were treated without (DMEM) or with (A-B) 20 μ M PD153035, or (C-D) 7.5 μ M SP600125 for 24 hours. Total protein was extracted from cells and subjected to Western blotting using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. Relative mRNA levels of hLDLR were analyzed by qPCR. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure S3. Effect of 5-AzaC on IRE1 α mRNA expression and effect of IRE1 kinase (Kira 6) and RNase (STF-083010) inhibitors on LDLR mRNA and protein expression.

(A) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Relative mRNA level of hIRE1 α was analysed by qPCR. (B) For mRNA turnover analyses, Huh7 cells were incubated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours and then with 5 μ g/ml actinomycin D for 0, 60, 120, 180 and 240 minutes. Relative mRNA levels of hIRE1 α were analyzed by qPCR. (C-F) Huh7 cells were treated without (DMEM) or with 5 μ M Kira 6 (C-D), or with 60 μ M STF-083010 (E-F) for 24 hours. Total protein was extracted from cells and subjected to Western blotting using the indicated antibodies. Protein level was normalized to β -actin. Relative mRNA levels of hLDLR were analyzed by qPCR.

Figure S4. IRE1 α kinase domain is crucial for 5-AzaC-induced upregulation of LDLR expression.

Huh7 cells were incubated with or without 5 μ M IRE1 α kinase inhibitor Kira 6 for 2 hours and then treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours. Relative mRNA levels of (A) hAREG, (B) hEREG and (C) hLDLR were analyzed by qPCR. Data expressed as mean \pm SEM; (n = 3; analyzed in duplicate). *, p < 0.05. (D) Huh7 cells were transfected with a negative control siRNA (non-target) or a siRNA against IRE1 α (si-IRE1 α) for 48 hours then treated without (DMEM) or with 10 μ M 5-azaC for 24 hours. Protein expression was normalized to β -actin. Quantification of relative protein levels is indicated (left panels). (E) Schematic structure of IRE1 α -WT and IRE1 α -K907A

RNase domain mutant. **(F)** Stable and **(G)** transient Huh7 cells expressing plasmid encoding pcDNA3.1, IRE1 α -K907A or IRE1 α -WT were incubated without (DMEM) or with 10 μ M 5-AzaC for 24 hours and then analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. **(H)** Huh7 cells were transfected transiently with plasmid encoding pcDNA3.1, IRE1 α -K907A or IRE1 α -WT for 30 hours. For a control of ER stress, pcDNA3.1 transfected cells were treated without (DMEM) or with 1 μ M thapsigargin (Th) for 16 hours. Total RNA was prepared and XBP1 mRNA splicing was detected by RT-PCR. The hybrid (hXBP1), unspliced (uXBP1) and spliced (sXBP1) forms of XBP1 mRNA are indicated. GAPDH was used as a control. **(I)** Huh7 cells were transfected and treated as described in (H) and total protein was extracted from cells and subjected to Western blotting using the indicated antibodies.

Table 1 : Microarray data of gene expression in HepG2 cells 24h after treatment with 10 μ M 5-AzaC.

<i>Gene</i>	<i>Gene_Assignment</i>	<i>p-value</i>	<i>Fold Change</i>
EREG	NM_001432 // EREG // epiregulin // 4q13.3 // 2069 /// ENST00000244869 // EREG //	1.7E-05	25.75
AREG	NM_001657 // AREG // amphiregulin // 4q13-q21 // 374 /// BC009799 // AREG // amp	6.98E-07	16.61
IRE1 α /ERN1 α	NM_001433 // ERN1 // endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 // 17q24.2 //	7.3E-07	8.60
CREB5	NM_182898 // CREB5 // cAMP responsive element binding protein 5 // 7p15.1 // 958	1.9E-04	5.93
Jun	NM_002228 // JUN // jun oncogene // 1p32-p31 // 3725 /// ENST00000371222 // JUN	8.5E-05	5.30
LDLR	NM_174902 // LDLRAD3 // low density lipoprotein receptor class A domain containi	2.4E-06	5.08
eIF2 α /EIF2S1	NM_004094 // EIF2S1 // eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alp	3.6E-04	1.76
ATF4	NM_001675 // ATF4 // activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer	0.0003309	1.66
ATF6	NM_007348 // ATF6 // activating transcription factor 6 // 1q22-q23 // 22926 ///	2.6E-04	1.59
PERK/EIF2AK3	NM_004836 // EIF2AK3 // eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase	0.059478	-1.10
GRP78/HSPA5	NM_005347 // HSPA5 // heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78k	3.5E-04	-1.58
GRP94	NM_003299 // HSP90B1 // heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1 // 12q24	1.1E-03	-1.61
ATF6 β	NM_004381 // ATF6B // activating transcription factor 6 beta // 6p21.3 // 1388 /	3.87E-05	-2.74

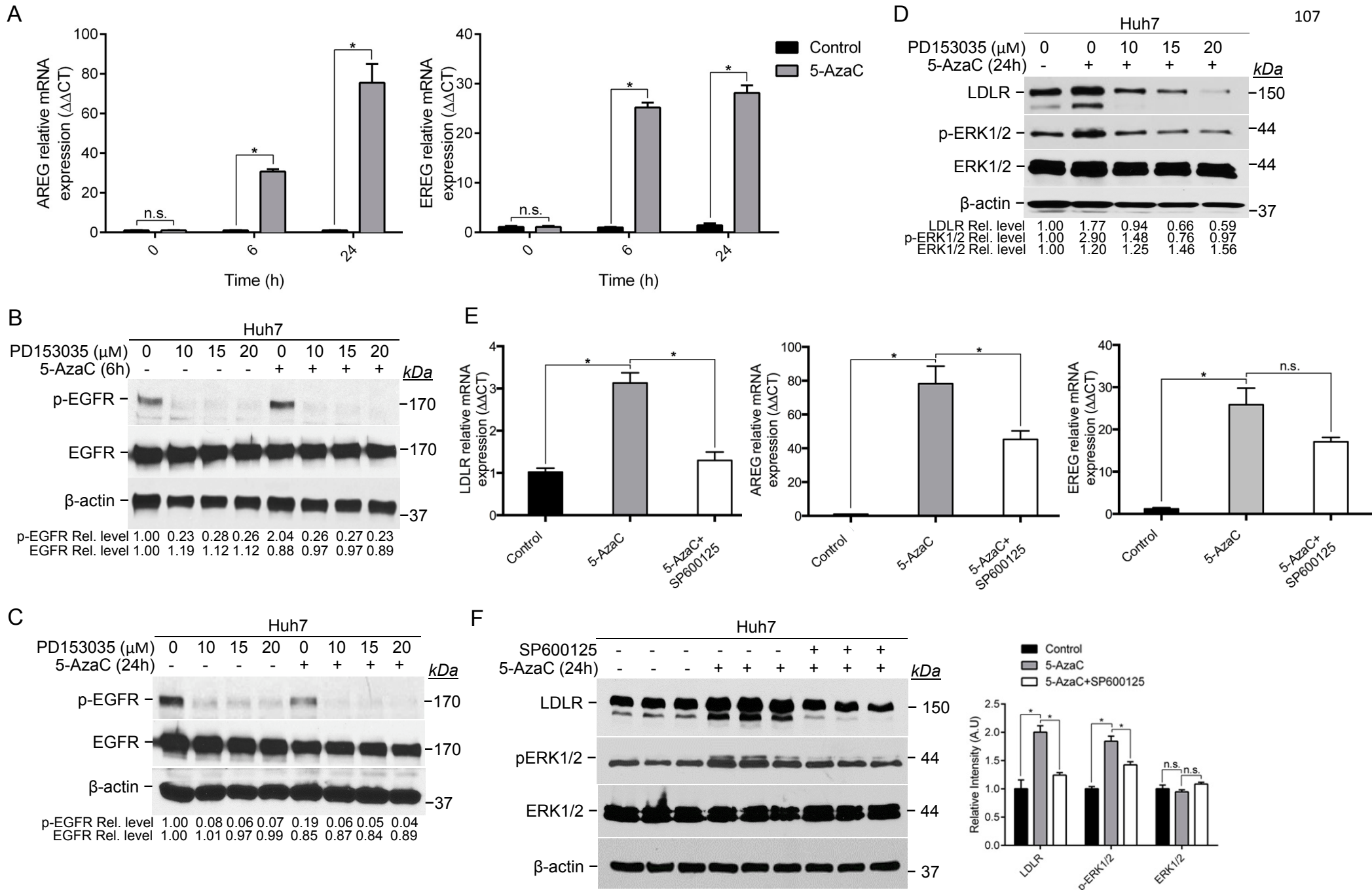


Figure 2

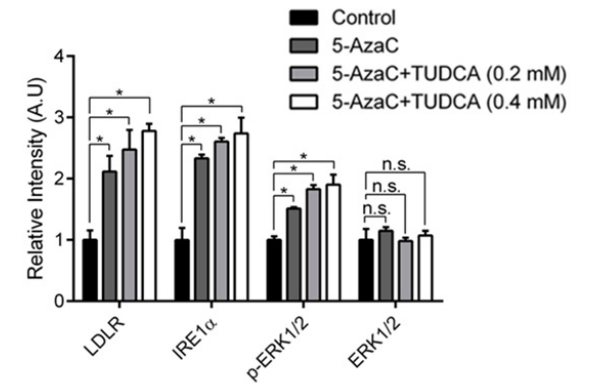
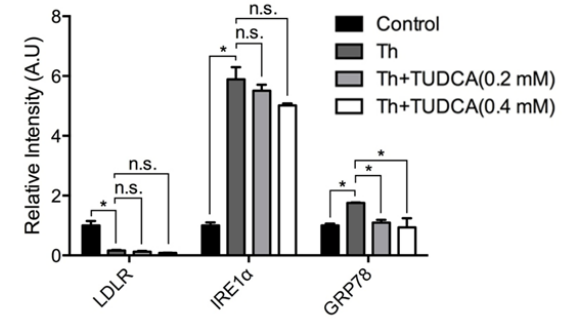
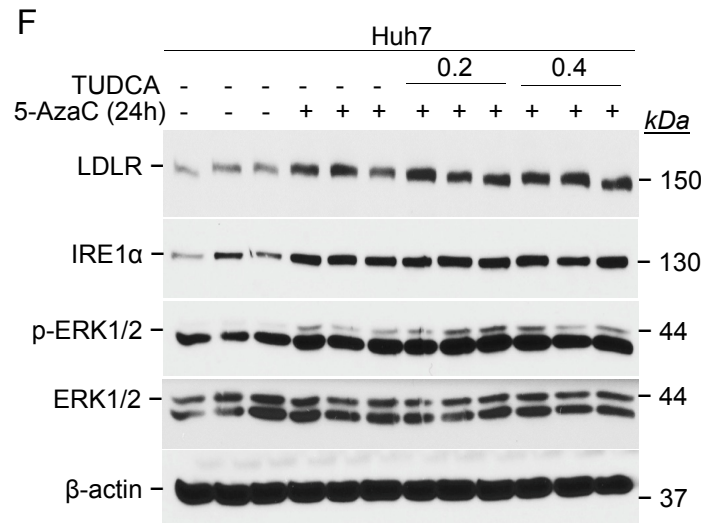
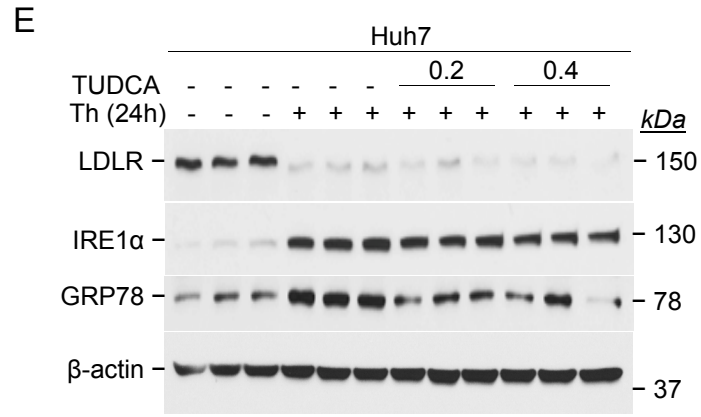
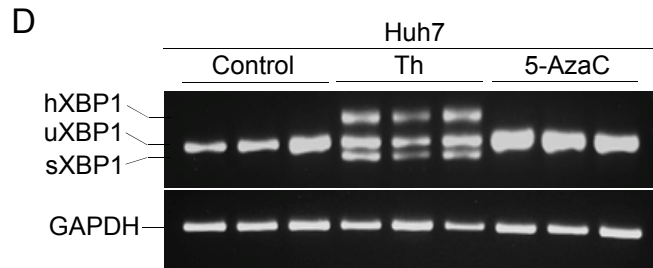
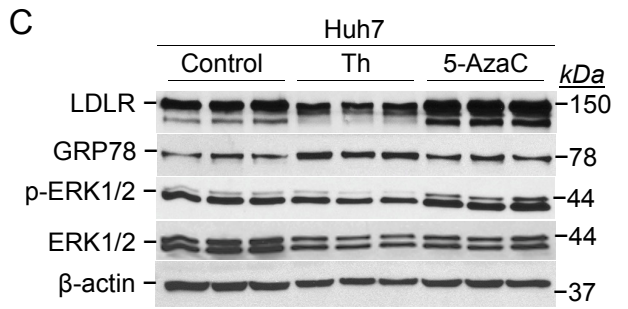
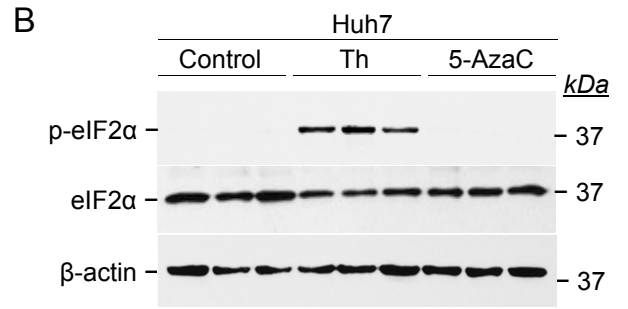
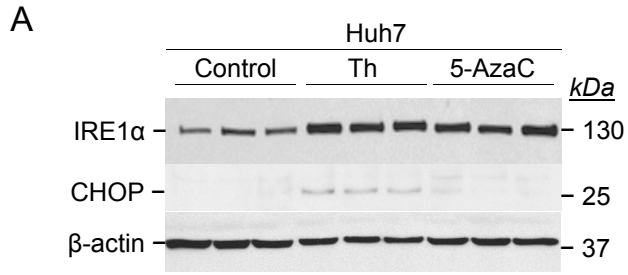


Figure 3

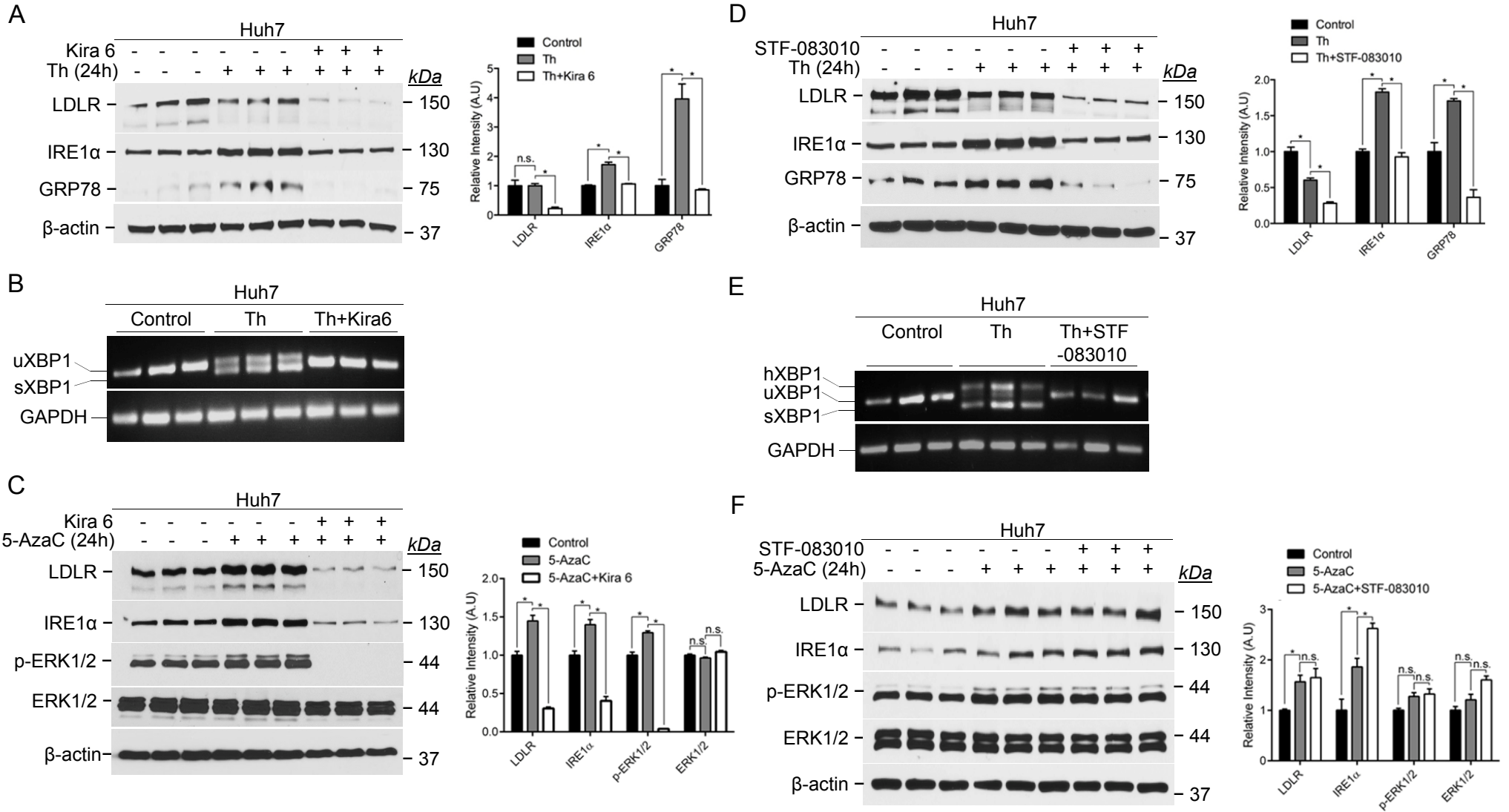


Figure 4

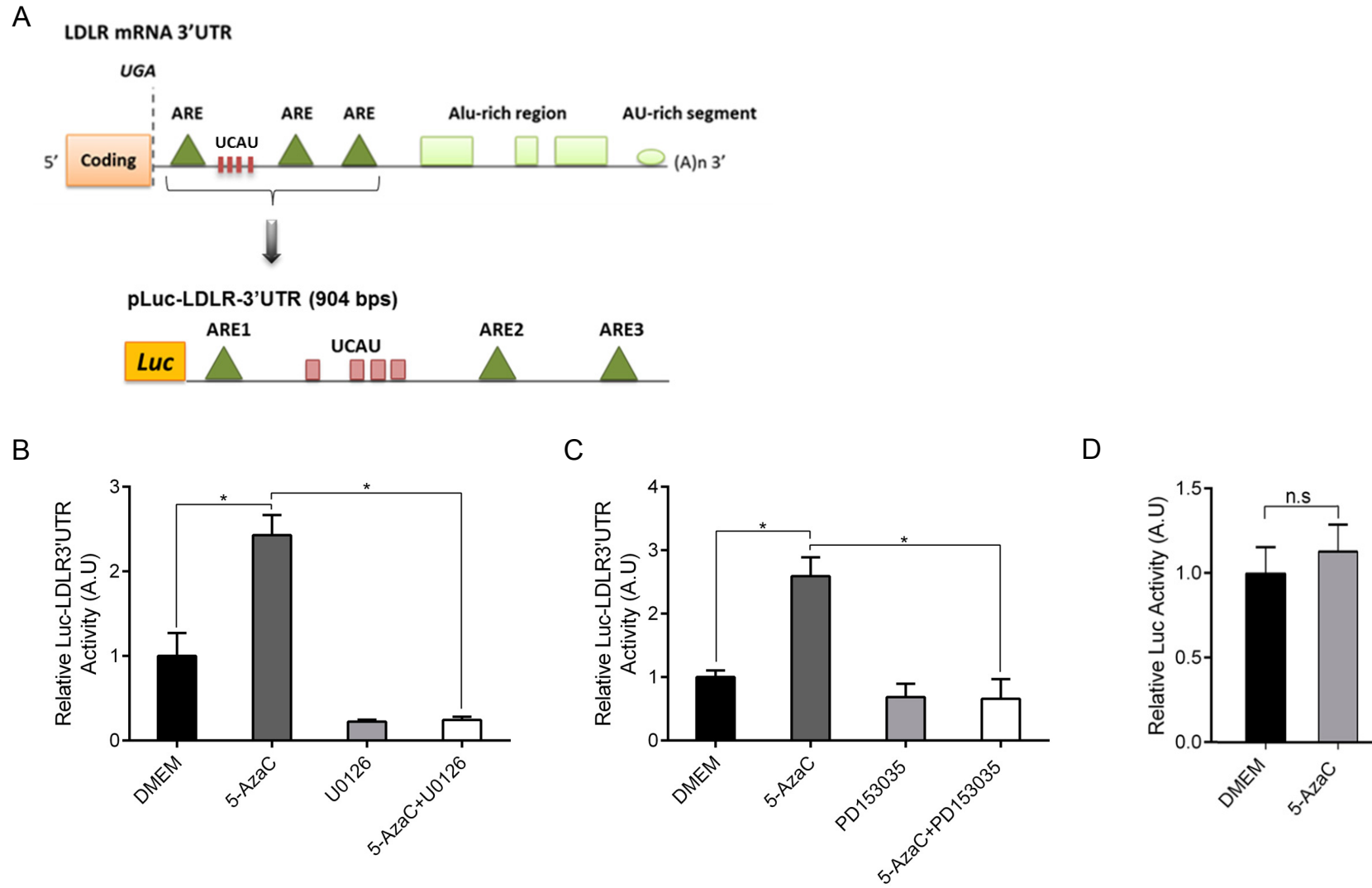
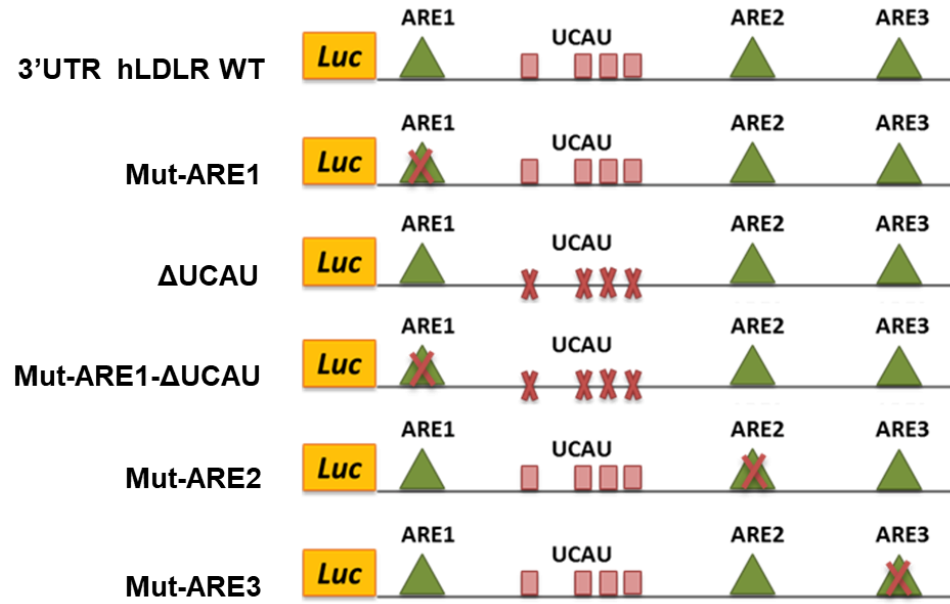


Figure 5

A



B

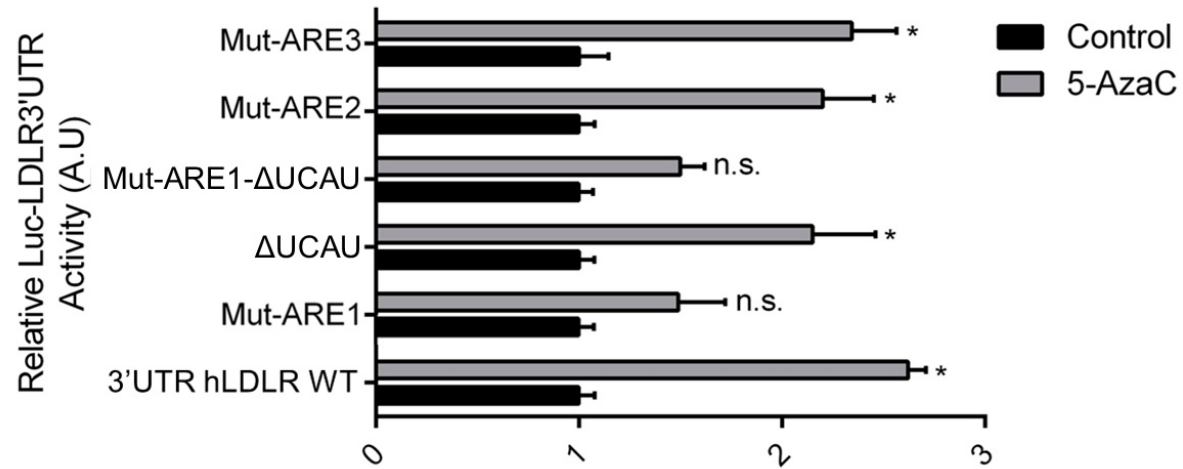


Figure 6

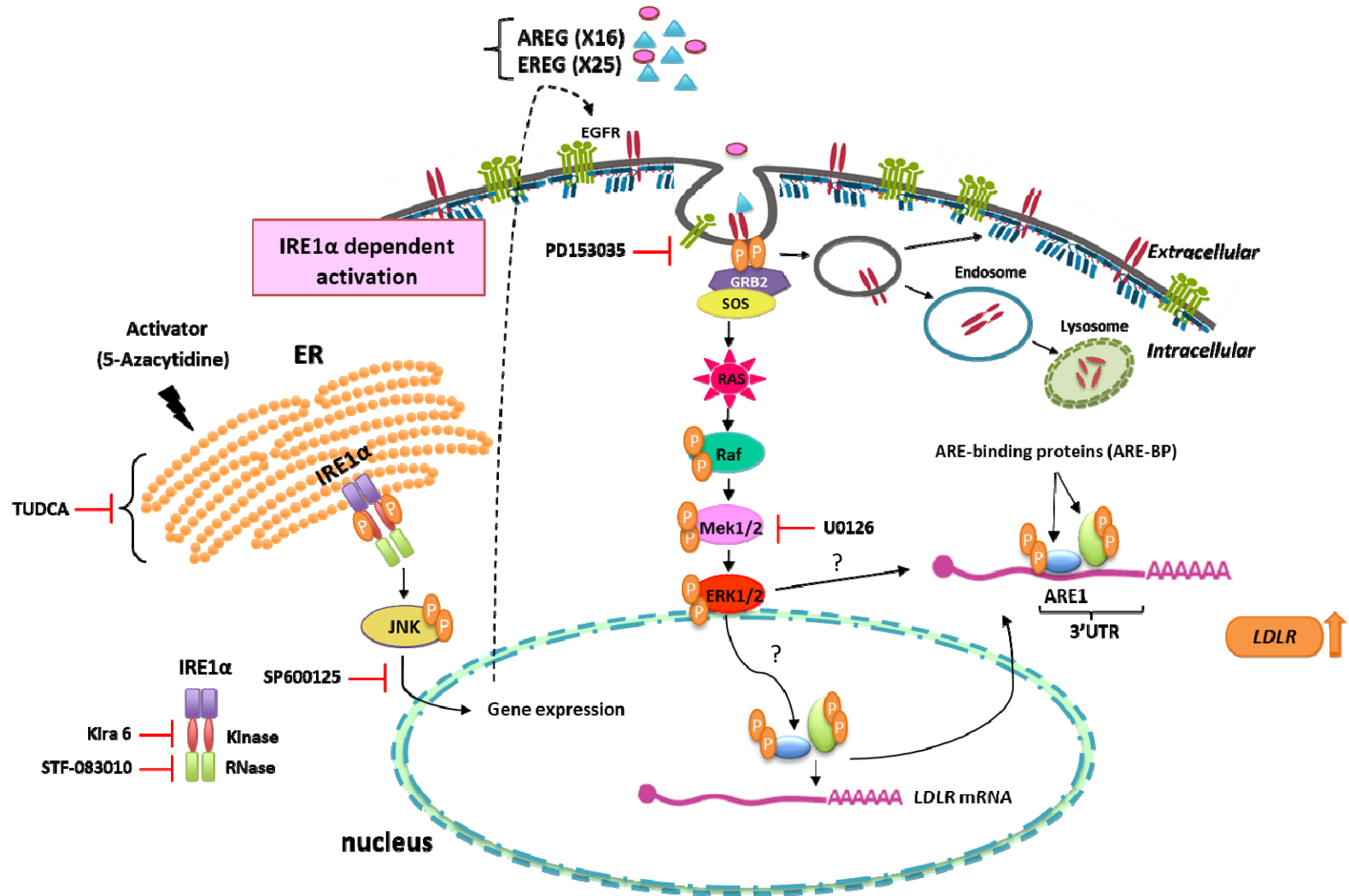


Figure 7

Supplementary Figures

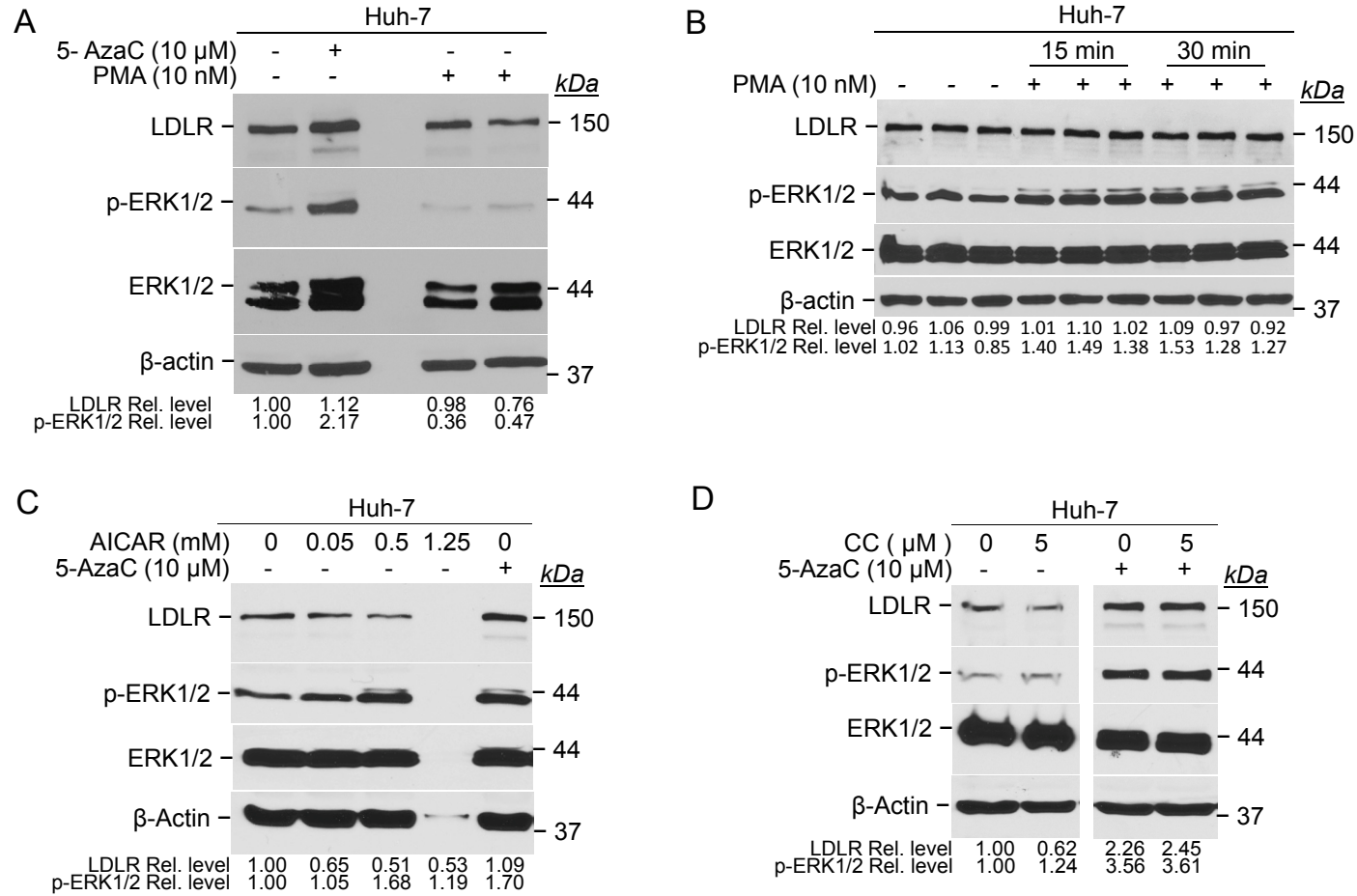


Figure S1

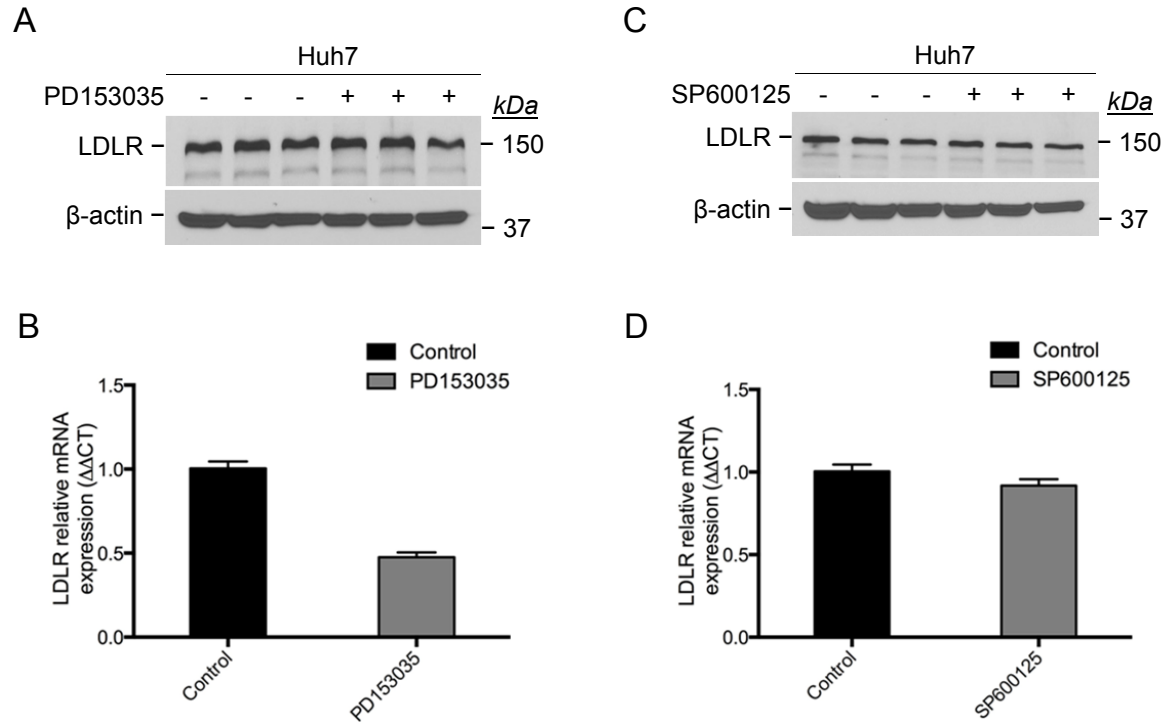


Figure S2

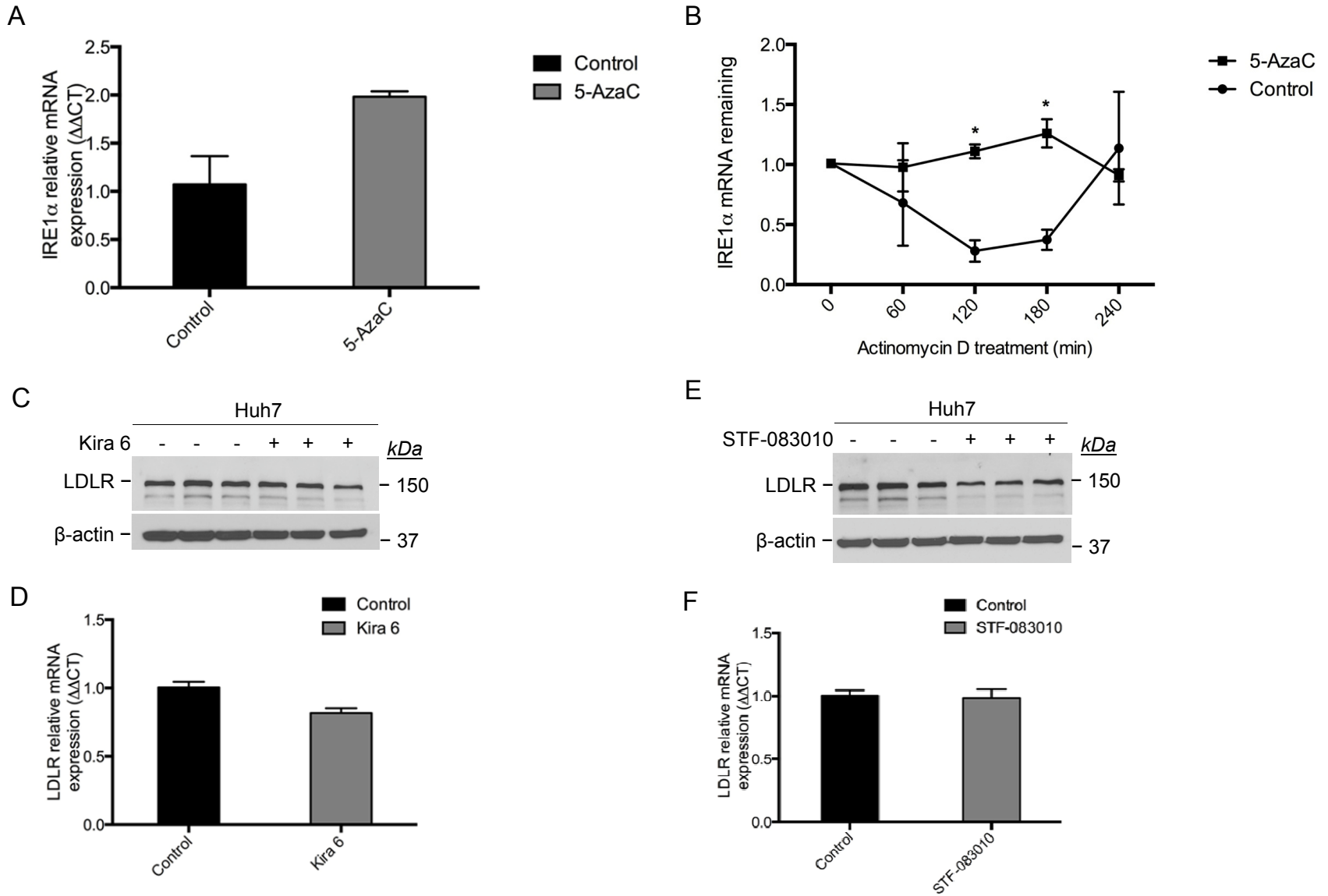


Figure S3

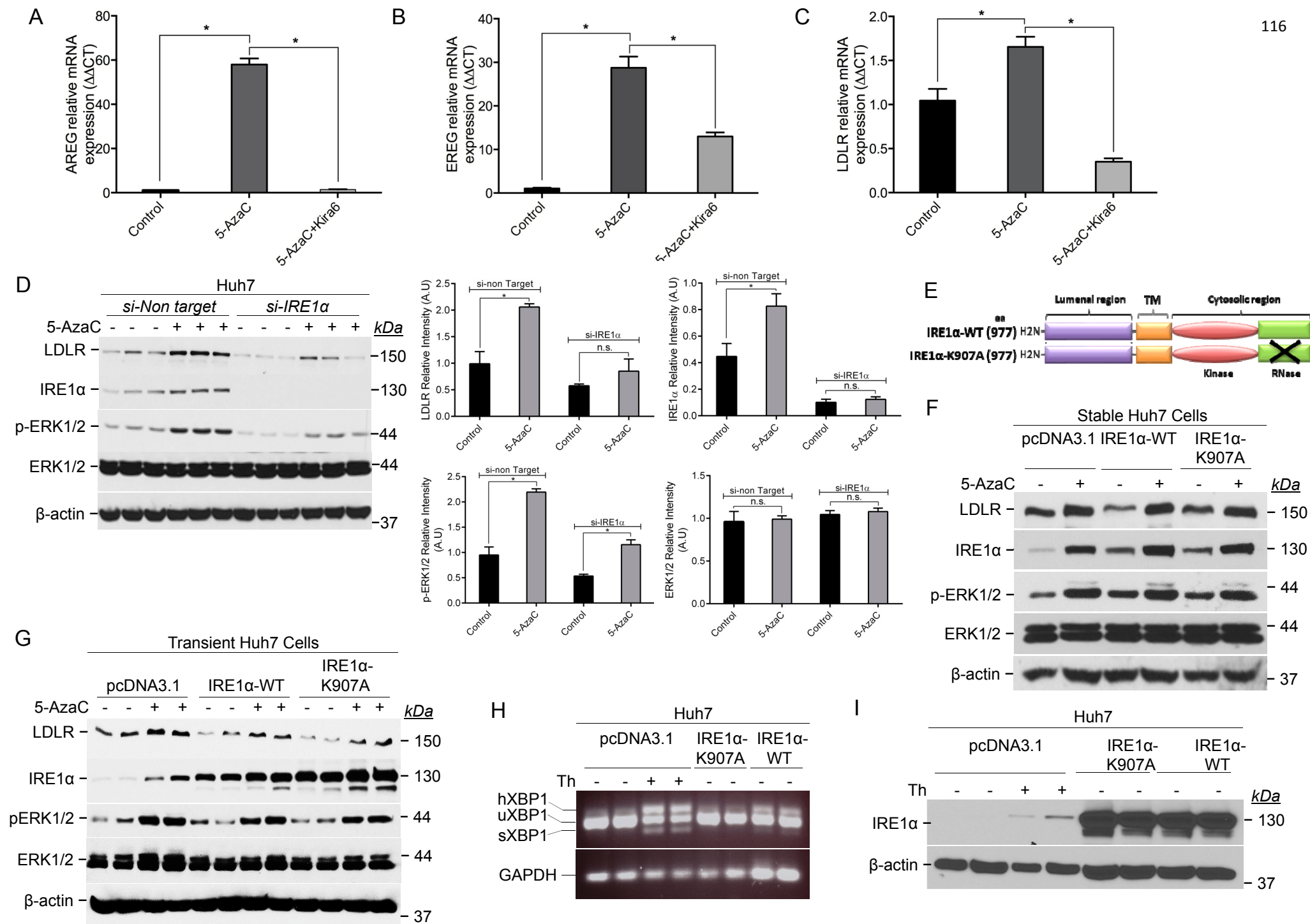


Figure S4

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'expression des gènes et l'abondance des transcrits correspondants changent profondément en réponse à divers stimuli ce qui influence directement ou indirectement l'état de la cellule (Garcia-Martinez *et al.*, 2004; Moore., 2005 ; Cheadle *et al.*, 2005). Au niveau post-transcriptionnel, la régulation de l'expression des gènes est assurée par l'interaction entre des séquences spécifiques de l'ARNm, éléments en *cis*, avec d'autres facteurs en *trans* tels que les protéines de liaison à l'ARN (RBPs) (Wilusz et Wilusz, 2004) et les micro-ARN (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Les ARNm labiles se caractérisent généralement par la présence d'une région non traduite riche en éléments AU (les motifs AREs) au niveau de l'extrémité 3', appelée 3'UTR (Chen and Shyu, 1995). Un grand nombre de protéines de liaison à ces motifs ont été identifiées. Parmi ces RBPs, il y a celles qui favorisent la dégradation de l'ARNm par l'exosome, le protéasome ou par les corps P, telles que l'AUF1, la BRF1, la TTP et la KSRP (Carballo *et al.*, 1998; Laroia *et al.*, 1999; Gherzi *et al.*, 2004; Kedersha *et al.*, 2005). D'autres sont connues pour leur potentiel stabilisant de l'ARNm cible telles que les protéines appartenant à la famille des ELAV/ Hu (HuB, HuC, HuD et HuR). La HuR est la protéine la plus connue et la plus étudiée de cette famille. Elle a été identifiée comme un régulateur clé de l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réponse aux stress, l'activation des cellules immunitaires, la carcinogenèse et la sénescence (Brennan and Steitz, 2001).

1. La stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL *via* la séquence 3'UTR

L'activation de la transcription du récepteur LDL suite à l'épuisement du taux de cholestérol intracellulaire est le principal mécanisme d'action des médicaments actuels utilisés pour le traitement de l'hypercholestérolémie (Brown and Goldstein., 1986 ; Reinoso *et al.*, 2001). Les statines sont les médicaments les plus prescrits et les plus utilisés comme inhibiteurs spécifiques de l'enzyme HMG-CoA réductase, limitant en conséquence la biosynthèse du cholestérol cellulaire. En effet, l'appauvrissement de la réserve de cholestérol dans le foie entraîne une augmentation de l'expression du récepteur LDL et une absorption accrue des particules LDL-c circulantes (Nawrocki *et al.*, 1995). Néanmoins la grande efficacité et les excellents résultats cliniques obtenus grâce aux statines, il est encore

nécessaire de développer d'autres agents abaissant le cholestérol pour traiter l'hyperlipidémie (Rader., 2001; Bays and Stein., 2003).

Plusieurs études, y compris la nôtre, ont montré que l'ARNm du LDLR se dégrade à un rythme relativement rapide avec une demi-vie d'environ 3 h. En revanche, il pourrait être stabilisé en réponse au traitement avec différents composés (Wilson *et al.*, 1997 ; Goto *et al.*, 1997 ; Nakahara *et al.*, 2002 ; Kong *et al.*, 2004 ; Yashiro *et al.*, 2013 ; Poirier *et al.*, 2014). Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur l'identification de nouveaux modulateurs du LDLR à partir de produits naturels, ce qui a conduit à l'identification de la BBR, un alcaloïde isolé à partir de certains végétaux, comme un nouveau régulateur de l'expression du LDLR hépatique (Kong *et al.*, 2004; Abidi *et al.*, 2005a) (**ANNEXE 1**).

Les études faites sur des lignées cellulaires d'hépatome humain (HepG2 et Bel-7402), ont montré que la BBR augmentait fortement l'expression du LDLR aussi bien au niveau de l'ARNm ainsi qu'au niveau protéique. Ces études ont encore révélé que la BBR augmentait l'expression du LDLR en prolongeant la durée de demi-vie de son ARNm sans affecter le processus transcriptionnel. La BBR agit par un mécanisme différent de celui des statines et totalement indépendant de la concentration intracellulaire du cholestérol et de l'activation de SREBP. De point de vue clinique, l'administration orale de la BBR chez 32 patients hypercholestérolémiques à une dose journalière de 1 g pendant 3 mois a permis une réduction du taux de cholestérol plasmatique total, des TG et du LDL-c de 29%, 35% et 25%, respectivement, sans présenter aucun effet secondaire. Ces études ont suggéré l'utilisation possible de la BBR comme un nouvel agent prometteur pour le traitement de l'hyperlipidémie (Kong *et al.*, 2004). Les résultats supplémentaires réalisés par la même équipe ont rapporté que la BBR augmentait l'expression du LDLR à travers les séquences présentes dans la section proximale de la région non traduite de son ARNm, la séquence 3'UTR, grâce à une activation forte et soutenue de la voie de signalisation ERK1/2 (Kong *et al.*, 2004) (**ANNEXE 2. C-D**).

Auparavant, Wilson *et al.* (1997) ont démontré que le traitement des cellules HepG2 avec le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) augmentait l'expression de l'ARNm du LDLR en impliquant à la fois l'activation de la transcription et la stabilisation de l'ARNm (Wilson *et al.*, 1997). Ils ont également prouvé l'importance de la séquence 3'UTR dans la

régulation de l'expression de l'ARNm par la fusion de la séquence 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL avec la région codante de l'ARNm de la β -globine. Les résultats ont montré une diminution de la stabilité de l'ARNm de la β -globine d'environ 20 fois. Par contre, le traitement des cellules HepG2 exprimant la forme fusionnée de l'ARNm avec le PMA permettait d'augmenter la durée de demi-vie de l'ARNm de 2 à 2,5 fois. Cette augmentation était presque similaire à la stabilisation de l'ARNm du LDLR endogène par le PMA (Wilson *et al.*, 1997).

Nakahara *et al.* (2002) ont remarqué que le traitement des cellules HepG2 par le CDCA permettait la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL *via* la voie ERK1/2 même en présence du 25-hydroxycholestérol, un suppresseur puissant de l'activation de SREBP et de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le récepteur LDL (Nakahara *et al.*, 2002). Une autre étude sur la régulation de l'ARNm du LDLR par le CDCA a permis d'élucider le mécanisme et d'identifier le motif ARE1 du 3'UTR comme la séquence responsable de la stabilisation dépendante de la voie ERK1/2. Dans cette étude, au moins cinq protéines cytoplasmiques ont été identifiées comme des protéines de liaison au motif ARE1 de l'ARNm du récepteur LDL en réponse au traitement par le CDCA. Étant donné que le motif ARE1 de la séquence 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL est hautement conservé chez l'humain, la souris et le lapin, il est possible qu'il soit critique pour le renouvellement et la stabilisation de l'ARNm du LDLR médiés par le CDCA (Yashiro *et al.*, 2011).

Récemment, Yashiro *et al.* (2013) ont également noté l'effet de AICAR sur la stabilisation du récepteur LDL (en ARNm et en protéines) dans les hépatocytes humains et dans les hépatocytes primaires de souris. Ils ont également dévoilé l'origine de cette augmentation qui était due à la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm en réponse à l'activation de la voie ERK1/2 et indépendamment de l'AMP kinase. En effet, l'activation de la voie ERK1/2 après une heure de traitement avec AICAR facilitait l'interaction entre la protéine HuR et le motif ARE1 et par conséquent, la stabilisation de l'ARNm (Yashiro *et al.*, 2013).

Ces observations ainsi que d'autres telles que le cas de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 qui pourrait être également stabilisé par un mécanisme dépendant de la voie MEK1/2-ERK1/2 (Xu *et al.*, 2000), soutiennent l'idée générale que les MAP kinases

sont impliquées dans la stabilisation de certain ARNm, y compris celui du récepteur LDL (Chen *et al.*, 2001).

La voie de signalisation des MEK1/2-ERK1/2 (Kong *et al.*, 2004 ; Abidi *et al.*, 2005a ; Yashiro *et al.*, 2013), de l'AMP cyclique (Auwerx *et al.*, 1989) et de la protéine Kinase C (Kamps and Van-Berkel. 1993) ont été identifiées comme des intermédiaires dans la régulation de l'ARNm du récepteur LDL. Ces voies de transduction de signaux sont généralement impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaires dans de nombreux systèmes (Haller *et al.*, 1994). En outre, la surexpression du récepteur LDL par ces stimuli pourrait être impliquée dans le recrutement de cholestérol pour une nouvelle synthèse de la membrane cellulaire dans les tissus hépatiques et non hépatiques (Wilson *et al.*, 1998).

L'analyse des résultats de spectrométrie de masse a identifié un total de 35 protéines de liaison à la séquence 3'UTR (Li *et al.*, 2009), y compris la protéine régulatrice de l'épissage de type KH (KSRP), la ribonucléoprotéine D (hnRNPD) et la ribonucléoprotéine I (hnRNP I) (Li *et al.*, 2009). Pour certaines substances la longueur du 3'UTR était importante pour avoir l'effet stabilisateur sur l'ARNm tel que le cas de la BBR (Kong *et al.*, 2004) et le PMA (Wilson *et al.*, 1997), alors que l'effet d'autres substance ne dépendait que du motif ARE1 comme le cas de AICAR (Yashiro *et al.*, 2013) et de CDCA (Yashiro *et al.*, 2011).

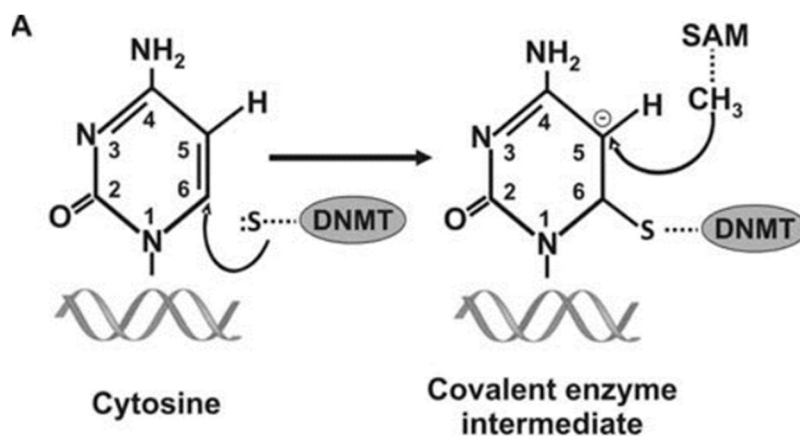
2. Régulation de l'expression du récepteur LDL par la 5-AzaC

La méthylation de l'ADN est le phénomène le plus connu et le mieux décrit en épigénétique (Reik., 2007). Ce processus est assuré par des enzymes appartenant à la famille des ADN méthyltransférase (DNMT). Chez les humains, les DNMTs lient le groupement méthyle (-CH₃) au carbone situé à la position 5 de la cytosine dans les ilots CpG (Schermelleh *et al.*, 2005), principalement situés à proximité du promoteur (environs près de 60% des promoteurs de gènes chez les mammifères) (Bestor., 2000).

La méthylation de l'ADN est un mécanisme étroitement lié aux modifications des histones acétyltransférases (les HATs) et des histones déacétyltransférases (les HDACs). En effet, les ilots CpG méthylés au niveau du promoteur d'un gène pourraient être facilement reconnus par des protéines de liaison spécifiques «*methyl-binding proteins*»

(MBPs) qui agissent comme des adaptateurs entre la méthylation de l'ADN et les facteurs de remodelage de la chromatine. Ces protéines adaptatrices peuvent recruter des co-répresseurs tels que les HDACs, et la DNMT et créer un complexe protéique permettant de réguler négativement l'expression d'un gène donné (Sasai *et al.*, 2009) en diminuant son interaction et son accessibilité aux facteurs de transcription (Prendergast and Zif., 1991).

Deux inhibiteurs de la DNMT (azanucléosides) ont été approuvés par « *US Food and Drug Administration* » (FDA) ; l'azacytidine (Vidaza; Celgene) et le décitabine (5-aza-2-deoxycytidine) (Dacogen; SuperGen). L'azacytidine et le décitabine ont été les premiers et les seuls agents utilisés pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë et du syndrome myélodysplasique. L'azacytidine a également été approuvée par l'Agence européenne du médicament pour son utilisation contre la leucémie myélomonocytaire chronique (Gros *et al.*, 2012). Il s'agit d'un analogue de la cytidine portant une modification en position 5 du cycle de la pyrimidine. Elle a été synthétisée par Sorm *et al.* (1964) et a été initialement utilisée comme un antimétabolite dans la chimiothérapie leucémique jusqu'à ce que ses propriétés hypométhylantes aient été découvertes. Dans la cellule, l'azacytidine se convertit en une forme active et donne la 5-Azacytidine (5-AzaC). En tant que ribonucléoside, l'azacytidine peut s'incorporer au niveau de l'ARN et, avec moins d'affinité, à l'ADN (Leone *et al.*, 2003). Après son incorporation au niveau de l'ADN, la 5-AzaC pourrait perturber l'interaction entre l'ADN et la DNMT grâce à la présence du groupement azote au lieu du carbone en position 5 (Santi *et al.*, 1984) (**Figure 25**).



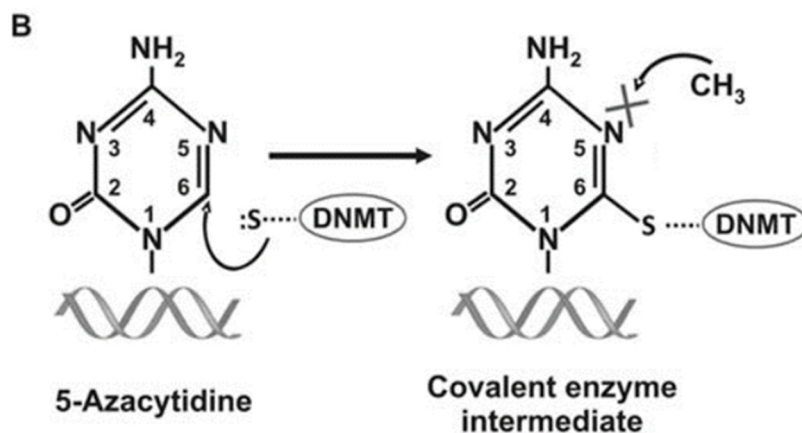


Figure 25 : Représentation de la méthylation de l'ADN (A), et de l'inhibition de la DNMT (B) (Source : Gnyszka *et al.*, 2013).

2.1. Stabilisation post-transcriptionnelle de l'ARNm du récepteur LDL par la 5-AzaC

Dans notre présente étude ainsi qu'une étude précédente (Poirier *et al.*, 2014), nous avons identifié pour la première fois le médicament épigénétique 5-AzaC comme étant un stabilisateur puissant de l'ARNm du récepteur LDL dans les cellules HepG2 et Huh7. Nous avons également rapporté que cet effet ne dépendait ni du facteur de transcription SREBP ni de l'activation de la HMG-Co réductase (Poirier *et al.*, 2014). Ces résultats préliminaires nous ont poussé à réaliser des expériences supplémentaires afin de mieux comprendre le mécanisme de stabilisation du récepteur LDL par la 5-AzaC.

Tout comme les résultats obtenus avec la BBR (Kong *et al.*, 2004), le CDCA (Yashiro *et al.*, 2011), le PMA (Wilson *et al.*, 1997) et AICAR (Yashiro *et al.*, 2013), nous avons pu identifier l'origine de cette augmentation qui était due à la stabilisation de l'ARNm *via* la séquence 3'UTR du récepteur LDL dans les cellules HepG2 (ANNEXE 2. A-B) et les cellules Huh7. Pour avoir lieu, cette stabilisation nécessite la présence de la séquence complète du 3'UTR de l'ARNm du LDLR (ANNEXE 3). Grâce à des mutations individuelles effectuées au niveau des motifs constituant le 3'UTR (ARE1, ARE2, ARE3 ou UCAU) nous avons pu identifier le motif ARE1 comme la séquence la plus importante au niveau de laquelle la 5-AzaC exerce son effet stabilisateur dans les cellules Huh7. Ces résultats concordent bien avec ceux observés auparavant suite au traitement des cellules de l'hépatome humain par le CDCA et AICAR (Yashiro *et al.*, 2011 ; Yashiro *et al.*, 2013).

Nos recherches ont cependant démontré que la 5-AzaC stabilise l'ARNm du LDLR par un mécanisme jusque-là inconnu.

2.2. Activation de la voie de signalisation ERK1/2 et du récepteur EGFR par la 5-AzaC

Les protéines kinases jouent un rôle primordial en déclenchant différentes cascades de signalisation au niveau de la cellule ce qui lui permet d'assurer ses fonctions comme partie intégrante d'un organisme. La régulation anormale des voies de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) pourrait engendrer un large éventail de maladies telles que le cancer (Roberts and Der., 2007), l'obésité (Hirosumi *et al.*, 2002), le diabète (Hirosumi *et al.*, 2002), les maladies cardiovasculaires (Muslin., 2008) et la maladie d'Alzheimer (Giovannini *et al.*, 2008).

L'activation des MAPK se fait généralement en réponse à des stimuli extracellulaires comme les facteurs de croissance, les cytokines, les mitogènes, les hormones et le stress oxydant (Cobb and Goldsmith., 1995). Ces stimuli déclenchent généralement un signal après interaction avec des récepteurs situés à la surface cellulaire tels que les récepteurs à tyrosine kinases (RTK), les récepteurs couplés à la protéine G et le récepteur des facteurs de la croissance épidermique (EGFR). Ces derniers transmettent des signaux d'activation suite au recrutement du facteur SOS «*son of sevenless*» par l'intermédiaire du facteur Grb2 et l'activation de la voie RAS. La stimulation de RAS déclenche plusieurs cascades de signalisation, y compris l'activation de la MAPK kinase kinase (MAPKKK), RAF, ce qui entraîne un changement de conformation de RAF et la phosphorylation des MAPKK et des MAPK au niveau des résidus thréonine/ tyrosine. Une fois activées, les MAPK phosphorylent les résidus serine/ thréonine d'une multitude de substrats et régulent par conséquent la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'expression des gènes (Whitmarsh and Davis., 1998).

L'activation de la voie MEK1/2 entraîne la phosphorylation des résidus thréonine/ tyrosine (Thr-Glu-Tyr) au niveau des protéines ERK1/2 (Kyriakis *et al.*, 1992) (**Figure 26**).

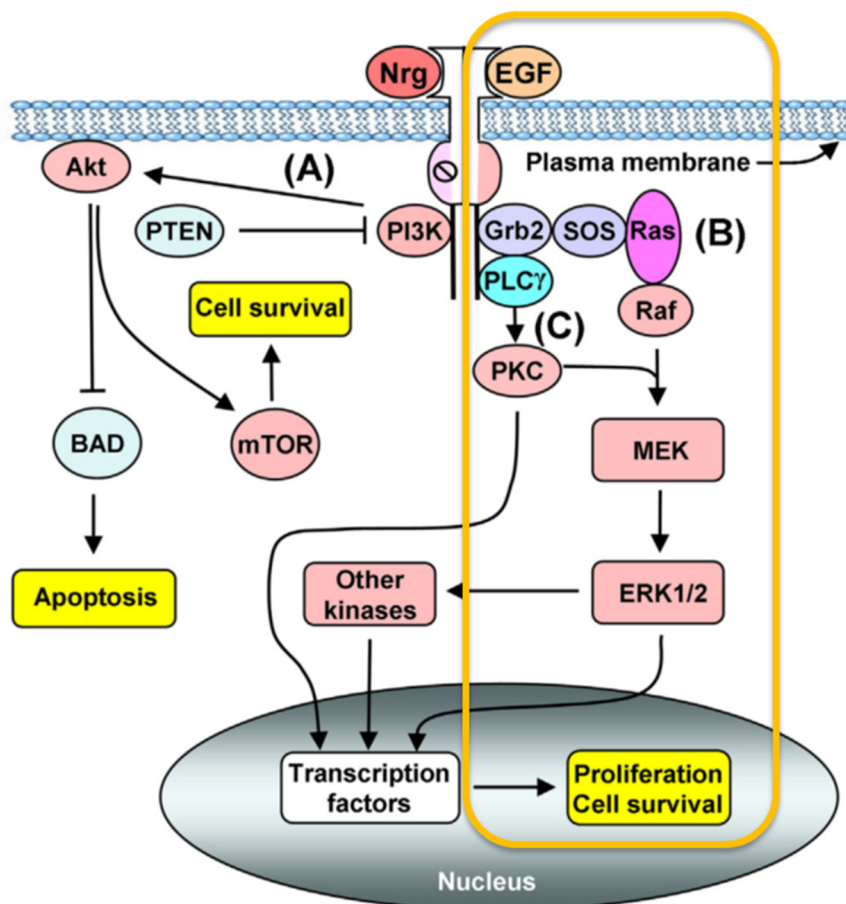


Figure 26 : Activation de la voie de signalisation ERK1/2 par le récepteur EGFR ainsi que les protéines impliquées (Source : Roskoski *et al.*, 2014, Modifiée).

Nos résultats montrent une phosphorylation forte et soutenue de la voie ERK1/2 par la 5-AzaC. De plus, l'inhibition de la voie MEK1/2 par l'inhibiteur spécifique U0126 a diminué significativement l'expression du récepteur LDL (ANNEXE 4). Ces résultats montrent que l'effet stabilisateur de la 5-AzaC sur l'expression du récepteur LDL nécessite l'activation de la voie de signalisation ERK1/2, ce qui concorde bien avec les études précédemment publiées (Kong *et al.*, 2004 ; Abidi *et al.*, 2005a., Abidi *et al.*, 2005b ; Yashiro *et al.*, 2011 ; Yashiro *et al.*, 2013).

Nos résultats rapportent également que l'effet de la 5-AzaC sur le récepteur LDL ne pourrait pas être dû à l'activation de la protéine kinase C (PKC) vu que le traitement avec le PMA, un activateur puissant de la PKC, pendant 24h n'avait aucun effet sur l'expression du récepteur LDL. De même, l'activation ou l'inhibition de l'AMP kinase par

AICAR et la dorsomorphine (Compound C: CC), respectivement, pendant 24h n'avaient pas d'effet sur la stabilisation du récepteur LDL par la 5-AzaC. Ces résultats montrent que l'effet stabilisateur de la 5-AzaC est AMPK- et PKC-indépendant.

Afin de pousser plus loin et élucider les mécanismes déclenchés en amont de l'activation de la voie ERK1/2, nous avons analysé les résultats de l'expression des gènes après 24h de traitement des cellules HepG2 avec la 5-AzaC. Nous avons remarqué une augmentation très significative des gènes codant pour l'amphiréguline (AREG X16) et l'épiréguline (EREG X25). Ces deux derniers sont des ligands spécifiques et des activateurs importants de la voie de signalisation du récepteur EGF (Tejpar *et al.*, 2008).

Les récepteurs à tyrosine kinase ErbB/HER, y compris EGFR, sont parmi les familles de récepteurs les plus étudiés en signalisation cellulaire en biologie (Lemmon and Schlessinger., 2010). Le EGFR a été découvert pour la première fois par Cohen *et al.* (1982). Il s'agit d'un polypeptide de 170 kDa contenant à la fois un domaine de liaison des facteurs de croissance et un domaine kinase intracellulaire (Cohen *et al.*, 1982). L'activation du domaine kinase de EGFR par la phosphorylation du résidu tyrosine peut induire la phosphorylation de plusieurs substrats cytoplasmiques (Chang *et al.*, 1993). Les résultats publiés par Lee *et al.* (2007) ont démontré que l'activation du EGFR par les facteurs de croissance EGF jouait un rôle important dans la stabilisation post-transcriptionnelle du gène codant pour la gastrine. De plus ils ont montré que la protéine hnRNP K était impliquée dans cette cascade de signalisation (Lee *et al.*, 2007). Egalement, Guo *et al.* (2011) ont remarqué une augmentation significative de l'expression du LDLR en ARNm et en protéines après stimulation du EGFR par les facteurs EGF pendant 30 min et 2h, respectivement (Guo *et al.*, 2011).

Le traitement des cellules pendant 6h avec la 5-AzaC a permis une augmentation accrue de la phosphorylation du EGFR. Par contre, nous avons remarqué une diminution du signal et même la diminution du EGFR total après 24h de traitement. Nos résultats ont également montré que l'inhibition de la phosphorylation du EGFR par l'inhibiteur spécifique PD153035 a diminué considérablement l'expression du LDLR et la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules Huh7 traitées pendant 24h avec la 5-AzaC et a renversé significativement l'effet stabilisateur de la 5-AzaC dans les cellules Huh7 transfectées avec la séquence 3'UTR de l'ARNm du LDLR. D'après la littérature,

l'activation accrue des récepteurs à tyrosine kinase, y compris EGFR, conduit à leur internalisation par endocytose, et par la suite, à leur dégradation intracellulaire (Zwang and Yarden, 2009). En effet, la diminution spectaculaire de la demi-vie du EGFR après son internalisation conduit à la diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Wells *et al.*, 1990). Dans les cellules en culture exprimant le EGFR d'une façon faible ou modérée, la demi-vie du récepteur est de 6h à 10h (Stoscheck *et al.*, 1984).

2.3. Activation de la cascade de signalisation IRE1 α -JNK par la 5-AzaC

Dans notre liste de gènes significativement augmentés par le traitement avec la 5-AzaC, nous avons remarqué une augmentation de 5 fois de l'expression du gène codant pour la voie de signalisation JNK. Nos résultats montrent que le blocage de la voie de signalisation JNK par l'inhibiteur spécifique SP600125 a engendré une diminution considérable de l'expression du LDLR et de p-ERK1/2 en protéine et même la diminution du LDLR, AREG et EREG en ARNm. Dans ce même contexte, Vargas *et al.* (2009) ont démontré l'importance de l'activation de la voie de signalisation JNK dans la stabilisation post-transcriptionnelle du récepteur LDL dans les cellules HepG2 traitées avec le 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (Vargas *et al.*, 2009).

La voie de signalisation JNK pourrait également augmenter l'expression du LDLR au niveau transcriptionnel (Kartawijaya *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2007) en favorisant l'augmentation du niveau nucléaire de SREBP-2 ainsi que son interaction avec le promoteur du LDLR après le traitement des cellules HepG2 avec la génistéine pendant 24h (Kartawijaya *et al.*, 2016) et avec la BBR (Lee *et al.*, 2007). Contrairement à la génistéine et la BBR, la 5-AzaC n'a pas eu un effet significatif sur l'expression de SREBP-2 ni sur son niveau de maturation (Poirier *et al.*, 2014). Cela veut dire clairement que l'activation de la voie JNK et la surexpression du LDLR par la 5-AzaC ne dépendent pas du facteur SREBP-2. De même, les résultats publiés par Abidi *et al.* (2005b) ont montré que le blocage de la voie MEK1/2-ERK1/2 par l'inhibiteur U0126 n'affectait pas la maturation du facteur de transcription SREBP-2 induite par le GW707, mais, par contre, il diminuait le niveau du LDLR (Abidi *et al.*, 2005b).

Il a été démontré que l'inhibition de la voie JNK par le SP600125 permettait une diminution importante de l'expression de AREG dans les macrophage M1 (Meng *et al.*, 2015) et de EREG dans les cellules U87 (Auf *et al.*, 2013).

Parmi les activateurs les plus connus de la voie de signalisation JNK nous trouvons les UV, les espèces réactives d'oxygène (ROS), les cytokines (Kyriakis *et al.*, 1994) et le stress au niveau du RE (Srivastava *et al.*, 1999 ; Auf *et al.*, 2013). L'activation de la voie JNK par le stress du RE se fait à travers une protéine transmembranaire située au niveau de la membrane du RE, la «*Inositol-Requiring Enzyme 1 α* » (IRE1 α) (Urano *et al.*, 2000 ; Auf *et al.*, 2013) (**Figure 27**).

En effet, au niveau des fibroblastes, l'activation de la voie JNK par le stress du RE se fait grâce à la liaison de la partie cytoplasmique de IRE1 α avec le facteur «*TNF receptor-associated factor 2*» (TRAF2). Ce dernier joue le rôle de protéine adaptatrice permettant l'activation des récepteurs membranaires qui vont à leur tour activer la voie JNK (Urano *et al.*, 2000).

Nos résultats précédemment publiés par Poirier *et al.* (2014) ont montré également une augmentation de l'expression du gène codant pour IRE1 α par la 5-AzaC (8,6 fois) (Poirier *et al.*, 2014). Dans cette présente étude, nous avons remarqué que la surexpression de IRE1 α par la 5-AzaC est similaire à celle observée lorsque les cellules Huh7 sont traitées avec la thapsigargine (Th), un agent utilisé pour induire le stress au niveau du RE par l'épuisement de la réserve en calcium. Pour comprendre le lien entre l'activation de la voie IRE1 α -JNK et la stabilisation du récepteur LDL, nous avons procédé à un knockdown du gène *IRE1 α* dans les cellules Huh7. La diminution de l'expression de IRE1 α (environ 50%) a induit une diminution remarquable de l'effet de la 5-AzaC sur l'expression de LDLR et de p-ERK1/2.

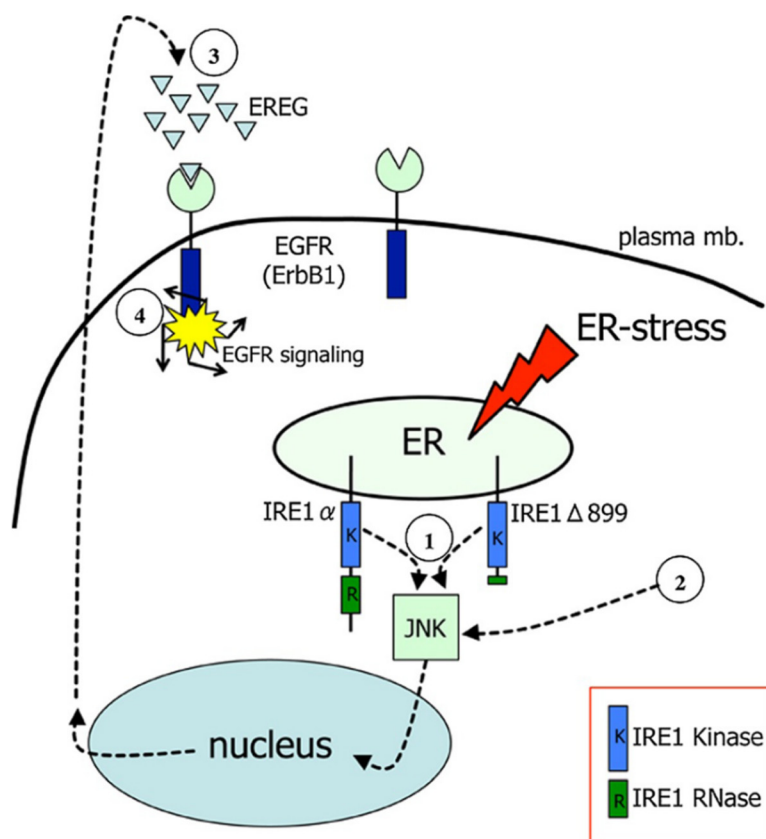


Figure 27 : Mécanisme contrôlant l'expression de EREG par la voie de signalisation IRE1 α -JNK (Source : Auf *et al.*, 2013).

2.4.Activation de la voie de signalisation IRE1 α d'une façon indépendante du stress du RE

Le stress au niveau du RE pourrait être déclenché dans des conditions physiologiques et pathologiques diverses telles que l'exposition à des agents chimiothérapeutiques et l'accumulation de protéines mal repliées (UPRs) dans le RE (Lin *et al.*, 2008; Ron and Hubbard, 2008). Cependant, le stress du RE induit par les UPRs déclenche l'expression de protéines chaperonnes telles que les protéines régulées par le glucose, la GRP78 (Dong *et al.*, 2008) et la GRP94 (Yoshida *et al.*, 1998), la protéine homologue C/EBP (CHOP), la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (p-eIF2 α) (Lin *et al.*, 2008) et l'épissage non conventionnel du facteur de transcription «*X-box binding protein 1*» (XBP1) suite à l'activation de IRE1 α (Yoshida *et al.*, 2001). Contrairement à la Th, le traitement des cellules Huh-7 avec la 5-AzaC n'a pas fait augmenter l'expression des marqueurs du stress du RE y compris GRP78, p-eIF2 α et

CHOP. De même, nous n'avons observé aucun effet sur l'épissage de XBP1. L'acide tauroursodeoxycholique (TUDCA) est connu comme un inhibiteur puissant et spécifique du stress total du RE. Il est capable de réduire le niveau des marqueurs du stress induits par le traitement des cellules Huh7 par la Th (Xie *et al.*, 2002). De même, nos résultats montrent que le prétraitement des cellules Huh-7 avec le TUDCA diminue considérablement l'effet de la Th sur l'expression de GRP78, mais il n'a pas d'effet sur l'activation de IRE1 α et de p-ERK1/2 par la 5-AzaC. Ces résultats montrent que l'activation de la voie IRE1 α par la 5-AzaC ne nécessite pas d'activation du stress du RE. Une étude récente réalisée par l'équipe Volmer *et al.* (2013) a montré des résultats semblables. En effet, les résultats de cette étude ont rapporté que la voie de signalisation du RE, IRE1 α , pouvait être activée par les acides gras saturés (SFA) *via* un mécanisme indépendant du stress du RE (Volmer *et al.*, 2013). Ce nouveau mécanisme a été observé après saturation de la membrane cellulaire avec des lipides. Il n'impliquait pas la réponse des UPRs, mais, il nécessitait plutôt l'interaction de IRE1 α avec des partenaires cytoplasmiques qui assurent son activation (Cox *et al.*, 1993; Kitai *et al.*, 2013).

La protéine IRE1 α est une enzyme bifonctionnelle qui possède un domaine luminal, un domaine transmembranaire et un domaine kinase (Ser/Thr) et un domaine endoribonucléase cytoplasmique (Cox *et al.*, 1993; Auf *et al.*, 2013). En présence du stress au niveau du RE, IRE1 α s'active par oligomérisation ce qui aboutit à sa phosphorylation. L'activation du domaine endoribonucléase permet l'épissage de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 (Mimura *et al.*, 2012).

Dans la suite de cette étude, nous avons évalué la contribution possible des domaines kinase et RNase de IRE1 α dans l'effet stabilisateur de l'ARNm du récepteur LDL et de l'activation des voies de signalisation JNK et ERK1/2. Nos résultats ont montré que l'emploi de l'inhibiteur spécifique du domaine kinase (Ghosh *et al.*, 2014), KIRA 6, a fortement diminué l'expression de l'ARNm du LDLR, AREG et EREG et la surexpression des protéines LDLR, IRE1 α et p-ERK1 / 2 induites par la 5-AzaC. De même, KIRA 6 a inhibé l'effet de la Th sur l'expression de IRE1 α , de la GRP78 et de p-ERK1/2 et sur l'épissage de XBP1.

Nos expériences montrent que l'inhibiteur spécifique du domaine RNase de IRE1 α , ST-083010 (Papandreou *et al.*, 2011) a bloqué l'épissage de XBP1 et l'activation de IRE1 α ,

de p-ERK1 / 2 et la GRP78 par la Th. De façon surprenante, l'inhibiteur ST-083010 n'a eu aucun effet sur l'activation des gènes précédemment mentionnés ni sur la stabilisation du récepteur LDL par la 5-AzaC. Ces résultats montrent bel et bien que l'activation de IRE1 α par la 5-AzaC se fait au niveau de son domaine kinase et que le domaine RNase n'est pas impliqué dans cette cascade de signalisation. Pour confirmer nos résultats, nous avons créé deux lignées de cellules Huh7 exprimant la forme sauvage de IRE1 α ou la forme portant une mutation au niveau de son domaine RNase, la K907A. La mutation K907A permet d'inhiber le domaine RNase mais elle n'a aucun effet sur l'activité kinase de IRE1 α (Tirasophon *et al.*, 2000). Les résultats observés avec nos cellules Huh7 exprimant les deux formes de IRE1 α d'une façon transitoire ou stable ont montré que l'effet de la 5-AzaC sur l'expression du récepteur LDL et l'activation de ERK1/2 dans les cellules portant la mutation K907A était similaire à celui observé dans le cas des cellules transfectées avec la forme sauvage de IRE1 α aussi bien dans les lignées Huh-7 stables que transitoires. Dans le même contexte, Auf *et al.* (2013) ont montré que l'activation de la voie JNK et la surexpression de EREG dans les cellules U87 étaient dues à l'activation du domaine kinase de IRE1 α (Auf *et al.*, 2013). De même, Urano *et al.* (2000) ont démontré auparavant que le domaine kinase de IRE1 α est responsable de l'activation de la voie JNK (Urano *et al.*, 2000).

Parmi les gènes dont l'expression a significativement augmentée avec la 5-AzaC, nous trouvons le gène qui code pour la protéine «*Early growth response protein 1*» (EGR1) qui a augmenté de 16 fois dans les cellules HepG2 (**Figure 24**) et de 2 fois dans les cellules Huh7 après 24h et 6h du traitement avec la 5-AzaC. Cette augmentation a été significativement inhibée par l'inhibiteur U0126 (**ANNEXE 5**). Nos résultats du knockdown du gène *EGR1* dans les cellules Huh7 n'avait aucun effet sur l'expression du LDLR. D'après la littérature, le gène *EGR1* est caractérisé par sa régulation post-transcriptionnelle *via* la séquence 3'UTR (Simon *et al.*, 2004) et probablement, il est régulé de la même façon avec la 5-AzaC.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

En 1938, la triade composée de l'hypecholestérolémie, la présence d'xanthomes et le développement de l'athérosclérose à un âge précoce a été identifiée par Müller comme un caractère familial particulier. Environ vingt ans plus tard, l'idée de cette triade clinique avait évolué et les chercheurs ont suggéré qu'elle pouvait être d'origine génétique. Le développement des technologies dans les années 1950 a permis de démontrer que l'hypecholestérolémie était étroitement liée à l'augmentation sélective d'une seule classe de lipoprotéines connue sous le nom de LDL. Dans les années 1970, le récepteur LDL a été identifié comme la protéine membranaire responsable, sous une de ses formes mutées, de la FH. Le gène codant pour le récepteur a été purifié en 1982, cloné en 1984, caractérisé et localisé au niveau du chromosome 19 en 1985. Le récepteur LDL est une glycoprotéine transmembranaire exprimée abondamment à la surface des cellules du foie et joue un rôle crucial dans la clearance et l'homéostasie du cholestérol sanguin. Puisque les taux plasmatiques de LDL-c jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, l'activité de ce récepteur influence grandement sur la susceptibilité d'un individu à développer une maladie cardiovasculaire.

Dans cet ouvrage, nous avons tout d'abord démontré pour la première fois la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL par la 5-AzaC grâce à la séquence 3'UTR et plus précisément, le motif ARE1. En décortiquant le mécanisme d'action de la 5-AzaC dans la régulation du récepteur LDL, nous avons pu identifier une cascade de signalisation, IRE1 α -JNK-EGFR-ERK1/2, différente des voies classiques précédemment documentées, comme une nouvelle voie de signalisation activée par la 5-AzaC et permettant la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL. Nous avons noté que c'est une voie dépendante de l'activation du domaine kinase de IRE1 α mais indépendante du stress du RE, de l'activation de la PKC et de l'AMPK.

Très prochainement, nous allons sans doute 1) identifier les protéines impliquées dans la stabilisation de l'ARNm du récepteur LDL par la 5-AzaC et comprendre leurs mécanismes d'activation afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant l'augmentation de l'expression du récepteur LDL et la réduction du taux de

LDL-c plasmatique. **2)** élucider le rôle de ces protéines dans la localisation spacio-temporelle de LDLR (la localisation 3'UTR-dépendante (UDPL)) et mesurer la vitesse de recyclage du récepteur LDLR. **3)** connaître l'effet de la 5-AzaC sur l'efficacité du récepteur LDL à internaliser les particules de LDL-c. Et pour aller encore plus loin, élucider les mécanismes de régulation de l'expression d'autres gènes par la 5-AzaC tels que les gènes clés impliqués dans le métabolisme et le transfert des lipides, y compris, PCSK9 (**ANNEXE 6**), la HMG-Co, le « *Diacylglycerol O- acyltransferase -1*» (DGAT-1) et le « *Microsomal triglyceride transfer protein* » (MTTP) (**ANNEXE 7**).

BIBLIOGRAPHIE**A**

Abdelmohsen K, Hutchison ER, Lee EK, et al. (2010). miR-375 inhibits differentiation of neuritis by lowering HuD levels. *Mol. Cell Biol.* 30, 4197-4210.

Abidi P, Chen W, Kraemer FB, et al. (2006). The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new action mechanisms. *J Lipid Res.* 47, 2135-2147.

Abidi P, Zhou Y, Jiang JD, et al. (2005a). Extracellular signal-regulated kinase-dependent stabilization of hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA by herbal medicine berberine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25, 2170-2176.

Abidi P, Zhang F, Li C, and Liu J. (2005b). Blockage of the ERK signaling pathway abrogates the SCAP ligand-induced transcriptional activation of the LDL receptor gene in HepG2 cells. *Int J Mol Med.* 16, 779-785.

Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 34, 154-156.

Aengevaeren WR, Kroon AA, Stalenhoef AF, et al. (1996). Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). *J Am Coll Cardiol.* 28, 1696-1704.

Agence de la santé publique du Canada (2010). Rapport du Système canadien de surveillance des maladies chroniques : L'hypertension au Canada, 2010.

Ai D, Chen C, Han S, et al. (2012). Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *J Clin Invest.* 122, 1262-1270.

Akashi M, Shaw G, Hachiya M, et al. (1994). Number and location of AUUUA motifs: role in regulating transiently expressed RNAs. *Blood.* 83, 3182-3187.

American Heart Association. (2017). Heart disease and stroke statistics—2017. [published online ahead of print January 25, 2017]. *Circulation.* doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.

Amirouche A, Tadesse H, Miura P, et al. (2014). Converging pathways involving microRNA-206 and the RNA-binding protein KSRP control post-transcriptionally utrophin A expression in skeletal muscle. *Nucleic Acids Res.* 42, 3982-3997.

Anderson RGW, Goldstein JL, and Brown MS. (1976). Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 73, 2434-2438.

Ansell BJ, Watson KE, and Fogelman AM. (1999). An evidence-based assessment of the NCEP adult treatment panel II guidelines. National cholesterol education program. *J Am Med Assoc.* 282, 2051-2057.

Arias-Moreno X, Velázquez-Campoy A, Rodríguez JC, et al. (2008). Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the Endosome. *J Biol Chem.* 283, 22670-22679.

Armendariz AD, and Krauss RM. (2009). Hepatic nuclear factor 1-alpha: inflammation, genetics, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 20, 106-111.

Auf G, Jabouille A, Delugin M, et al. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer.* 13, 1471-2407.

Auwerx JH, Chait A, Wolfbauer G, and Deeb SS. (1989). Involvement of second messengers in regulation of the low-density lipoprotein receptor gene. *Mol. Cell Biol.* 9, 2298-2302.

B

Babu S, Joladarashi D, Jeyabal P, et al. (2015). RNA-stabilizing proteins as molecular targets in cardiovascular pathologies. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 25, 676-683.

Babu S, Wojtowicz A, Freichel M, et al. (2012). Mechanism of stretch-induced activation of the mechano-transducer zyxin in vascular cells. *Sci Signal.* 5, ra91.

Bansal A, and Gierasch LM. (1991). The NPXY internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell.* 67, 1195-1201.

Barreau C, Paillard L, and Osborne HB. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 33, 7138-7150.

Barter PJ, and Rye KA. (2006). Cardioprotective properties of fibrates: which fibrate, which patients, what mechanism? *Circulation.* 113, 1553-1555.

Basak A. (2005). Inhibitors of proprotein convertases. *J. Mol. Med.* 83, 844-855.

- Bays H, and Stein EA. (2003).** Pharmacotherapy for dyslipidemia-current therapies and future agents. *Expert Opin Pharmacother.* 4, 1901-1938.
- Bays HE, Neff D, Tomassini JE, and Tershakovec AM. (2008).** Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 6, 447-470.
- Beglova N, and Blacklow Sc. (2005).** The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem Sci.* 30, 310-317.
- Benjannet S, Rhains D, Essalmani R, et al. (2004).** NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem.* 279, 48865-48875.
- Benjannet S, Rhains D, Hamelin J, et al. (2006).** The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem.* 281, 30561-30572.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. (1995).** Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 91, 2488-2496.
- Bestor TH. (2000).** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 9, 2395-2402.
- Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, and Nicolin A. (2003).** Posttranscriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol.* 195, 356-372.
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, et al. (2006).** Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 125, 1111-1124.
- Bhatti HN, and Khera RA. (2012).** Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids.* 77, 1267-1290.
- Black DM. (2002).** Gut-acting drugs for lowering cholesterol. *Curr Atheroscler Rep.* 4, 71-75.
- Blackshear PJ. (2002).** Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans.* 30, 945-952.
- Blumenthal RS. (2000).** Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *Am. Heart. J.* 139, 577-583.
- Boden-Albala B. (2006).** Current understanding of multiple risk factors as the metabolic syndrome: distillation or deconstruction. *Semin. Neurol.* 26, 108-116.

- Bolognani F, Contente-Cuomo T, and Perrone-Bizzozero NI. (2010).** Novel recognition motifs and biological functions of the RNA-binding protein HuD revealed by genome-wide identification of its targets. *Nucleic Acids Res.* 38, 117-130.
- Booz GW, and Baker KM. (1996).** Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 28, 635-640.
- Boren J, Olin K, Lee I, et al. (1998).** Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 101, 2658-2664.
- Brennan CM, and Steitz JA. (2001).** HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 266-277.
- Brennan CM, Gallouzi IE, and Steitz JA. (2000).** Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNA *in vivo*. *J Cell Biol.* 151, 1-14.
- Briata P, Chen CY, Giovarelli M, et al. (2011).** KSRP, many functions for a single protein. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16, 1787-1796.
- Briata P, Forcales SV, Ponassi M, et al. (2005).** p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell.* 20, 891-903.
- Brown BG, Zhao XQ, Chait A. et al. (2001).** Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N. Engl. J. Med.* 345, 1583-1592.
- Brown MS, and Goldstein JL. (1974).** Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 71, 788-792.
- Brown MS, and Goldstein JL. (1986).** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232, 34-47.
- Brown MS, and Goldstein JL. (1997).** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89, 331-340.
- Brown MS, and Goldstein JL. (2008).** Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res.* 15-27.

Brown MS, Dana SE, and Goldstein JL. (1973). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 70, 2162-2166.

Brown MS, Ye J, Rawson RB, and Goldstein JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 100, 391-398.

Brunetti-Pierri N, Corso G, Rossi M, et al. (2002). Lathosterolosis, a novel multiple malformation/ mental retardation syndrome due to deficiency of 3 β hydroxysteroid- Δ^5 -desaturase. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 952-958.

Brusq JM, Ancellin N, Grondin P, et al. (2006). Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *J Lipid Res.* 47, 1281-1288.

Butler JS. (2002). The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol.* 12, 90-96.

Burd CG, and Dreyfuss G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science.* 265, 615-621.

C

Calkin AC, Goult BT, Zhang L, et al. (2011). FERM-dependent E3 ligase recognition is a conserved mechanism for targeted degradation of lipoprotein receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 108, 20107-20112.

Cameron J, Holla L, Ranheim T, et al. (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet.* 15, 1551-1558.

Canadian Diabetes Association, An Economic Tsunami: The Costs of Diabetes in Canada, 2009.

Canadian Institute of Health Information, A Snapshot of Health Care in Canada as Demonstrated by Top 10 Lists, 2011 (*Ottawa: CIHI, 2011*).

Canuel M, Sun X, Asselin MC, et al. (2013). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PloS One.* 8, e64145.

Cappel DA, Palmisano BT, Emfinger CH, et al. (2013). Cholesteryl ester transfer protein protects against insulin resistance in obese female mice. *Mol Metab.* 2, 457-467.

Carballo E, Cao H, Lai WS, et al. (2001). Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *J Biol Chem.* 276, 42580-42587.

Carballo E, Lai WS, and Blackshear PJ. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science.* 28, 1001-1005.

Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, et al. (2008). Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Lipid Res.* 49, 394-398.

Carlos HP, Theresa R, Harring N, et al. (2011). Homozygous Familial Hypercholesterolemia: Case Series and Review of the Literature. *Case Reports in Transplantation.* 1-5.

Carpenter G, and Cohen S. (1990). Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 265, 7709-7712.

Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, et al. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 277, 228-231.

Castellano M, and Bohm M. (1997). The cardiac beta-adrenergic receptor- mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 29, 715-722.

Chang CP, Lazar CS, Walsh BJ, et al. (1993). Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *J Biol Chem.* 268, 19312-19320.

Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, et al. (2005). Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Ann. NY Acad. Sci.* 1058, 196-204.

Chen CY, and Shyu AB. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 20, 465-470.

Chen CY, Chen TM, and Shyu AB. (1994). Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol. Cell Biol.* 14, 416-426.

Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, et al. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* 14, 1236-1248.

- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, et al. (2001).** AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*. 107, 451-464.
- Chen WJ, Goldstein JL, and Brown MS. (1990).** NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 265, 3116-3123.
- Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, et al. (2012).** The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 222, 314-323.
- Chen W, Silver DL, Smith JD, and Tall AR. (2000).** Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J Biol Chem*. 275, 30794-30800.
- Chen Y, and Varani G. (2005).** Protein families and RNA recognition. *FEBS J*. 272, 2088-2097.
- Choi JE, Hur W, Kim JH, et al. (2014).** MicroRNA-27a modulates HCV infection in differentiated hepatocyte-like cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 9, e91958.
- Civeira F. (2004).** Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 173, 55-68.
- Clapham DE. (1995).** Calcium signalling. *Cell*. 80, 259-268.
- Clayton P, Mills K, Keeling J, and FitzPatrick D. (1996).** Desmosterolosis: a new inborn error of cholesterol biosynthesis. *Lancet*. 348, 404.
- Cobb MH, and Goldsmith EJ. (1995).** How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*. 270, 14843-14846.
- Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, and Hobbs HH. (2006).** Sequence variations in PCSK9 and LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med*. 354, 1264-1272.
- Cohen S. (1983).** The epidermal growth factor (EGF). *Cancer*. 51, 1787-1791.
- Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, and Chinkers M. (1982).** A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem*. 257, 1523-1531.
- Corsini A, Bellosta S, Baetta R, et al. (1999).** New insights into the pharmacodynamics and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther*. 84, 413-428.

Costet P, Krempf M, and Cariou B. (2008). PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci.* 33, 426-434.

Cougot N, van Dijk E, Babajko S, and Seraphin B. (2004). Cap-tabolism. *Trends Biochem Sci.* 29, 436-444.

Cox JS, Shamu CE, and Walter P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 73, 1197-1206.

Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 413-419.

Cupples LA, and D'Agostino RB. (1987). Section 34: some risk factors related to the annual incidence of cardiovascular disease and death in pooled repeated biennial measurements. In: *Kannel WB, Wolf PA, Garrison RJ, eds. Framingham Heart Study: 30 Year Follow-Up.* Bethesda, Md: US Department of Health and Human Services.

D

Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, et al. (1990). Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer—A quantitative western blot analysis. *Ann. Neurol.* 27, 544-552.

Damgaard D, Jensen JM, Larse ML, et al. (2004). NO genetic linkage or molecular evidence for involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 genes in the familial hypercholesterolemia phenotype in a sample of Danish families without pathogenic mutations in the LDL receptor and *APOB* genes. *Atherosclerosis.* 177, 415-422.

Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, and Camejo G. (2010). Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 156-163.

Davis CG, Elhammer A, Russell DW, et al. (1986). Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem.* 261, 2828-2838.

- Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, et al. (1987a).** Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*. 326, 760-765.
- Davis CG, Van Driel IR, Russell DW, et al. (1987b).** The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem*. 262, 4075-4082.
- Dean JL, Sully G, Clark AR, and Saklatvala J. (2004).** The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal*. 16, 1113-1121.
- De Castro-Orós I, Pocoví M, and Civeira F. (2010).** The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *The Application of Clinical Genetics*. 3, 53-64.
- DeMaria CT, and Brewer G. (1996).** AUF1 binding affinity to AU-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem*. 271, 12179-12184.
- Demers A, Samami S, Lauzier B, et al. (2015).** PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35, 2517-2525.
- Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, and Heller FR. (2001).** The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 157, 514-518.
- Devaux PF. (1993).** Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 3, 489-494.
- Diamond RH, Du K, Lee VM, et al. (1993).** Novel delayed-early and highly insulin-induced growth response genes: identification of HRS, a potential regulator of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*. 268, 15185-15192.
- DiDomenico BJ, Bugaisky GE, and Lindquist S. (1982).** The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*. 31, 593-603.
- Doller A, Akoollel S, Huwiler A, et al. (2008).** Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase C delta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol. Cell Biol*. 28, 2608-2625.

Doller A, Gauer S, Sobkowiec KE, et al. (2009). Angiotensin II induces renal plasminogen activator inhibitor-1 and cyclooxygenase-2 expression post-transcriptionally via activation of the mRNA-stabilizing factor human-antigen R. *Am J Pathol.* 174, 1252-1263.

Dong D, Ni M, Li J, et al. (2008). Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res.* 15, 498-505.

Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 1454-1459.

Dudley KS, Steven LG, and Argraves WS. (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 66-74.

Dreyfuss G, Hentze M, and Lamond AI. (1996). From transcript to protein. *Cell,* 85, 963-972.

Dreyfuss G, Kim VN, and Kataoka N. (2002). Messenger RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 195-205.

E

Eberhardt W, Doller A, Akool ES, and Pfeilschifter J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* 114, 56-73.

Edwards PA, and Ericsson J. (1998). Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway: mechanisms of action and possible roles in human disease. *Curr Opin Lipidol.* 9, 433-440.

Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, et al. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell.* 56, 104-115.

Epis MR, Barker A, Giles KM, et al. (2011). The RNA-binding protein HuR opposes the repression of ERBB-2 gene expression by microRNA miR-331-3p in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 286, 41442-41454.

Esau C, Davis S, Murray SF, et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87-98.

Esser V, Limbird LE, Brown MS, et al. (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 263, 13282-13290.

F

Fan D, Yancey PG, Qiu S, et al. (2008). Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry.* 47, 1631-1639.

Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, et al. (2012). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis.* 220, 381-386.

Fisher C, Abdul-Aziz D, and Blacklow SC. (2004). A two-modulate region of the low-density lipoprotein receptor sufficient for formation of complexes with apolipoprotein E ligands. *Biochemistry.* 43, 1037-1044.

Fisher EA, Feig JE, Hewing B, et al. (2012). High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 2813-2820.

Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, et al. (2007). PCSK9-dependent LDL receptor regulation: effects of pH and LDL. *J Biol Chem.* 282, 20502-20512.

Ford MG, Valle JD, Soroka CJ, and Merchant JL. (1997). EGF receptor activation stimulates endogenous gastrin gene expression in canine G cells and human gastric cell cultures. *J Clin Invest.* 99, 2762-2771.

Forstermann U, Boissel JP, and Kleinert H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOSI and NOSIII). *FASEB J.* 12, 773-790.

Freeman SR, Jin X, Anzinger JJ, et al. (2014). ABCG1-mediated generation of extracellular cholesterol microdomains. *J Lipid Res.* 55, 115-127.

Frevel MA, Bakheet T, Silva AM, et al. (2003). p38 Mitogen activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol. Cell Biol.* 23, 425-436.

Frick MH, Elo O, Haapa K. et al. (1987). Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 317, 1237-1245.

Fukao A, Sasano Y, Imataka H, et al. (2009). The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly(A)- and eIF4A-dependent manner. *Mol Cell.* 36, 1007-1017.

G

Gaffney D, Reid JM, Cameron I, et al. (1995). Independent mutations at codon 3500 of the Apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15, 1025-1029.

Gagnon A, Ooi TC, Cousins M, et al. (2016). The anti-adipogenic effect of peripheral blood mononuclear cells is absent with PCSK9 loss-of-function variants. *Obesity (Silver Spring).* 24, 2384-2391.

Garcia CK, Wilund K, Arca M, et al. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science.* 292, 1394-1398.

Garcia-Martinez J, Aranda A, and Perez-Ortin JE. (2004). Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. *Mol Cell.* 15, 303-313.

Gherzi R, Lee KY, Briata P, et al. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell.* 14, 571-583.

Ghosh R, Likun W, and Wang ES. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell.* 158, 534-548.

Gibbons GF. (2002). From gallstones to genes: two hundred years of sterol research. *Jr. Lipids.* 37, 1153-1162.

Gillis P, and Malter JS. (1991). The adenosine-uridine binding factor recognizes the AU-rich elements of cytokine, lymphokine, and oncogene mRNA. *J Biol Chem.* 266, 3172-3177.

Gimbrone MA Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol.* 155, 1-5.

Giovannini MG, Cerbai F, Bellucci A, et al. (2008). Differential activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways in the hippocampus of CRND8 transgenic mouse, a model of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 153, 618-633.

- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, and Dreyfuss G. (2008).** RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582, 1977-1986.
- Gnyszka A, Jastrzębski Z, and Flis A. (2013).** DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Research.* 33, 2989-2996.
- Goldstein JL, and Brown MS. (2009).** History of Discovery: The LDL Receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 29, 431-438.
- Goldstein JL, and Brown MS. (1990).** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343, 425-430.
- Goldstein JL, and Brown MS. (1974).** Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 249, 5153-5162.
- Goldstein JL, and Brown MS. (1973).** Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 70, 2804-2808.
- Goldstein JL, Basu SK, Brunschede GY, and Brown MS. (1976).** Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell.* 7, 85-95.
- Goldstein JL, Hobbs HH, and Brown MS. (2001).** Familial hypercholesterolemia. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 2863-2913.
- Goto D, Okimoto T, Ono M, et al. (1997).** Upregulation of Low Density Lipoprotein Receptor by Gemfibrozil, a Hypolipidemic Agent in Human Hepatoma Cells Through Stabilization of mRNA Transcripts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 2707-2712.
- Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, et al. (1994).** Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature.* 370, 460-462.
- Gringhuis SI, Garcia-Vallejo JJ, van Het HB, and van Dijk W. (2005).** Convergent actions of I kappa B kinase beta and protein kinase C delta modulate mRNA stability through phosphorylation of 14-3-3 beta complexed with tristetraprolin. *Mol. Cell Biol.* 25, 6454-6463.
- Gros C, Fahy J, Halby L, et al. (2012).** DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochemistry.* 94, 2280-2296.

Grundy SM. (1998). Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation.* 97, 1436-1439.

Guhaniyogi J, and Brewer G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* 265, 11-23.

Guo D, Reinitz F, Youssef M, et al. (2011). An LXR agonist promotes GBM cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov.* 1, 442-456.

H

Haller H, Lindschau C, and Luft FC. (1994). Role of protein kinase C in intracellular signalling. *Ann. NY Acad. Sci.* 733, 313-324.

Hinman MN, Zhou HL, Sharma A, and Lou H. (2013). All three RNA recognition motifs and the hinge region of HuC play distinct roles in the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 41, 5049-5061.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420, 333-336.

Hobbs HH, Brown MS, and Goldstein JL. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1, 445-466.

Hobbs HH, Leitersdorf E, Goldstein JL, et al. (1988). Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia. Evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest.* 81, 909-917.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 97, 889-901.

Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, and Leedman PJ. (2002). mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res.* 27, 957-980.

Homma Y. (2004). Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 11, 265-270.

Hong C, Duit S, Jalonen P, et al. (2010). The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem.* 285, 19720-19726.

Horton JD, and Shimomura I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 10, 143-150.

Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, and Brown MS. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage activating protein (SCAP). *Cell.* 87, 415-426.

Hua X, Wu J, Goldstein JL, et al. (1995). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics.* 25, 667-673.

Hua X, Yokoyama C, Wu J, et al. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 90, 11603-11607.

Hudgins LC, Gordon BR, Parker TS, et al. (2002). LDL apheresis: an effective and safe treatment for refractory hypercholesterolemia. *Cardiovasc Drug Rev.* 20, 271-280.

Huwiler A, Akooel S, Aschrafi A, et al. (2003). ATP potentiates interleukin-1beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem.* 278, 51758-51769.

I

Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, et al. (1987). Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 84, 6919-6923.

J

Jacobson A, and Peltz SW. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 693-739.

Jacobsen A, Wen J, Marks DS, and Krogh A. (2010). Signatures of RNA binding proteins globally coupled to effective microRNA target sites. *Genome Res.* 20, 1010-1019.

Jairam V, Uchida K, and Narayanaswami V. (2012). Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. *Lipoteins- Role in Health and diseases. Chapter 16.* 384-406. <http://dx.doi.org/10.5772/50622>.

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 96, 266-271.

Javitt NB. (1990). HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* 4, 161-168.

Jeon H, and Blacklow SC. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 535-562.

Jiang H, Zhang J, Du Y, et al. (2015). Micro RNA-185 modulates low density lipoprotein receptor expression as a key posttranscriptional regulator. *Atherosclerosis.* 243, 523-532.

Jing Q, Huang S, Guth S, et al. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell.* 120, 623-634.

Jurevics H, and Morell P. (1995). Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *Neurochem. J.* 64, 895-901.

K

Kamps JAAM, and van Berkel TJC. (1993). Regulation of lowdensity- lipoprotein receptors in the human hepatoma cell line HepG2. *Eur. J. Biochem.* 213, 989-994.

Kartawijaya M, Han HW, Kim Y, and Lee SM. (2016). Genistein upregulates LDLR levels via JNK-mediated activation of SREBP-2. *Food & Nutrition Research.* 60, 31-120.

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, et al. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell. Biol.* 169, 871-884.

Kenan DJ, Query CC, and Keene JD. (1991). RNA recognition: Towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220.

Khokhlatchev A, Xu S, English J, et al. (1997). Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *J Biol Chem.* 272, 11057-11062.

Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, et al. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* 23, 1743-1748.

Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, et al. (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol. Cell Biol.* 15, 2582-2588.

- Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, and Hamilton TA. (1999).** Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol.* 162, 2457-2461.
- Kitai Y, Ariyama H, Kono N, et al. (2013).** Membrane lipid saturation activates IRE1a without inducing clustering Genes. *Cell.* 18, 798-809.
- Kloss S, Srivastava R, and Mulsch A. (2004).** Down-regulation of soluble guanylyl cyclase expression by cyclic AMP is mediated by mRNA-stabilizing protein HuR. *Mol Pharmacol.* 65, 1440-1451.
- Klotz U. (2003).** Pharmacological comparison of the statins. *Arzneimittelforschung.* 53, 605-611.
- Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, et al. (2000).** Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) apoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest.* 105, 451-458.
- Koivisto UM, Turtola H, Aalto-Setälä K, et al. (1992).** The familial hypercholesterolemia (FH)-North Karelia mutation of the low density lipoprotein receptor gene deletes seven nucleotides of exon 6 and is a common cause of FH in Finland. *J Clin Invest.* 90, 219-228.
- Kong WJ, Wei P, Abidi M, et al. (2004).** Berberine is a promising novel cholesterol lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat. Med.* 10, 1344-1352.
- Kotze MJ, Langenhoven E, Warnich L, et al. (1991).** The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolaemia in South African Afrikaners. *Ann Hum Genet.* 55, 115-121.
- Krishnamurthy P, Lambers E, Verma S, et al. (2010).** Myocardial knockdown of mRNA-stabilizing protein HuR attenuates post-MI inflammatory response and left ventricular dysfunction in IL-10-nullmice. *FASEB J.* 24, 2484-2494.
- Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, and Singh K. (2007).** Beta1 integrins modulate beta-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling. *Hypertension.* 49, 865-872.

Kumar A, Chambers TC, Cloud-Heflin BA, and Mehta KD. (1997). Phorbol ester-induced low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 cells involves protein kinase C-mediated p42/44 MAP kinase activation. *J Lipid Res.* 38, 2240-2248.

Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, et al. (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 1820-1825.

Kyriakis JM, App H, Zhang XF, et al. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature.* 358, 417-421.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 369, 156-160.

Kysenius K, Muggalla P, Matlik K, et al. (2012). PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1903-1916.

L

Labonté P, Begley S, Guévin C, et al. (2009). PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 1, 17-24.

Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. (2006). Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest.* 116, 2995-3005.

Lagnado CA, Brown CY, and Goodall GJ. (1994). AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell Biol.* 14, 7984-7995.

Langer T, Strober W, Levy RI. (1972). The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest.* 51, 1528-1536.

Laroia G, Cuesta R, Brewer G, and Schneider RJ. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitinproteasome pathway. *Science.* 284, 499-502.

Larrede S, Quinn CM, Jessup W, et al. (2009). Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1930-1936.

Lauth M, Cattaruzza M, and Hecker M. (2001). ACE inhibitor and AT1 antagonist blockade of deformation-induced gene expression in the rabbit jugular vein through B2 receptor activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21, 61-66.

- Lee PT, Liao PC, Chang WC, et al. (2007).** Epidermal Growth Factor Increases the Interaction between Nucleolin and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K/Poly(C) Binding Protein 1 Complex to Regulate the Gastrin mRNA Turnover. *Mol. Biol Cell.* 18, 5004-5013.
- Lee S, Lim HJ, Park JH, et al. (2007).** Berberine-induced LDLR up-regulation involves JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 362, 853-857.
- Lee T, Wang N, Houel S, et al. (2015).** Dosage and temporal thresholds in microRNA proteomics. *Mol. Cell Proteom.* 14, 289-302.
- Leffers H, Dejgaard K, and Celis JE. (1995).** Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains. *Eur J Biochem.* 230, 447-453.
- Lehrman MA, Goldstein JL, Brown MS, et al. (1985).** Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell.* 41, 735-743.
- Lehrman MA, Russell DW, Goldstein JL, and Brown MS. (1987).** Alu-Alu recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 262, 3354-3361.
- Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, and Hobbs HH. (1990).** Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest.* 85, 1014-1023.
- LeMay C, Kourimate S, Langhi C, et al. (2009).** Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 5, 684-690.
- Lemmon MA, and Schlessinger J. (2010).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 141, 1117-1134.
- Leone G, Voso MT, Teofili L, and Lübbert M. (2003).** Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. *Clin Immunol.* 109, 89-102.
- Levy AP, Levy NS, and Goldberg MA. (1996).** Posttranscriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem.* 271, 2746-2753.

- Levy E, Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, et al. (2013).** PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 227, 297-306.
- Libby P, Ridker PM, and Hansson GK. (2011).** Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 473, 317-325.
- Libby P. (1999).** Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 247, 349-358.
- Li C, Kraemer FB, Ahlborn TE, and Liu J. (1999).** Induction of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Transcription by Oncostatin M Is Mediated by the Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling Pathway and the Repeat 3 Element of the LDLR Promoter. *J Biol Chem*. 274, 6747-6753.
- Li H, Chen W, Zhou Y, et al. (2009).** Identification of mRNA binding proteins that regulate the stability of LDL receptor mRNA through AU-rich elements. *J Lipid Res*. 50, 820-831.
- Li H, Dong B, Park SW, et al. (2009).** Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem*. 284, 28885-28895.
- Lin FY, Chen YH, Lin YW, et al. (2006).** The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26, 2622-2629.
- Linker K, Pautz A, Fechir M, et al. (2005).** Involvement of KSRP in the posttranscriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res*. 33, 4813-4827.
- Lin YD, Chen S, Yue P, et al. (2008).** CAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Protein-Dependent Death Receptor 5 Induction Is a Major Component of SHetA2-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells. *Cancer Res*. 68, 5335-5344.
- Li S, and Li JJ. (2015).** PCSK9: a key factor modulating atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 22. 221-230.
- Loflin P, Chen CY, and Shyu AB. (1999).** Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev*. 13, 1884-1897.

Lunde BM, Moore C, and Varani G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 479-490.

Lusis AJ. (2000). Atherosclerosis. *Nature.* 407, 233-241.

Lyudmila G, Vladimirova K, and Spas Ivanov K. (2015). Resistance of Statin Therapy, and Methods for its Influence. *Medicine. Hypercholesterolemia.* Chapter 10. 185-202.

M

Mahtani KR, Brook M, Dean JL, et al. (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* 21, 6461-6469.

Majesky MW. (2016). Vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36, 82-86.

Manes TD, and Pober JS. (2016). Significant differences in antigen-induced transendothelial migration of human CD8 and CD4 T effector memory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36, 1910-1918.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298, 1912-1934.

Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, and Hrstka R. (2012). The role of the 3' untranslated region in posttranscriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology.* 9, 563-576.

Mavropoulos A, Sully G, Cope AP, and Clark AR. (2005). Stabilization of IFN-gamma mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood.* 105, 282-288.

Maxwell KN, Fisher EA, and Breslow JL. (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 2069-2074.

McClatchey AI, and Fehon RG. (2009). Merlin and the ERM proteins—regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol.* 19, 198-206.

Meng C, Liu G, Mu H, et al. (2015). Amphiregulin may be a new biomarker of classically activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 466, 393-399.

Meyer S, Temme C, and Wahle E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 39, 197-216.

Miles B. (2003). Review of lipoproteins.

<https://www.tamu.edu/faculty/bmiles/lectures/Lipid%20Transport.pdf>

Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, et al. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood.* 119, 5772-5781.

Ming XF, Kaiser M, and Moroni C. (1998). c- jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J.* 17, 6039-6048.

Min H, Turck CW, Nikolic JM, and Black DL. (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev.* 11, 1023-1036.

Misquitta CM, Iyer VR, Werstiuk ES, and Grover AK. (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem.* 224, 53-67.

Mobarak CD, Anderson KD, Morin M, et al. (2000). The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 3191-3203.

Moghadasian MH. (2002). A safety look at currently available statins. *Expert Opin Drug Saf.* 1, 269-274.

Moore MJ. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science.* 309, 1514-1518.

Motamed M, Zhang Y, Wang ML, et al. (2011). Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol sensor that maintains cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 286, 18002-18012.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. (2015). Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 131, 29-39.

Mozaffarian EJ, Benjamin AS, Go DK, et al. (2016). Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 133, 338-360.

Müller C. (1938). Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand.* 89, 75-84.

Muslin AJ. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)*. 115, 203-218.

N

Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, et al. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev*. 12, 3020-3031.

Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, et al. (2002). Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem*. 277, 37229-37234.

Nakajima K, Nakajima Y, Takeichi S, and Fujita MQ. (2008). Plasma remnant-like lipoprotein particles or LDL-C as major pathologic factors in sudden cardiac death cases. *Atherosclerosis*. 198, 237-246.

Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, et al. (2003). Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys*. 420, 55-67.

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, et al. (2000). Identification of *HE1* as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*. 290, 2298-2301.

Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. (1995). Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15, 678-682.

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, and Smith TF. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 371, 297-300.

Nes WD. (2011). Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem. Rev*. 111, 6423-6451.

Nes WR, and McKean ML. (1977). Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids. *University Park Press: Baltimore, MD*. p 1.

Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, et al. (2004). Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 109, 42-46.

Nohturfft A, Brown MS, and Goldstein JL. (1998a). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem.* 273, 17243-17250.

Nohturfft A, Brown MS, and Goldstein JL. (1998b). Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12848-12853.

Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, et al. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell.* 102, 315-323.

Norman D, Sun XM, Bourbon M, et al. (1999). Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 104, 619-628.

O

O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 376, 112-123.

Okano HJ, and Darnell RB. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J. Neurosci.* 17, 3024-3037.

Olsson PA, Korhonen L, Mercer EA, and Lindholm D. (1999). MIR is a novel ERM-like protein that interacts with myosin regulatory light chain and inhibits neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 274, 36288-36292.

P

Pages G, Berra E, Milanini J, et al. (2000). Stress activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem.* 275, 26484-26491.

Pai J, Guryev O, Brown MS, et al. (1998). Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 273, 26138-26148.

Papandreou I, Denko NC, Olson M, et al. (2011). Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood.* 117, 1311-1314.

- Park JW, Jang MA, Lee YH, et al. (2001).** p53- independent elevation of p21 expression by PMA results from PKCmediated mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 280, 244-248.
- Park SW, Moon YA, and Horton JD. (2004).** Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem.* 279, 50630-50638.
- Parveen Abidi, Wei Chen, Fredric B, et al. (2006).** The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new action mechanisms. *J Lipid Res.* 47, 2134-2147.
- Pascale A, Amadio M, Scapagnini G, et al. (2005).** Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC alpha dependent pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102, 12065-12070.
- Paukku K, Backlund M, DeBoer RA, et al. (2012).** Regulation of AT1 Rexpression through HuR by insulin. *Nucleic Acids Res.* 40, 5250-5261.
- Peng Jiang P, and Coller H. (2012).** Functional Interactions Between microRNAs and RNA Binding Proteins. *Microrna.* 1, 70-79.
- Peng SSY, Chen CYA, Xu N, and Shyu AB. (1998).** RNA stabilization of the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* 17, 3461-3470.
- Perrone-Bizzozero NI, Cansino VV, and Kohn DT. (1993).** Posttranscriptional regulation of GAP-43 gene expression in PC12 cells through protein kinase C-dependent stabilization of the mRNA. *J. Cell Biol.* 120, 1263-1270.
- Pike LJ. (2004).** Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *J. Biochem.* 378, 281-292.
- Platt FM, Wassif C, Colaco A, et al. (2014).** Disorders of Cholesterol Metabolism and Their Unanticipated Convergent Mechanisms of Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 173-194.
- Plechanovová A, Jaffray EG, McMahon SA, et al. (2011).** Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1052-1059.
- Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. (2008).** The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem.* 4, 2363-2372.

Poirier S, Mayer G, Poupon V, et al. (2009). Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem.* 42, 28856-28864.

Poirier S, Samami S, Mamarbachi M, et al. (2014). The epigenetic drug 5-Azacytidine interferes with cholesterol and lipid metabolism. *J Biol Chem.* 289, 18736–18751.

Polacek C, Friebe P, and Harris E. (2009). Poly (A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J. Gen Virol.* 90, 687-692.

Popjak G. (1986). In *Lipids: Chemistry, Biochemistry and Nutrition*; Mead JF, Alfin-Slater RB, Howton DR., Popjak G. Eds; Plenum Press: New York. p 295.

Popova VV, Kurshakova MM, and Kopytova DV. (2015). Methods to study the RNA-protein interactions. *Mol Biol (Mosk).* 49, 472-481.

Porter FD, and Herman GE. (2011). Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res.* 52, 6-34.

Prendergast GC, and Ziff EB. (1991). Methylation-sensitive sequence specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science.* 251, 186-189.

Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, and Sampietro T. (2012). Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 12, 303-311.

Q

Qin YJY, Pang WH, Chen Z, et al. (2006). Synthesis, DNA-binding affinities, and binding mode of berberine dimers. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 25-32.

R

Rader D. (2001). A new feature on the cholesterol-lowering landscape. *Nat. Med.* 7, 1282-1284.

Rader DJ, Cohen J, and Hobbs HH. (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 111, 1795-1803.

Radhakrishnan A, Sun L-P, Kwon HJ, et al. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell.* 15, 259-268.

- Raineri I, Wegmueller D, Gross B, et al. (2004).** Roles of AUF1 isoforms, HuR, and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32, 1279-1288.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, et al. (2008).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36, D320-D325.
- Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, et al. (1997).** Complementation cloning of *S2P*, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell.* 1, 47-57.
- Reglero-Real N, Colom B, Bodkin JV, et al. (2016).** Endothelial cell junctional adhesion molecules: role and regulation of expression in inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36, 2048-2057.
- Reik W. (2007).** Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 447, 425-432.
- Reiner Z. (2014).** Resistance and intolerance to statins. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 24, 1057-1066.
- Reinoso RF, Navarro S, Garcia MJ, and Prous JR. (2001).** Pharmacokinetic interactions of statins. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 23, 541-566.
- Remaley AT, Rust S, Rosier M, et al. (1999).** Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 12685-12690.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al. (2000).** Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 289, 1524-1529.
- Ridley SH, Dean JL, Sarsfield SJ, et al. (1998).** A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *FEBS Lett.* 439, 75-80.
- Roberts PJ, and Der CJ. (2007).** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 26, 3291-3310.
- Ron D, and Hubbard HR. (2008).** How IRE1 Reacts to ER Stress. *Cell.* 132, 24-26.
- Roskoski JRR. (2014).** The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Res.* 79, 34-74.
- Ross J. (1995).** mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* 59, 423-450.

Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, et al. (2011). Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 785-791.

Russell DW. (2009). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res.* 50, 120-125.

Rye KA, Bursill CA, Lambert G, et al. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 50, 195-200.

S

Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, et al. (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem.* 272, 20213-20221.

Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL, and Brown MS. (1998). 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.

Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, et al. (1998b). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell.* 2, 505-514.

Santi DV, Norment A, and Garrett CE. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 81, 6993-6997.

Sarkar B, Xi Q, He C, and Schneider RJ. (2003). Selective degradation of AU-rich mRNA promoted by the p37 AUF-1 protein isoform. *Mol. Cell Biol.* 23, 6685-6693.

Sasai N, and Defossez PA. (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol.* 53, 323-334.

Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, et al. (2005). Trapped in action: Direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods.* 2, 751-756.

Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, et al. (2000). Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97, 7458-7463.

- Schlüter KD, Weber M, Schreckenber R, and Schulz R. (2016).** ox-LDL and Angiotensin: Cooperative effects via induction of PCSK9 in cardiomyocytes. *Clin Res Cardiol Suppl.* 105.
- Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, and Brown MS. (1982).** Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J Biol Chem.* 257, 2664-2673.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, et al. (2008).** The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol.* 40, 1111-1125.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. (2003).** The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100, 928-933.
- Shaw G, and Kamen R. (1986).** A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 46, 659-667.
- Shimomura I, Shimano H, Korn BS, et al. (1998).** Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* 273, 35299-35306.
- Smith DW, Lemli L, and Opitz JM. (1964).** A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J. Pediatr.* 64, 210-217.
- Smithies O, and Maeda N. (1995).** Gene targeting approaches to complex diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92, 5266-5272.
- Smith JR, Osborne TF, Brown MS, et al. (1988).** Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *J Biol Chem.* 263, 18480-18487.
- Simon P, Schott K, Williams RW, and Schaeffel F. (2004).** Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 20, 3371-3377.
- Soria LF, Luewig EH, Clarke HR, et al. (1989).** Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apoipoprotein B-100. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 86, 587-591.

- Sorkin A, Di Fiore PP, and Carpenter G. (1993).** The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired, *Oncogene*. 8, 3021-3028.
- Spady DK. (1992).** Hepatic clearance of plasma low density lipoproteins. *Semin Liver Dis*. 12, 373-385.
- Srikantan S, Abdelmohsen K, Lee EK, et al. (2011).** Translational control of TOP2A influences doxorubicin efficacy. *Mol. Cell Biol*. 31, 3790-3801.
- Srivastava RK, Sollott SJ, Khan L, et al. (1999).** Bcl-2 and Bcl-XL Block Thapsigargin-Induced Nitric Oxide Generation, c-Jun NH2-Terminal Kinase Activity, and Apoptosis. *Mol. Cell Biol*. 19, 5659-5674.
- Stancu C, and Sima A. (2001).** Statins: mechanism of action and effects. *J. Cell. Mol. Med*. 5, 378-387.
- Statistics Canada. (2014).** CANSIM Table 102-0529, Deaths, by Cause, Chapter IX: Diseases of the Circulatory System (100 to 199), Age Group and Sex, Canada Annual (Number).
- Stoscheck CM, and Carpenter G. (1984).** “Down-regulation” of EGF receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol*. 98, 1048-1053.
- Strickland DK, Gonias SL, and Argraves WS. (2002).** Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol. Metab*. 13, 66-74.
- Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, and Russell DW. (1985).** The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 228, 815-822.
- Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, et al. (2008).** Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 105, 4162-4167.
- Sun L-P, Seemann J, Brown MS, and Goldstein JL. (2007).** Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 104, 6519-6526.
- Suswam EA, Nabors LB, Huang Y, et al. (2005).** IL-1 beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3' untranslated region: involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR. *Int J Cancer*. 113, 911-919.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 386, 292-296.

T

Tavori H, Fan D, Blakemore JL, et al. (2013). Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. *Circulation*. 127, 2403-2413.

Taylor GA, Thompson MJ, Lai WS, and Blackshear PJ. (1995). Phosphorylation of tristetraprolin, a potential zinc finger transcription factor, by mitogen stimulation in intact cells and by mitogen-activated protein kinase *in vitro*. *J Biol Chem*. 270, 13341-13347.

Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. (2005). Spanish Familial Hypercholesterolemia Group. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 51, 1137-1144.

Tejpar S, Peeters M, Humblet Y, et al. (2008). Relationship of efficacy with *KRAS* status (wild type versus mutant) in patients with irinotecanrefractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J Clin Oncol*. 26, 178s.

The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. (2000). Myocardial infarction redefined—a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 36, 959-969.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002). *Circulation*. 106, 3143-3421.

Thompson DM, and Gill GN. (1985). The EGF receptor: structure, regulation, and potential role in malignancy. *Cancer Surv*. 4, 767-788.

Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, et al. (2005). Targeted inactivation of hepatic *Abca1* causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest*. 115, 1333-1342.

Tirasophon W, Lee K, Callaghan K, et al. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 14, 2725-2736.

U

Urano F, Wang XZ, and Bertolotti A, et al. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science.* 287, 664-666.

Uren PJ, Burns SC, Ruan J, et al. (2011). Genomic Analyses of the RNA-binding Protein Hu Antigen R (HuR) Identify a Complex Network of Target Genes and Novel Characteristics of Its Binding Sites. *J Biol Chem.* 286, 37063-37066.

V

Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 117, 746-756.

Vance D, and Vance JE. (2008). Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 5th ed. Amsterdam. Elsevier.

Vanhoutte PM. (1996). Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1. 14, S83-93.

Vanier MT. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 16.

Vargas NB, Brewer BY, Rogers TB, and Wilson GM. (2009). Protein kinase C activation stabilizes LDL receptor mRNA via the JNK pathway in HepG2 cells. *J Lipid Res.* 50, 386-397.

Vaughan CJ, Gotto AM, and Basson CT. (2000). The evolving role of statins in the management of atherosclerosis, *J Am Coll Cardiol.* 35, 1-10.

Vega GL, and Grundy SM. (1986). *In vivo* evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 78, 1410-1414.

Volmer R, van der Ploeg K, and Ron D. (2013). Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 110, 4628-4633.

W

Wang W, Caldwell MC, Lin S, et al. (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J.* 19, 2340-2350.

Wang W, Fan J, Yang X, et al. (2002). AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol. Cell Biol.* 22, 3425-3436.

Wang X, Briggs MR, Hua X, et al. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of LDL receptor promoter: II. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 268, 14497-14504.

Wang X, Sato R, Brown MS, et al. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* 77, 53-62.

Wassif CA, Brownson KE, Sterner AL, et al. (2007). HEM dysplasia and ichthyosis are likely laminopathies and not due to 3 β -hydroxysterol Δ 14-reductase deficiency. *Hum Mol Genet.* 16, 1176-1187.

Watson AD, Leitinger N, Navab M, et al. (1997). Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo*. *J Biol Chem.* 272, 13597-13607.

Watson CJ, Phelan D, Xu M, et al. (2012). Mechanical stretchup-regulates the B-type natriuretic peptide system in human cardiac fibroblasts: a possible defense against transforming growth factor-beta mediated fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 5, 1-9.

Watson KE, Boström K, Ravindranath R, et al. (1994). TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 93, 2106-2113.

Wells A, Welsh JB, Lazar CS, et al. (1990). Rosenfeld, Ligand-induced transformation by a non-internalizing epidermal growth factor receptor, *Science.* 247, 962-964.

Whitmarsh AJ, and Davis RJ. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci.* 23, 481-485.

Wickens M, Anderson P, and Jackson RJ. (1997). Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 220-232.

Wilusz CJ, and Wilusz J. (2004). Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet.* 20, 491-497.

Wilusz CJ, Wormington M, and Peltz SW. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 237-246.

Wilson GM, Lu J, Sutphen K, et al. (2003). Regulation of A+U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF-1. *J Biol Chem.* 278, 33029-33038.

Wilson GM, Roberts EA, and Deeley RG. (1997). Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J Lipid Res.* 38, 437-446.

Wilson GM, Vasa MZ, and Deeley RG. (1998). Stabilization and cytoskeletal-association of LDL receptor mRNA are mediated by distinct domains in its 3' untranslated region. *J Lipid Res.* 39, 1025-1032.

Wilson T, and Treisman R. (1988). Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature.* 336, 396-399.

Winzen R, Kracht M, Ritter B, et al. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18, 4969-4980.

Woodhoo A, Iruarrizaga-Lejarreta M, Beraza N, et al. (2012). Human antigen R contributes to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Hepatology.* 56, 1870-1882.

X

Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, et al. (2002). Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Caspase-12 Activation. *Hepatology.* 36, 592-601.

Xie Y, Fan Y, and Xu Q. (2016). Vascular regeneration by stem/progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36, 33-40.

Xu F, Zhang X, Lei Y, et al. (2010). Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J. Cell Biochem.* 111, 727-734.

Xu K, Robida AM, and Murphy TJ. (2000). Immediate-early MEK-1-dependent Stabilization of Rat Smooth Muscle Cell Cyclooxygenase-2 mRNA by G α_q -coupled Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 275, 23012-23019.

Y

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, et al. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequence in its mRNA. *Cell*. 39, 27-38.

Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, et al. (2002). Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J Biol Chem*. 277, 41539-41546.

Yang M, Liu W, Pellicane C, et al. (2014). Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake. *J Lipid. Res*. 55, 226-238.

Yang T, Goldstein JL, and Brown MS. (2000). Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP/SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 275, 29881-29886.

Yang X, Wang W, Fan J, et al. (2004). Prostaglandin A2-mediated stabilization of p21 mRNA through an ERK dependent pathway requiring the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 279, 49298-49306.

Yashiro T, Nanmoku M, Shimizu M, et al. (2013). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside stabilizes low density lipoprotein receptor mRNA in hepatocytes via ERK-dependent HuR binding to an AU-rich element. *Atherosclerosis*. 226, 95-101.

Yashiro T, Yokoi Y, Shimizu M, et al. (2011). Chenodeoxycholic acid stabilization of LDL receptor mRNA depends on 30-untranslated region and AU-rich element-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 409, 155-159.

Yeap BB, Voon DC, Vivian JP, et al. (2002). Novel binding of HuR and poly(C)-binding protein to a conserved UC-rich motif within the 3'-untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem*. 277, 27183-27192.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, et al. (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 75, 187-197.

Yoo S, Kim HH, Kim P, et al. (2013). A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element. *Neurochem. J*. 126, 792-804.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, et al. (1998). Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. *J Biol Chem.* 273, 33741-33749.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., et al. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell.* 107, 881-891.

Young LE, Moore AE, Sokol L, et al. (2012). The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Mol. Cancer Res.* 10, 167-180.

Z

Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, and Tontonoz P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* 325, 100-104.

Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. (2007). Binding of PCSK9 to EGF-A repeat of LDL receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 282, 18602-18612.

Zhang L, Reue K, Fong LG, et al. (2012). Feedback Regulation of Cholesterol Uptake by the LXR-IDOL-LDLR Axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 2541-2546.

Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, et al. (2005). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J Clin Invest.* 115, 2870-2874.

Zuliani G, Arca M, Signore A, et al. (1999). Characterization of a New Form of Inherited Hypercholesterolemia Familial Recessive Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 802-809.

Zwang Y, and Yarden Y. (2009). Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic.* 10, 349-363.

<http://www.effi-science.com/lipamine-cholesterol/cholesterol?catid=67>

https://www.researchgate.net/figure/11466788_fig2_Figure-1-The-generic-structure-of-a-eukaryotic-mRNA-illustrating-some

<https://pace-cme.org/2012/10/08/novel-therapies-for-the-prevention-of-atherosclerotic-vascular-disease/>

ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

ANNEXE 1

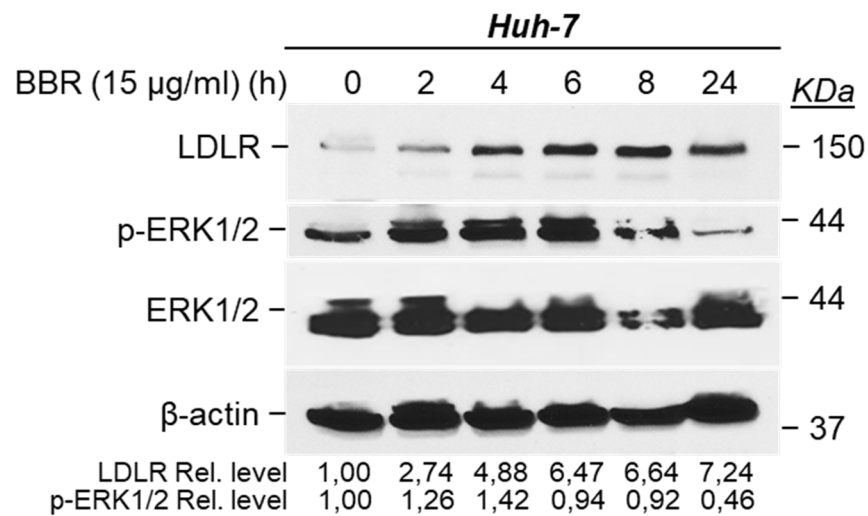


Figure 29: Effet de la berberine (BBR) sur l'expression du récepteur LDL et l'activation de la voie ERK1/2 dans les cellules Huh7. Les cellules ont été incubées dans le milieu de culture seul ou en présence de 15 µg/ml de BBR pendant 0, 2, 4, 6, 8 et 24h. Les protéines totales ont été extraites et révélées par immuno-buvardage en utilisant des anticorps spécifiques. Le signal a été normalisé en utilisant la β-actin.

ANNEXE 2

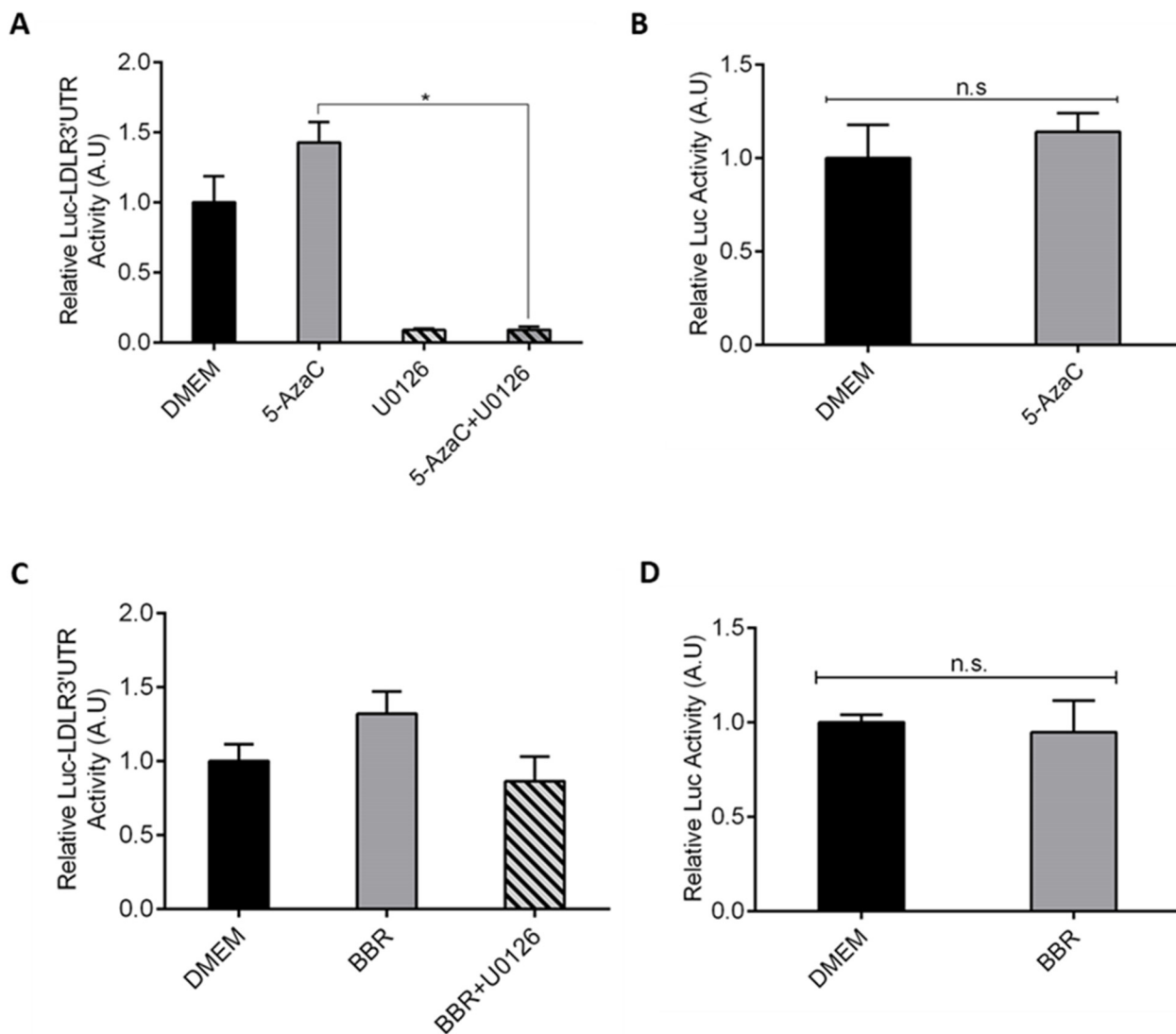
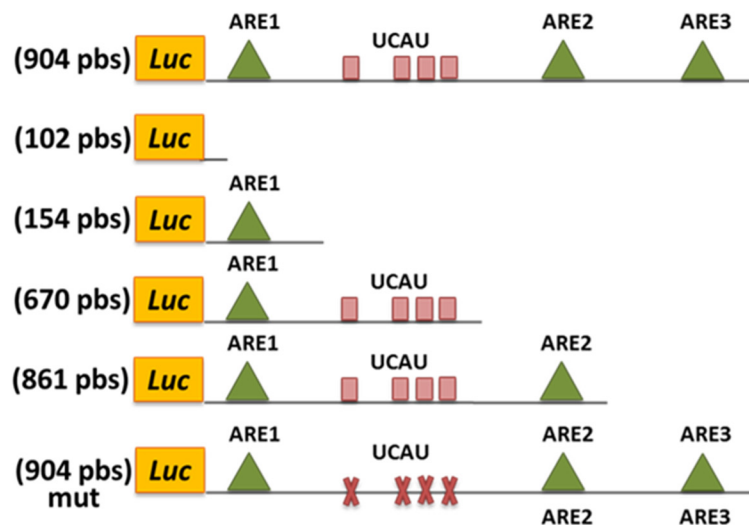


Figure 30: La séquence 3'UTR de l'ARNm du récepteur LDL est nécessaire pour sa stabilisation dans les cellules HepG2 en présence de **A-B)** la 5-AzaC ou de **C-D)** la BBR. Les cellules HepG2 ont été transfectées avec le plasmide pCMV-GLuc (Contrôle) ou avec le plasmide pCMV-GLuc-hLDLR-3'UTR pendant 24h ensuite elles ont été traitées dans le milieu de culture DMEM seul (Contrôle) ou en présence de 10 μ M d'5-AzaC ou de 15 μ g/ml de BBR pendant 24h. L'activité relative de la luciférase a été mesurée et normalisée par rapport à la quantité totale de protéines.

ANNEXE 3

A



B

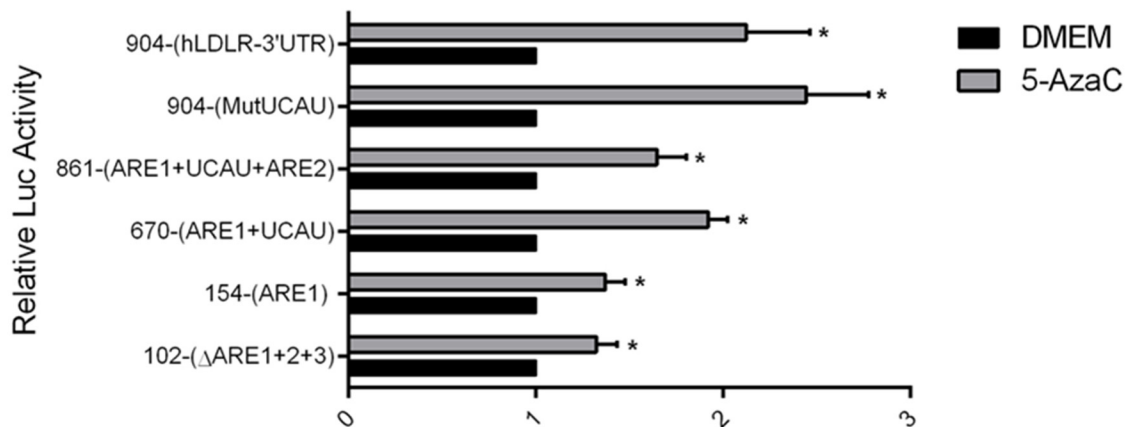


Figure 31: La longueur de la séquence 3'UTR est importante pour avoir un effet stabilisateur de la 5-AzaC sur l'expression de l'ARNm du récepteur LDL. **A)** Représentation schématique de la séquence totale ou portant des délétions de pCMV-hLDLR-3'UTR. Les cellules Huh7 ont été transfectées avec la séquence complète du 3'UTR ou avec la même séquence mais portant différentes délétions des motifs constituant le 3'UTR pendant 24h. Ensuite elles ont été incubées dans le milieu DMEM seul (Contrôle) ou en présence de 10 μ M d'5-AzaC pendant 24h. L'activité relative de la luciférase a été mesurée et normalisée par rapport à la quantité totale de protéines. Barre d'erreur, SEM. (n=3, analysées en duplicata). *, $p < 0.05$.

ANNEXE 4

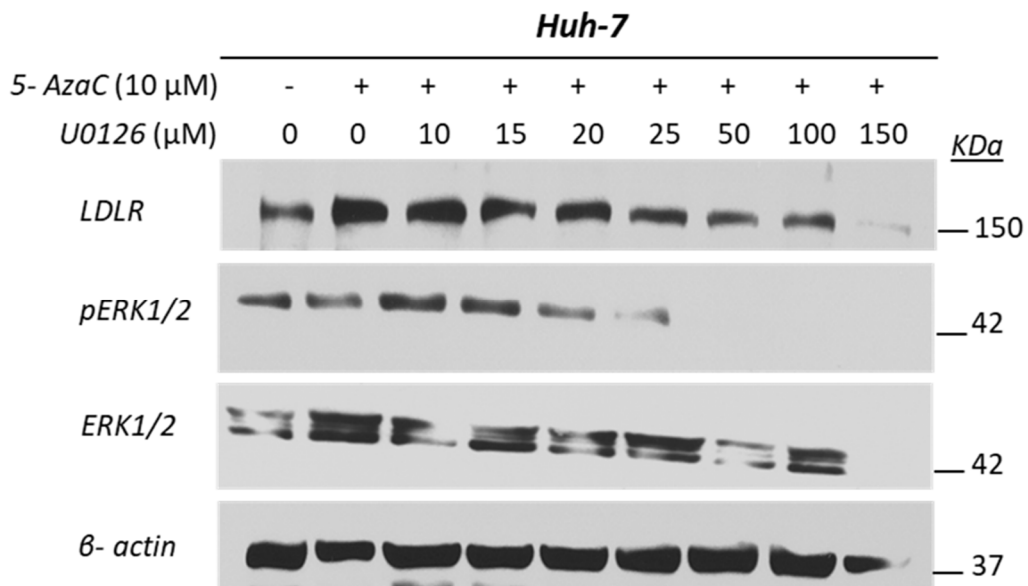


Figure 28: Effet de la concentration de l'inhibiteur spécifique des MEK1/2 (U0126) sur la stabilisation du récepteur LDL et l'activation de la voie ERK1/2 dans les cellules Huh7. Les cellules ont été pré-incubées dans le milieu de culture DMEM seul (Contrôle) ou en présence des concentrations croissantes de l'inhibiteur U0126 pendant 2h ensuite, elles ont été traitées sans ou avec 10 μ M d'5-AzaC pendant 24h. Les protéines totales ont été extraites et révélées par immuno-buvardage en utilisant des anticorps spécifiques. Le signal a été normalisé en utilisant la β -actin.

ANNEXE 5

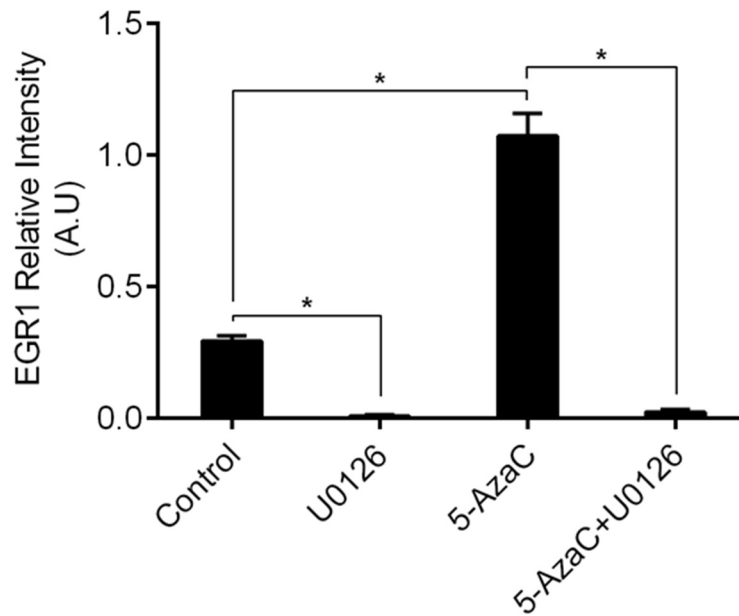


Figure 34: Stabilisation de l'ARNm du gène « immediate-early gene » (EGR1) par la 5-AzaC dans les cellules Huh7. Les cellules ont été incubées dans le milieu de culture seul ou en présence de 10 μ M d'5-AzaC pendant 6h. La quantité relative d'ARNm a été analysée par RT-qPCR.

ANNEXE 6

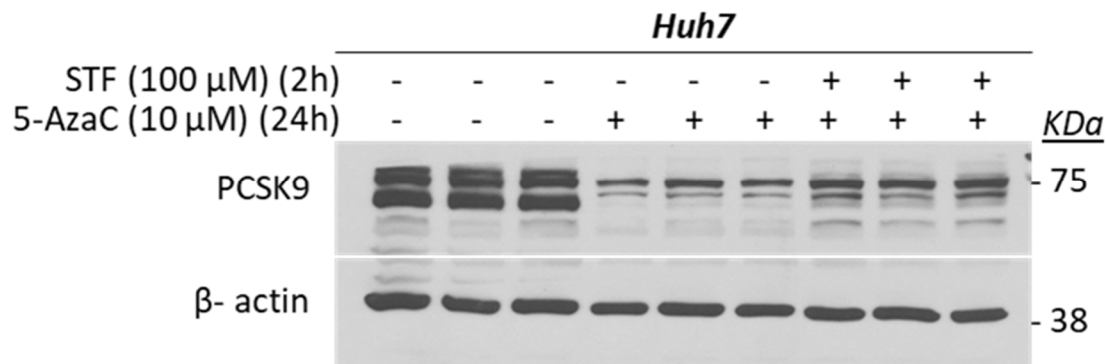


Figure 33: Rôle du domaine RNase de IRE1 α dans le contrôle de la régulation de l'expression de PCSK9 par la 5-AzaC. Les cellules Huh7 ont été pré-incubées dans le milieu de culture seul ou en présence de 100 μ M de l'inhibiteur spécifique du domaine RNase de IRE1 α , le STF-083010 pendant 2h ensuite elles ont été traitées en présence de 10 μ M d'5-AzaC pendant 24h. Les protéines totales ont été extraites et révélées par immuno-buvardage en utilisant des anticorps spécifiques. Le signal a été normalisé en utilisant la β -actin.

ANNEXE 7

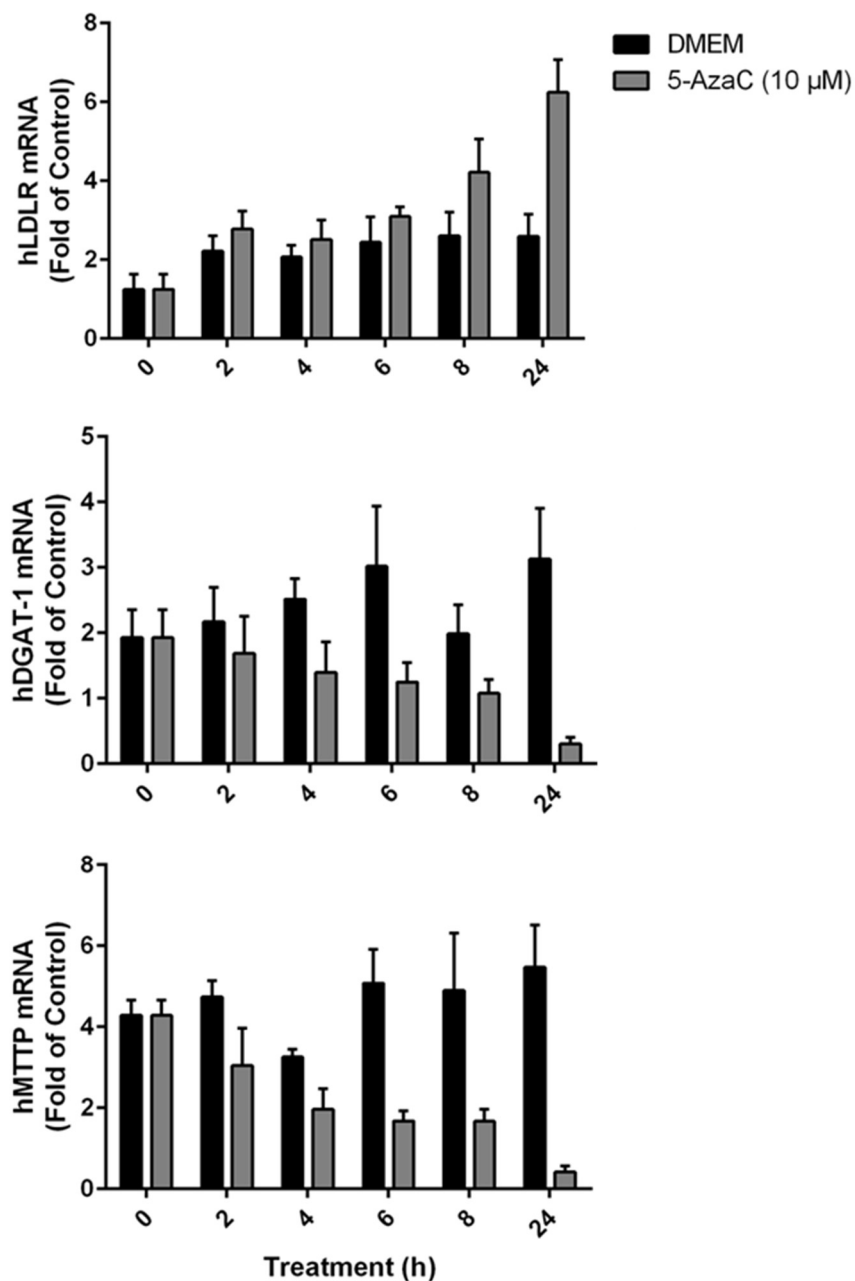


Figure 32: Effet de la 5-AzaC sur l'expression de hLDLR, hDGAT et hMTTP, des gènes impliqués dans l'homéostasie ou le transfert de cholestérol, dans les cellules HepG2 pendant 0, 2, 4, 6, 8 et 24h de traitement. Les cellules ont été incubées dans le milieu DMEM seul (Contrôle) ou en présence de 10 µM d'5-AzaC pendant 24h. La quantité relative d'ARNm a été analysée par RT-qPCR.

Nourhen Mnasri

Laboratoire de Biologie Cellulaire
et Moléculaire, Athérosclérose et
Biologie Cardiovasculaire - ICM
Dr. Gaétan Mayer
T : 514 376-3330,
Poste : 2664

ÉDUCATION

2014-2017 Ph.D. en Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine, Université de Montréal.

Sous la direction du Dr. Gaétan Mayer, Institut de Cardiologie de Montréal (ICM).

Thèse: Le médicament épigénétique 5-Azacytidine stabilise l'ARN messenger du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) via une voie IER1 α -EGFR-ERK1/2 dépendante.

2010-2012 Mastère en Microbiologie Générale

Faculté des Sciences Tunis El Manar (FST), Université de Tunis.

Sous la direction du Pr. Abdellatif Boudabous et Dr. Naceur Djébali, Centre de Biotechnologies de Borj Cedria (CBBC).

Mémoire: Bio-amorçage et amélioration de la résistance du blé dur via des bactéries de la rhizosphère.

2006-2010 Maîtrise en Biotechnologies Médicales

Institut Supérieur de Biotechnologies de Monastir (ISBM), Université de Monastir.

Sous la direction du Pr. Hassen Bacha et Dr. Imen Ayed-Boussema, Centre de recherche de la Faculté de Pharmacie de Monastir (LRSBC).

Mémoire: Effets génotoxique et cytotoxique du diméthoate au niveau du foie et des reins des souris balb/c.

2002-2006 Baccalauréat en Sciences Expérimentales

Gafsa-Magnet School, Lycée Pilote de Gafsa (LPG).

Diplôme: Baccalauréat

PUBLICATIONS

- 1) **Mnasri N, Mamarbachi M, Allen BG and Mayer G. (2017).** 5-Azacytidine Engages an IRE1 α -EGFR-ERK1/2 Signalling Pathway that Stabilizes the LDL Receptor mRNA. *BBA Gene Regulatory Mechanisms*. 1861 (2018) 29–40.
- 2) **Mnasri N, Elkahoui S, Chenenaoui S, Hessini K, Gargouri S and Djebali N. (2017).** Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria *in vitro* and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. *Eur J Plant Pathol*. 147: 501-515.
- 3) **Ayed-Boussema I, Rjiba K, Mnasri N, Moussa A and Bacha H. (2012).** Genotoxicity Evaluation of Dimethoate to Experimental Mice by Micronucleus, Chromosome Aberration Tests, and Comet Assay. *International Journal of Toxicology*. 31: 78-85.
- 4) **Ayed-Boussema I, Rjiba K, Moussa A, Mnasri N and Bacha H. (2012).** Genotoxicity associated with oxidative damage in the liver and kidney of mice exposed to dimethoate subchronic intoxication. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-011-0588-z.

COMMUNICATIONS ORALES

- 1) **Mnasri N, Mamarbachi M, Allen BG and Mayer G. (2017).** IRE1 α -EGFR-ERK1/2, A Novel Signaling Pathway Inducing Stabilization of Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor mRNA via 5-Azacytidine. *Discovery and Validation of Therapeutic Targets Research Day, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal*. 21-02-2017.
- 2) **Mnasri N, Mamarbachi M, Allen BG and Mayer G. (2016).** IRE1 α -EGFR-ERK1/2, A Novel Signaling Pathway Inducing Stabilization of Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor mRNA via 5-Azacytidine. *Journée de la Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal*. 04-06-2016.
- 3) **Mnasri N and Djébal N. (2012).** Bio-amorçage et amélioration de la résistance du blé dur via des bactéries de la rhizosphère. *Faculté des Sciences de Tunis El Manr, Tunisie*. 23-09-2012.

- 4) **Mnasri N, Ayed-Boussema I and Bacha H. (2010).** Effets génotoxique et cytotoxique du diméthoate au niveau du foie et des reins des souris balb/c. *Institut Supérieur de Biotechnologies de Monastir (ISBM), Tunisie. 06-05-2010.*

PRÉSENTATIONS PAR AFFICHES

- 1) **Mnasri N, Mamarbachi M, Allen BG and Mayer G. (2017).** 5-Azacytidine Engages an IRE1 α -EGFR-ERK1/2 Signaling Pathway that Stabilizes the LDL Receptor mRNA. *Journée de la Recherche, institut de Cardiologie de Montréal. 01-06-2017.*
- 2) **Mnasri N, Mamarbachi M and Mayer G. (2015).** EGFR and ERK1/2-Dependent Stabilization of Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor mRNA by 5-Azacytidine. *40th Annual Canadian Lipoprotein Conference. Toronto, Canada. 18-10-2015.*
- 3) **Mnasri N, Mamarbachi M and Mayer G. (2015).** Le médicament épigénétique 5-Azacytidine stabilise l'ARN messenger du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) via une voie EGFR-ERK1/2 dépendante. *Journée de la Recherche, institut de Cardiologie de Montréal. 04-06-2015.*
- 4) **Mnasri N, Mamarbachi M and Mayer G. (2014).** Stabilisation de l'ARN messenger du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) par la 5-Azacytidine. *56ème réunion du Club de Recherches Cliniques du Québec. Québec. 20-09-2014.*
- 5) **Mnasri N, Tiyab N, Elkahoui S, Gargouri S and Djébali N. (2012).** Etude de l'effet de bactéries rhizosphériques sur l'amélioration de la résistance du blé dur à *Fusarium culmorum*. *23ème Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie. 21- 24 Mars 2012 Hammamet, Tunisie.*
- 6) **Tiyab N, Mnasri N, Hessini K, Gargouri S and Djébali N. (2012).** Amélioration de la résistance du blé dur à *Fusarium culmorum* au stade de germination par l'utilisation de sels minéraux. *23ème Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie. 21- 24 Mars 2012 Hammamet, Tunisie.*
- 7) **Mnasri N, Elkahoui S, Chenenaoui S, Hessini K, Gargouri S and Djébali N. (2012).** Seed Biopriming with Rhizospheric Bacteria improved Durum Wheat Resistance to *Fusarium culmorum*. *3rd BIODESERT International Workshop Microbial diversity in desert extreme environment "Microarray from theory to application". 9- 11th July 2012. Tunis.*

SÉMINAIRES

- 1) Participation au séminaire international « Identification des champignons saprophytes et extremophytes ». *Dans le cadre du projet de BIODESERT245746 organisé par l'Université Paul Cézanne, IMEP, Marseille, l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunis et l'Université Tunis- El Manar, 1^{er} – 2 Juin 2011.*

STAGES

- 1) Stage au Laboratoire d'oncologie et immunologie au Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada en 2013. (5 mois).
- 2) Stage au Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes au Centre de Biotechnologie de Borj- Cédria (CBBC), Tunis, Tunisie en 2012. (14 mois).
- 3) Stage au laboratoire de recherche sur les substances biologiquement compatibles (Toxicologie) à la Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie en 2010. (4 mois).
- 4) Stage au laboratoire de biochimie à l'hôpital régional de Bir El Hfay, Tunisie en 2007. (1 mois).

ASSISTANAT D'ENSEIGNEMENT

- 1) Auxiliaire d'enseignement, Faculté de pharmacie, été 2016 (cours PHA1110).
- 2) Auxiliaire d'enseignement, hiver 2016 (Travaux Pratiques en Microbiologie Générale: MCB 1979).

ASSISTANAT DE RECHERCHE

- 1) Expérience de six mois d'assistanat avec encadrement des stagiaires d'été, 2016 (étudiants à la maîtrise et au baccalauréat) dans le laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, athérosclérose et biologie cardiovasculaire à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

TÂCHES ACCOMPLIES DANS D'AUTRES PROJETS DE RECHERCHE AU LABORATOIRE

- 1) Participation au clonage du plasmide IDOL (MYLIP).

- 2) Clonage du gène *SPTLC3*.
- 3) Sacrifice des souris et conservation des échantillons, culture des cellules du pancréas, les Min6.

RÉDACTION DE MANUSCRITS

- 1) Un manuscrit d'environ 180 pages pendant mon doctorat en 2017.
- 2) Un manuscrit de 120 pages pendant le stage de mastère en 2012.
- 3) Un manuscrit de 70 pages pendant le stage de maîtrise en 2010.

BOURSES

- 1) Bourse d'exemption des frais de scolarité de la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal en 2013 pour quatre ans.
- 2) Bourse d'excellence de la Mission Universitaire de la Tunisie à Montréal en 2013 pour quatre ans, (1000 dollars par mois).
- 3) Bourse d'excellence du programme des Sciences Biomédicales en 2014, pour un an, (5000 dollars).