

Université de Montréal

**Régulation de la proprotéine convertase subtilisine / kexine
type 9 (PCSK9) dans les cellules intestinales Caco-2/15**

par

François Leblond

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
avec mémoire

Décembre 2008

© François Leblond, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de la proprotéine convertase subtilisine / kexine type 9 (PCSK9)
dans les cellules intestinales Caco-2/15

présenté par :
François Leblond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| Dr Jean-Claude Lavoie | Président du jury |
| Dr Emile Levy | Directeur de recherche |
| Dr Edgard Delvin | Co-directeur de recherche |
| Dr Guylaine Ferland | Membre du jury |

RÉSUMÉ

La proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9) favorise la dégradation post-transcriptionnelle du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLr) dans les hépatocytes et augmente le LDL-cholestérol dans le plasma. Cependant, il n'est pas clair si la PCSK9 joue un rôle dans l'intestin. Dans cette étude, nous caractérisons les variations de la PCSK9 et du LDLr dans les cellules Caco-2/15 différenciées en fonction d'une variété d'effecteurs potentiels. Le cholestérol (100 μ M) lié à l'albumine ou présenté en micelles a réduit de façon significative l'expression génique (30%, $p < 0,05$) et l'expression protéique (50%, $p < 0,05$) de la PCSK9. Étonnamment, une diminution similaire dans le LDLr protéique a été enregistrée (45%, $p < 0,05$). Les cellules traitées avec le 25-hydroxycholestérol (50 μ M) présentent également des réductions significatives dans l'ARNm (37%, $p < 0,01$) et la protéine (75%, $p < 0,001$) de la PCSK9. Une baisse des expressions génique (30%, $p < 0,05$) et protéique (57%, $p < 0,01$) a également été constatée dans le LDLr. Des diminutions ont aussi été observées pour la HMG CoA réductase et la protéine liant l'élément de réponse aux stérols SREBP-2. Il a été démontré que le SREBP-2 peut activer transcriptionnellement la PCSK9 par le biais de la liaison de SREBP-2 à son élément de réponse aux stérols situé dans la région proximale du promoteur de la PCSK9. Inversement, la déplétion du contenu cellulaire en cholestérol par l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine a augmenté l'expression génique de la PCSK9 (20%, $p < 0,05$) et son contenu protéique (540%, $p < 0,001$), en parallèle avec les niveaux protéiques de SREBP-2. L'ajout des acides biliaires taurocholate et déoxycholate dans le milieu apical des cellules intestinales Caco-2/15 a provoqué une baisse d'expression génique (30%, $p < 0,01$) et une hausse d'expression protéique (43%, $p < 0,01$) de la PCSK9 respectivement, probablement via la modulation du FXR (farnesoid X receptor). Ces données combinées semblent donc indiquer que la PCSK9 fonctionne comme un senseur de stérols dans le petit intestin.

Mots-clés: Entérocyte, PCSK9, cholestérol, régulation, FXR, SREBP-2

ABSTRACT

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) posttranslationally promotes the degradation of the low-density lipoprotein receptor (LDLr) in hepatocytes and increases plasma LDL cholesterol. It is not clear, however, whether PCSK9 plays a role in the small intestine. Here, we characterized the patterns of variations of PCSK9 and LDLr in fully differentiated Caco-2/15 cells as a function of various potential effectors. Cholesterol (100 μ M) solubilised in albumin or micelles significantly down-regulated PCSK9 gene (30%, $p < 0,05$) and protein expression (50%, $p < 0,05$), surprisingly in concert with a decrease in LDLr protein levels (45%, $p < 0,05$). 25-hydroxycholesterol (50 μ M) treated cells also displayed significant reduction in PCSK9 gene (37 %, $p < 0,01$) and protein (75% $p < 0,001$) expression, while LDLr showed a decrease at the gene (30%, $p < 0,05$) and protein (57%, $p < 0,01$) levels, respectively. The amounts of PCSK9 mRNA and protein in Caco-2/15 cells were associated to the regulation of HMG-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) that can transcriptionally activate PCSK9 via sterol-regulatory elements located in its proximal promoter region. On the other hand, depletion of cholesterol content by hydroxypropyl- β -cyclodextrine up-regulated PCSK9 transcripts (20%, $p < 0,05$) and protein mass (540%, $p < 0,001$), in parallel with SREBP-2 protein levels. The addition of bile acids, taurocholate and deoxycholate, to the apical culture medium lowered PCSK9 gene expression (30%, $p < 0,01$) and raised PCSK9 protein expression (43%, $p < 0,01$) respectively, probably via the modulation of farnesoid X receptor. Combined, these data indicate that PCSK9 functions as a sensor of sterol in the small intestine.

Keywords: Enterocyte, PCSK9, cholesterol, regulation, FXR, SREBP-2

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----|
| Page de titre..... | i |
| Page d'identification du jury..... | ii |
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Table des matières..... | vi |
| Liste des tableaux..... | x |
| Liste des figures..... | xi |
| Liste des abréviations..... | xii |
| Remerciements..... | xiv |
| | |
| I. INTRODUCTION..... | 1 |
| | |
| 1. Le métabolisme du cholestérol..... | 1 |
| 1.1 La molécule de cholestérol : voie de synthèse..... | 1 |
| 1.2 Métabolisme et transport du cholestérol | 3 |
| 1.2.1 Le rôle de l'intestin..... | 3 |
| 1.2.2 Le rôle du foie..... | 5 |
| 1.2.3 Entrée du cholestérol dans la cellule par le LDLr..... | 8 |
| 1.2.4 Excrétion du cholestérol..... | 12 |
| 1.3 Facteurs de transcription du métabolisme du cholestérol..... | 12 |
| 1.3.1 Le SREBP..... | 13 |
| 1.3.2 Les PPAR..... | 14 |
| 1.3.3 Le LXR..... | 15 |
| 1.3.4 Les récepteurs nucléaires reliés aux acides biliaires..... | 15 |
| 2. Hypercholestérolémie..... | 17 |
| 2.1 Hypercholestérolémie autosomale dominante..... | 17 |
| 2.1.1 Description clinique..... | 18 |
| 2.1.2 Gènes impliqués..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2.1 Le LDLr..... | 18 |
| 2.1.2.2 L'apo B100..... | 19 |
| 2.1.2.3 La PCSK9..... | 20 |
| 2.1.2.3.1 Mutations provoquant l'hypercholestérolémie..... | 21 |
| 2.1.2.3.2 Mutations causant l'hypocholestérolémie..... | 23 |
| 2.1.2.4 Autres gènes..... | 25 |
| 2.2 Hypercholestérolémie autosomale récessive..... | 26 |
| 3. Description biochimique de la PCSK9..... | 27 |
| 3.1 Domaines de la PCSK9..... | 27 |
| 3.2 Synthèse de la PCSK9..... | 30 |
| 3.3 Modifications post-traductionnelles de la PCSK9..... | 31 |
| 3.4 Activité enzymatique de la PCSK9..... | 32 |
| 4. Rôle et fonctionnement de la PCSK9..... | 33 |
| 4.1 Rôle de la PCSK9 dans le métabolisme lipidique..... | 33 |
| 4.1.1 Effets sur la cholestérolémie suite à la dégradation du LDLr..... | 33 |
| 4.1.1.1 Liaison de la PCSK9 au LDLr..... | 35 |
| 4.1.1.2 La dégradation du LDLr survient dans une organelle à pH acide..... | 37 |
| 4.1.1.3 Effet cellule-spécifique de la PCSK9 sur le LDLr..... | 39 |
| 4.1.1.4 Mutations et dégradation du LDLr..... | 39 |
| 4.1.2 Effets sur l'apo B..... | 39 |
| 4.1.3 Effets sur le VLDLr et l'apo ER2..... | 40 |
| 4.1.4 PCSK9 comme cible thérapeutique..... | 41 |
| 4.2 Autres rôles possibles de la PCSK9..... | 42 |
| 4.2.1 Différenciation cellulaire..... | 42 |
| 4.2.2 Développement du système nerveux central..... | 43 |
| 4.2.3 Apoptose des neurones..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 4.2.4 Cancer..... | 44 |
| 4.2.5 Protection contre les parasites..... | 44 |
| 5. Régulation hépatique de la PCSK9..... | 45 |
| 5.1 Statines..... | 46 |
| 5.2 Ezétimibe..... | 47 |
| 5.3 Agonistes LXR..... | 47 |
| 5.4 Fibrates..... | 47 |
| 5.5 Acide zaragozique..... | 48 |
| 5.6 Berbérine..... | 49 |
| 5.7 Acides biliaires..... | 49 |
| 5.8 Stérols..... | 50 |
| 5.9 Diabète..... | 50 |
| 5.10 Glucose et insuline..... | 51 |
| 5.11 Jeûne..... | 51 |
| 5.12 Inflammation..... | 51 |
| II. PROJET DE RECHERCHE..... | 53 |
| 1. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS..... | 53 |
| 2. MÉTHODOLOGIE..... | 55 |
| 2.1 Culture cellulaire..... | 55 |
| 2.2 Traitements cellulaires..... | 56 |
| 2.3 Immunobuvardage..... | 57 |
| 2.4 Expression génique par RT-PCR..... | 58 |
| 2.5 Analyses statistiques..... | 60 |
| 3. ARTICLE SCIENTIFIQUE..... | 61 |
| 3.1 Rédaction du mémoire par article..... | 61 |
| 3.2 Apport original et contribution des co-auteurs..... | 63 |
| 3.3 Accord des co-auteurs..... | 64 |
| 3.4 Regulation of the proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 in intestinal epithelial cells..... | 65 |

III. DISCUSSION.....97

IV. BIBLIOGRAPHIE.....103

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I. Liste des mutations de la PCSK9 provoquant l'hypercholestérolémie..... | 22 |
| Tableau II. Liste des mutations de la PCSK9 causant l'hypocholestérolémie..... | 24 |
| Tableau III. Séquences des amorces utilisées pour les PCR..... | 59 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Structure chimique du cholestérol..... | 1 |
| Figure 2. Étapes initiales de la biosynthèse du cholestérol..... | 2 |
| Figure 3. Étapes finales de la biosynthèse du cholestérol..... | 3 |
| Figure 4. Métabolisme intestinal du cholestérol..... | 4 |
| Figure 5. Métabolisme hépatique du cholestérol..... | 6 |
| Figure 6. Transport inversé du cholestérol..... | 7 |
| Figure 7. Endocytose du LDLr..... | 9 |
| Figure 8. L'endocytose du LDLr nécessite des protéines adaptatrices..... | 11 |
| Figure 9. Activation de SREBP..... | 13 |
| Figure 10. Structure secondaire de PCSK9. | 28 |
| Figure 11. Maturation de la PCSK9..... | 30 |
| Figure 12. Liaison de la PCSK9 au LDLr..... | 36 |
| Figure 13. Les 2 voies de dégradation du LDLr par la PCSK9..... | 38 |
| Figure 14. Régulation hépatique de la PCSK9..... | 45 |
| Figure 15. Transwell permettant la différenciation des entérocytes..... | 56 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : acides aminés
ABC : ATP-binding cassette
acétyl coA : acétyl coenzyme A
apo : apolipoprotéine
apo ER2 : récepteur 2 de l'apolipoprotéine E
AMPK : adenosine monophosphate-activated protein kinase
AR : acide rétinoïque
ARH : protéine adaptatrice du LDLR
ARNm : acide ribonucléique messenger
AZ : acide zaragozique
CA : acide cholique
CAR : constitutive androstane receptor
CDCA : acide chénodéoxycholique
CETP : cholesteryl ester transfer protein
CHRD : domaine riche en résidus cystéines et histidines
CM : chylomicron
Cyp7a1 : gène codant le cholestérol 7 α -hydroxylase
DCA : acide déoxycholique
EGF : epidermal growth factor
FAT/CD36 : fatty acid translocase / cluster determinant 36
FBS : sérum foetal bovin
FXR : farnesoid X receptor
HAD : hypercholestérolémie autosomale dominante
HAR : hypercholestérolémie autosomale récessive
HDL : lipoprotéine de haute densité
HF : hypercholestérolémie familiale
HMG CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire
LDL : lipoprotéine de faible densité

LDL-C : LDL-cholestérol
LDLr : récepteur du LDL
LPL : lipoprotéine lipase
LRP : LDL receptor like protein
LXR : liver X receptor
kDa : kiloDaltons
MAP : mitogen activated protein
MCV : maladies cardiovasculaires
MEM : milieu de culture contenant un minimum d'éléments essentiels
MTP : microsomal triglyceride transfer protein
NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1
PC : proprotéine convertase
PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine/kexine type 9
PL : phospholipides
Ptd-Ins(4,5)P₂: phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
PPAR : peroxyosome proliferator activated receptor
PXR : pregnane X receptor
RAP : receptor associated protein
RE : réticulum endoplasmique
RXR : retinoid X receptor
S1P : site 1 protéase
SCAP : SREBP cleavage-activating protein
SNP : single nucleotide polymorphism
SR-BI : scavenger receptor BI
SRE : élément de réponse aux stérois
SREBP : protéine de liaison à l'élément de réponse aux stérois
TG : triglycérides
VLDL : lipoprotéine de très faible densité
VLDLr : récepteur de VLDL

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Emile Levy, pour son indulgence, sa patience et son dévouement. Merci au Dr Edgard Delvin, mon co-directeur, pour sa générosité et ses bons conseils. Mon passage dans votre laboratoire m'aura permis d'apprendre énormément sur la science et la recherche, mais aussi beaucoup sur moi-même.

Un immense merci à tous les membres actuels et passés du laboratoire. Spécialement à Carole, une femme extraordinaire qui m'y a rapidement fait sentir comme à la maison. Merci aussi au trio de spécialistes de la biologie moléculaire qui m'ont beaucoup aidé et ce, toujours avec patience : Dr Alain T Sané, Dr Mounib Elchebly et Dr Michel Dominguez. Merci à Zola pour son dévouement sans borne envers tous les membres du laboratoire. À Dre Geneviève Mailhot qui demeure pour moi un exemple de réussite scientifique, personnel et sportif. Et bien sûr, à mes deux comparses de toujours, Geneviève et Louis-Philippe, en qui j'ai découvert de véritables amis qui demeureront toujours dans mon cœur et dans ma mémoire...!

Évidemment, un énorme merci à mes parents et à mon frère pour leur support pendant toutes ces années. Merci de m'avoir toujours encouragé et supporté dans mes décisions. Merci à tous mes amis pour leurs encouragements et pour m'avoir aidé à devenir ce que je suis. À ma Valérie, la femme de ma vie, qui vient de me donner le plus beau cadeau du monde en Olivier; je ne te remercierai jamais assez pour ton support et ton amour inconditionnels. Finalement, un merci tout spécial à Vincent, qui est parti trop vite, mais qui aura montré à tous ceux qui l'ont connu que la vie mérite d'être vécue pleinement à chaque instant.

François, août 2008

I. INTRODUCTION

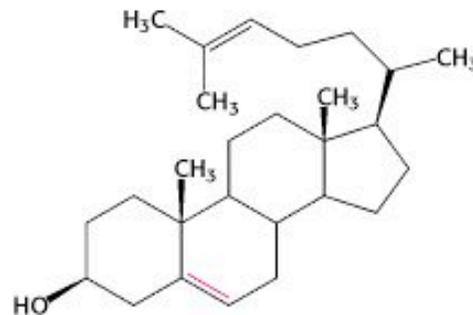
1- Le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est une molécule essentielle à la vie. Il est une des composantes des membranes cellulaires, un précurseur d'hormones stéroïdiennes (testostérone, oestradiol, cortisol, aldostérone), un des constituants des acides biliaires qui facilitent l'absorption intestinale des lipides alimentaires, et aussi un de ses dérivés, le 7-déhydrocholestérol, est le précurseur de la vitamine D. La molécule de cholestérol peut aussi réguler l'expression de plusieurs gènes. Le cholestérol peut provenir de l'alimentation et pénétrer l'intestin, ou bien être synthétisé par le foie principalement.

1.1 La molécule de cholestérol : voie de synthèse

La molécule de cholestérol est formée de 27 atomes de carbone (voir Figure 1).

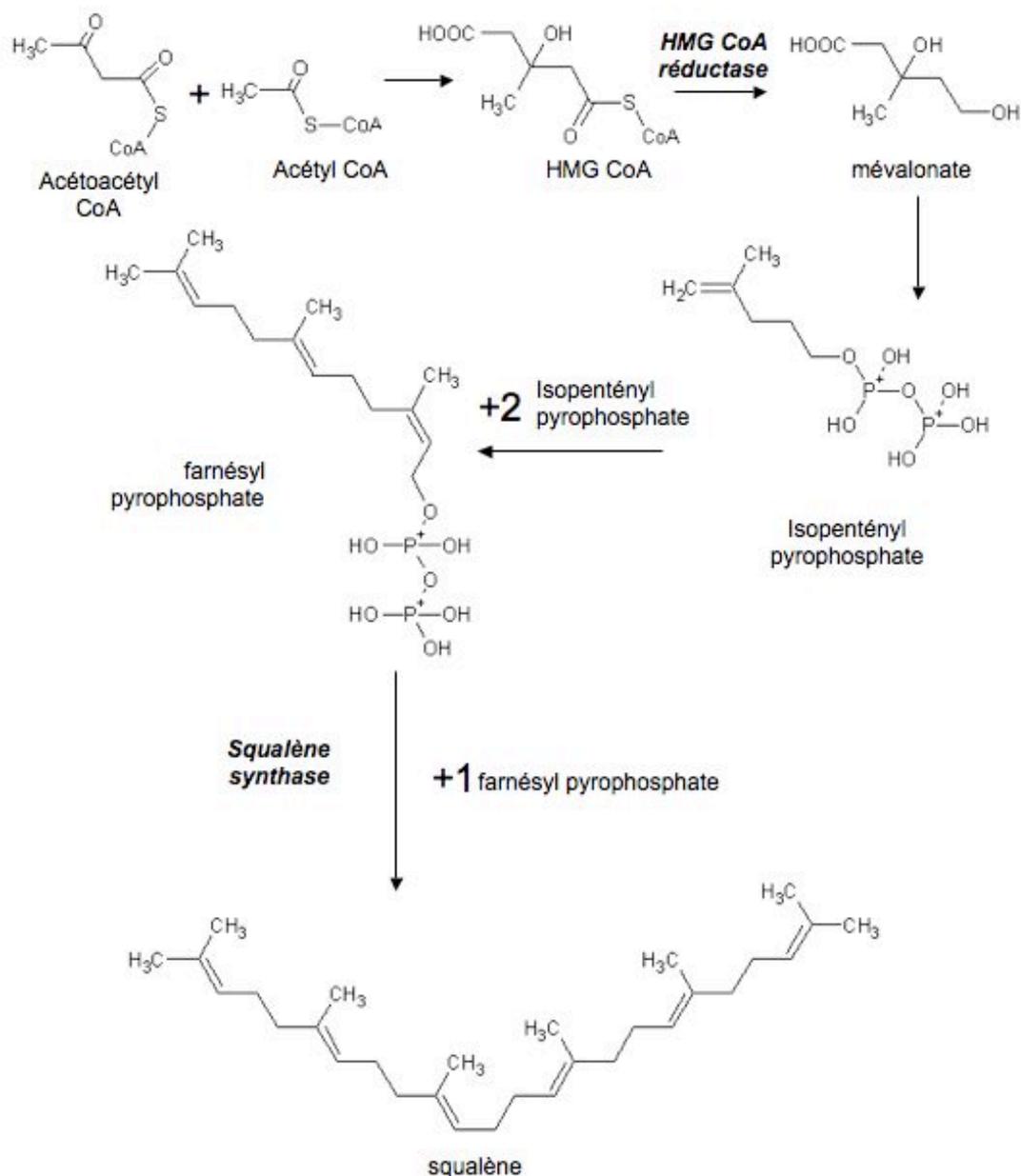
Figure 1. Structure chimique du cholestérol.



Adapté de [1].

Sa biosynthèse est complexe et chaque carbone utilisé dans sa confection provient de l'acétyl coenzyme A (acétyl CoA), une molécule clé dans plusieurs voies métaboliques de l'organisme (voir Figure 2).

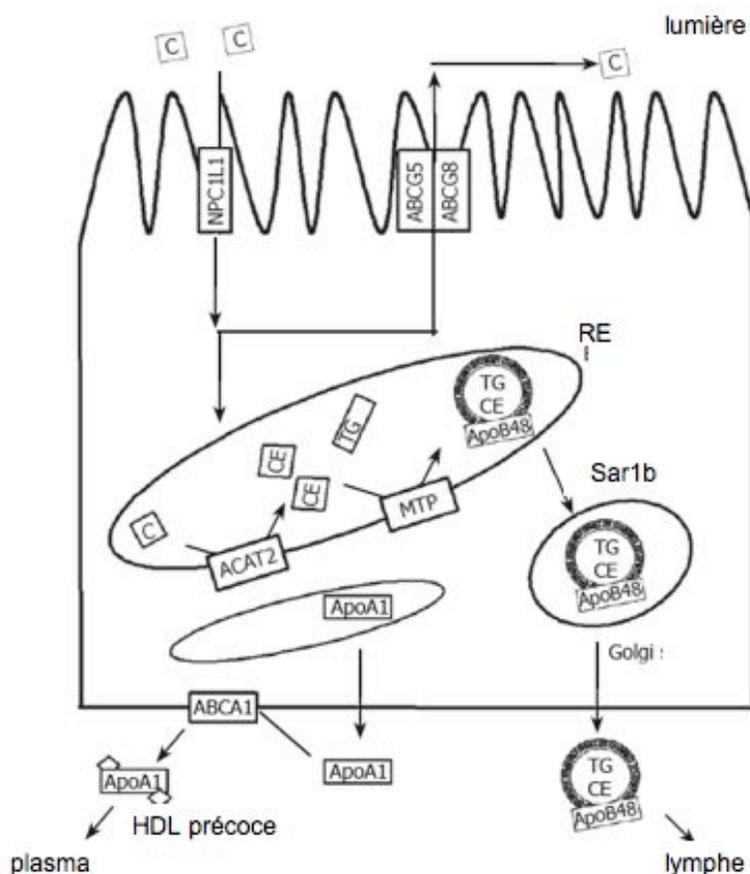
Figure 2. Étapes initiales de la biosynthèse du cholestérol.



Brièvement, la première réaction mène à la formation du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) en combinant l'acétyl CoA et l'acétoacétyl coenzyme A. Le HMG CoA peut être réduit en mévalonate dans le cytosol ou permet la formation de corps cétoniques dans la mitochondrie. L'enzyme HMG CoA réductase permet la formation irréversible du mévalonate et constitue l'étape principale pour le contrôle de la formation du

le plus important [3-6]. Outre celui-ci, le SR-BI (scavenger receptor BI), l'hétérocomplexe caveoline-1 / annexine-2 et le FAT/CD36 (fatty acid translocase / cluster determinant 36) participent à l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte (voir Figure 4).

Figure 4. Métabolisme intestinal du cholestérol.



ABCA1 : ATP-binding cassette A1; ABCG5/G8 : ATP-binding cassette G5/G8; ACAT2 : acyl-coA cholestérol acyl-transférase 2; ApoA1 : apolipoprotéine A-I; apoB48 : apolipoprotéine B48; C : cholestérol; CE : cholestérol ester; HDL : lipoprotéine de haute densité; MTP : microsomal triglyceride transfer protein; NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1; RE : réticulum endoplasmique; TG : triglycérides.

Traduit de [7].

Certains membres de la famille des protéines ABC (ATP-binding cassette) sont impliqués dans l'efflux de cholestérol. L'ABCA1, située surtout sur la

membrane basolatérale de l'entérocyte, sert à la sortie du cholestérol vers la circulation sanguine et contribue à la production de HDL, tandis que l'hétérodimère ABCG5/ABCG8 expulse le cholestérol vers la lumière intestinale étant donné sa localisation apicale [8].

Le cholestérol, étant hydrophobe, est transporté dans la circulation sanguine par des lipoprotéines. Avant sa sortie de l'entérocyte, le cholestérol est inséré dans le chylomicron (CM), la lipoprotéine ayant la plus faible densité. Le CM est formé principalement de triglycérides (TG), mais aussi de phospholipides (PL), de cholestérols ester et libre, d'apolipoprotéine (apo) B48, A-I, A-IV et C-III.

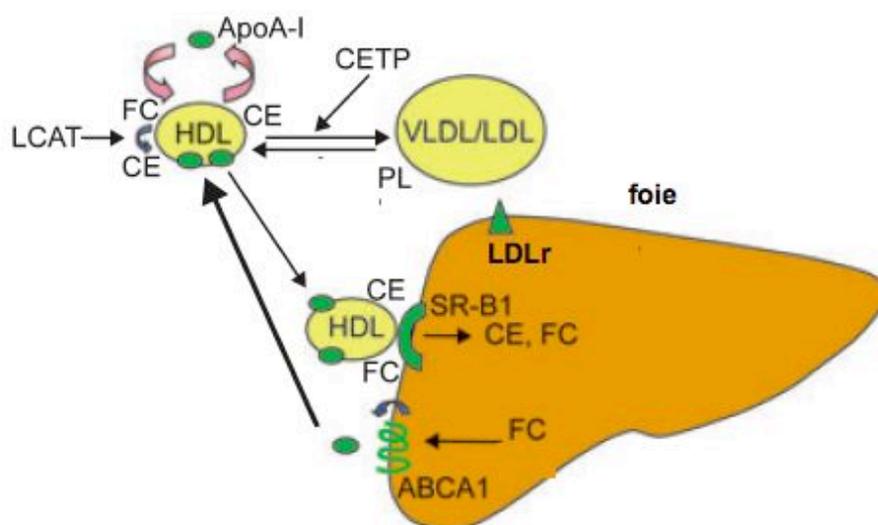
Lors de l'assemblage du CM, le cholestérol est estérifié par l'enzyme acyl-coA cholestérol acyl-transférase. Le cholestérol ester, les TG et les PL sont transférés du réticulum endoplasmique (RE) lisse vers l'apo B48, située dans le RE rugueux, par la MTP (microsomal triglyceride transfer protein). Le CM est transporté par des vésicules du RE vers le Golgi grâce à la protéine Sar1b. C'est aussi dans les vésicules golgiennes qu'il migre vers la membrane basolatérale pour être relargué dans le sang à partir de la lymphe. Dans la circulation, une partie des TG du CM sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) pour créer des résidus de CM plus riches en cholestérol. Ces résidus sont repris par le foie suite à leur liaison surtout à l'apo E, mais aussi aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDL) et LRP (LDL receptor like protein). Suite à la capture par le foie des résidus de CM, les lysosomes permettent l'hydrolyse des divers composants [9, 10].

1.2.2 Le rôle du foie

Le foie peut quant à lui exporter des TG et du cholestérol via la synthèse de la lipoprotéine de très faible densité (VLDL). Cette dernière est aussi composée majoritairement de TG et possède les apo C-II et E, mais sa principale apo est la B100 plutôt que l'apo B48, contenu dans le chylomicron

uniquement. L'apo B48 provient d'une modification post-transcriptionnelle de l'acide ribonucléique messager (ARNm) sous le contrôle d'un complexe enzymatique dont le principal acteur est l'apobec-1. Dans l'hépatocyte, la MTP permet, tout comme pour le CM, d'associer les TG à l'apo B100. Le VLDL interceptera du cholestérol et des TG supplémentaires lors de son transit du Golgi vers les vésicules de sécrétion. Dans la circulation, les VLDL recevront des esters de cholestérol supplémentaires grâce à la CETP (cholesteryl ester transfer protein) (voir Figure 5).

Figure 5. Métabolisme hépatique du cholestérol.



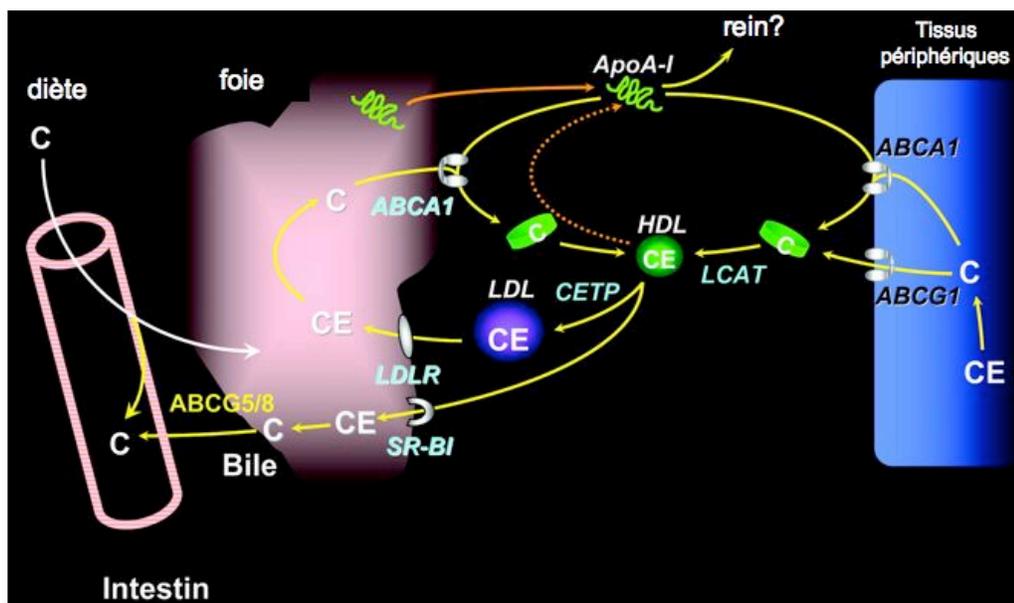
ABCA1 : ATP-binding cassette A1; ApoA1 : apolipoprotéine A-I; CE : cholestérol ester; CETP : cholesteryl ester transfer protein; FC : cholestérol libre; HDL : lipoprotéine de haute densité; LCAT : lécithine:cholestéryl acyltransférase; LDL : lipoprotéine de faible densité; LDLr : récepteur de la lipoprotéine de faible densité; PL : phospholipides; SR-B1 : scavenger receptor B1; VLDL : lipoprotéine de très faible densité.

Adapté de [11].

La LPL peut cliver les TG du VLDL pour former les résidus de VLDL, ou lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), qui pourront retourner aux hépatocytes en liant le récepteur du LDL (LDLr) grâce à l'apo E. Ils seront dégradés dans les lysosomes. Le reste des IDL subiront l'action de la LPL et se convertiront en LDL. Cette dernière lipoprotéine représente le principal

véhicule de cholestéryl ester dans la circulation sanguine, et c'est lui qui permet d'acheminer les esters de cholestérol à tous les tissus [12]. La lipoprotéine de haute densité (HDL) est, quant à elle, impliquée dans le transport inversé du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. C'est ainsi que l'excès de cholestérol peut être redirigé vers le foie pour être éliminé dans la bile (voir Figure 6).

Figure 6. Transport inversé du cholestérol.



ABCA1 : ATP-binding cassette A1; ABCG1 : ATP-binding cassette G1; ABCG5/G8 : ATP-binding cassette G5/G8; ApoA1 : apolipoprotéine A-1; C : cholestérol; CE : cholestérol ester; CETP : cholesteryl ester transfer protein; HDL : lipoprotéine de haute densité; LCAT : lécithine:cholestéryl acyltransférase; LDL : lipoprotéine de faible densité; LDLR : récepteur de la lipoprotéine de faible densité; SR-BI : scavenger receptor BI.

Traduit de [13].

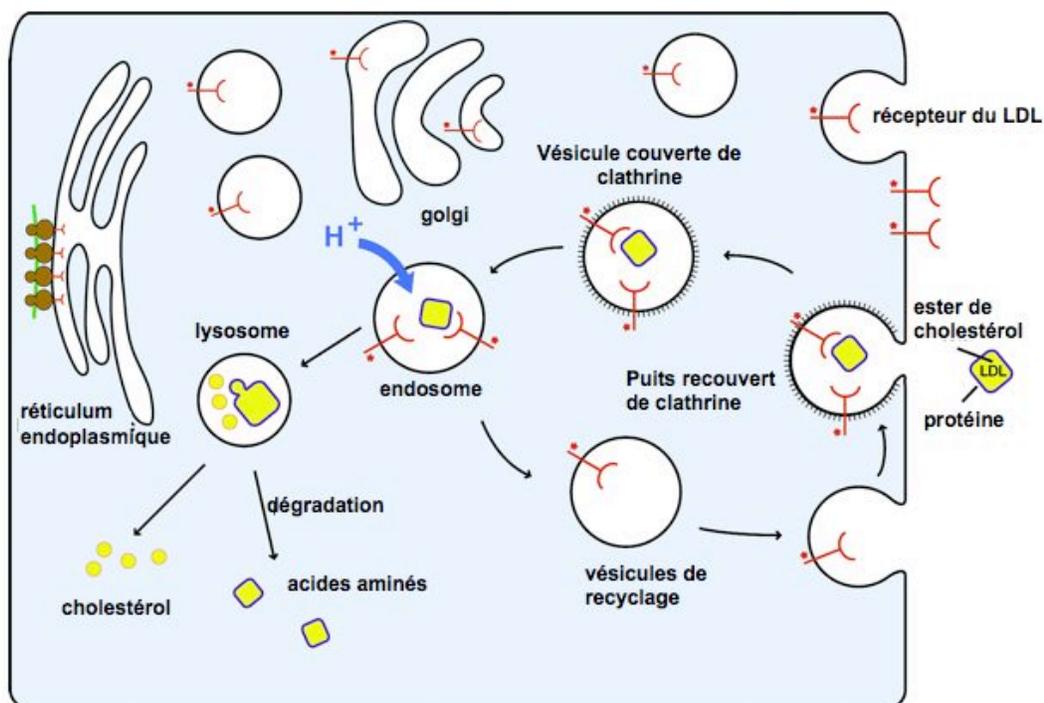
Le HDL est formé extracellulairement à partir de l'apo A-I, des PL et du cholestérol libre provenant des cellules périphériques. Ce cholestérol a été exporté hors des cellules grâce à l'ABCA1. L'enzyme lécithine : cholestéryl acyltransférase va permettre l'estérification du cholestérol libre dans la circulation pour lui permettre de rejoindre le contenu hydrophobe du HDL. Au fur et à mesure que du cholestérol estérifié s'ajoute à l'intérieur du HDL, sa

taille devient considérable. Le HDL peut ensuite rapporter les esters de cholestérol vers le foie en liant le SR-BI grâce à l'apoA-I. Moins chargé en cholestérol, le HDL retourne chercher du cholestérol dans les tissus périphériques. La protéine CETP peut aussi transférer des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et LDL en échange de TG. Ceci va provoquer une hausse du catabolisme du HDL étant donné qu'il devient une cible plus intéressante pour la lipase hépatique étant donné sa charge en TG. Le HDL peut ainsi permettre d'alléger les tissus de leur excès de cholestérol [14].

1.2.3 Entrée du cholestérol dans la cellule par le LDLr

C'est par le LDLr que la cellule peut capter le cholestérol présent dans le LDL. Cette glycoprotéine a été découverte dans les années 70 par les Américains Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein alors qu'ils tentaient de comprendre les bases moléculaires de l'hypercholestérolémie familiale (HF) [15-21]. Plusieurs années d'études ont permis d'en arriver à un schéma clair de l'entrée du cholestérol vers les cellules grâce au système du LDL et de son récepteur (Voir Figure 7).

Figure 7. Endocytose du LDLr.



Adapté de [22].

Le LDL lie son récepteur, puis l'endocytose du complexe ligand-récepteur grâce à l'invagination de la membrane permet d'internaliser le complexe. Un puits couvert de clathrine permet le transport du complexe vers les endosomes, une structure à pH acide, ce qui provoque la dissociation du LDL de son récepteur. Ce dernier peut retourner vers la membrane, tandis que le LDL est dégradé dans le lysosome en acides aminés et en cholestérol [22].

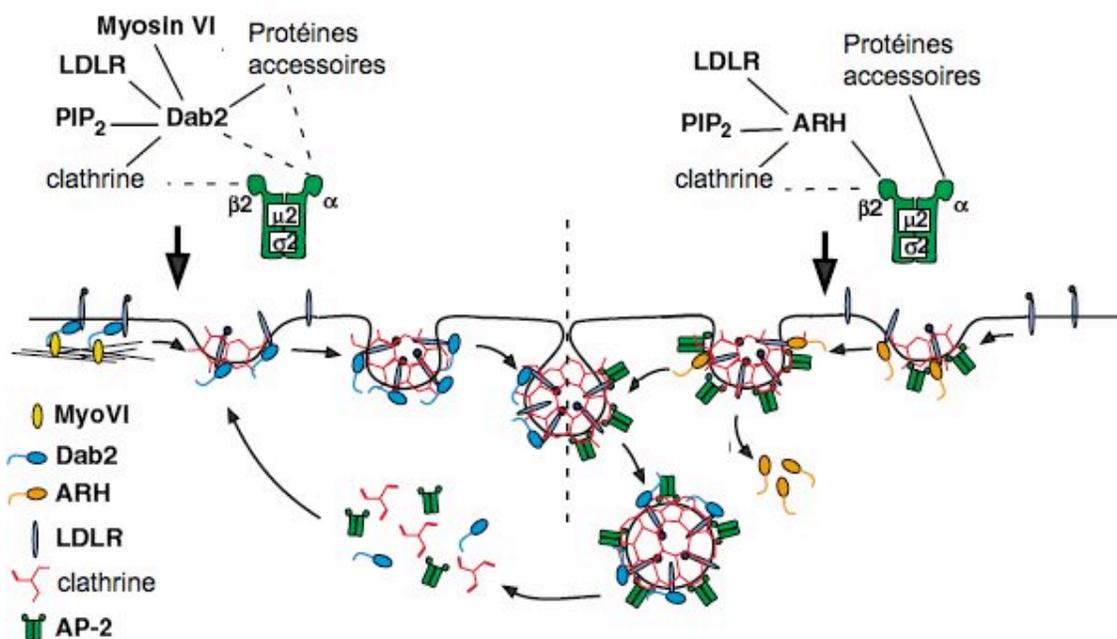
Le LDLr est codé par un gène d'environ 45 kb situé sur le chromosome 19 [23]. Les 18 exons du gène forment une protéine transmembranaire de 860 acides aminés (AA) composée de cinq domaines : la région de liaison du ligand, la région homologue au précurseur de l'EGF (epidermal growth factor), le site riche en sérines et thréonines accepteur de sucres pour la glycosylation de la protéine, le domaine transmembranaire et le domaine cytosolique qui contient une séquence NPXY permettant l'interaction avec les puits recouverts de clathrine. Le LDLr est le membre principal d'une grande

famille de récepteurs cellulaires de surface ayant une homologie de structure et de fonction qui est divisée en 4 sous-groupes. Le LDLr appartient au même sous-groupe que le récepteur des VLDL (VLDLr) et le récepteur 2 de l'apo E (apo ER2) [24].

Le LDLr est synthétisé sous forme de précurseur dans le RE rugueux avec une masse d'environ 120 kiloDaltons (kDa). Environ 30 minutes après sa synthèse, son poids moléculaire passe à 160 kDa suite à l'élongation des chaînes d'oligosaccharides et au changement de conformation de la protéine. Le LDLr apparaît finalement à la membrane 45 minutes après sa synthèse, puis sera endocyté 3 à 5 minutes après son arrivée. Chaque LDLr complète un cycle d'endocytose / recyclage à la membrane à toutes les dix minutes [17]. Certaines protéines chaperonnes sont impliquées dans le bon repliement du LDLr dans le RE : les chaperonnes générales BiP, calnexine / calréticuline, et la famille des isomérases disulfures, en plus de la chaperonne spécifique RAP (receptor associated protein) seraient requises [24].

La liaison d'une lipoprotéine au LDLr nécessite la présence de l'apo B100 ou de l'apo E. L'apo B100 n'est présente qu'en une seule copie sur le LDL, tandis que l'apo E est présente en plusieurs copies sur les pré-VLDL ou certains HDL. Les lipoprotéines ayant l'apo E peuvent aussi lier d'autres membres de la famille des LDLr, dont le VLDLr et l'apo ER2. Une fois la lipoprotéine liée au LDLr, elle peut être endocytosée. L'association du LDLr à la clathrine nécessite la présence de protéines adaptatrices (voir Figure 8).

Figure 8. L'endocytose du LDLr nécessite des protéines adaptatrices.



ARH : protéine adaptatrice du LDLr; LDLr : récepteur de la lipoprotéine de faible densité;
 PIP₂ : phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate.

Adapté de [25].

La première protéine adaptatrice a été identifiée récemment et cause une défectuosité génétique provoquant l'hypercholestérolémie (voir section 2.2), il s'agit de la protéine adaptatrice du LDLr nommée ARH [26]. La protéine Dab-2 agit également comme protéine adaptatrice pour la liaison du LDLr aux puits de clathrine pour l'endocytose. Ces deux protéines lient la séquence NPXY du domaine cytosolique du LDLr, en plus d'avoir des sites de liaison pour la clathrine, le phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (Ptd-Ins(4,5)P₂) et la protéine tétramérique AP-2. Une des sous-unités de l'AP-2 lie le Ptd-Ins(4,5)P₂ pour lui permettre de se fixer à la membrane, et fait partie intégrante des puits recouverts de clathrine [27, 28]. La présence d'AP-2 ne serait pas primordiale pour l'internalisation du LDLr par sa liaison à Dab-2, quoique préférable, mais serait requise pour l'internalisation du LDLr avec l'ARH [25, 29].

Une fois l'endocytose réalisée, le LDLr doit se dissocier de ses ligands pour retourner à la membrane. Le relarguage des ligands se déroule lorsque le complexe atteint le pH acide des endosomes. Le LDLr passerait d'une conformation ouverte à pH neutre à une conformation fermée à pH acide, ce qui produirait la dissociation de ses ligands. Le domaine homologue au précurseur de l'EGF et trois résidus histidines seraient primordiaux pour ce changement de conformation [22, 30, 31]. Le LDLr pourrait ensuite être recyclé à la membrane pour débiter un autre cycle de liaison avec un ligand.

1.2.4 Excrétion du cholestérol

La seule voie d'excrétion du cholestérol se limite à la formation des acides biliaires. Ceux-ci sont synthétisés par le foie et concentrés dans la vésicule biliaire, avant d'être relargués dans l'intestin grêle pour faciliter la digestion des lipides par la formation d'émulsions. La première étape consiste à hydroxyler, en position 7, le cholestérol. La réaction est sous le contrôle de l'enzyme 7- α -hydroxylase (Cyp7a1) qui constitue l'enzyme clé et limitante de la synthèse des acides biliaires. Lorsque la concentration hépatique de cholestérol est trop importante, la Cyp7a1 s'active pour augmenter la synthèse de sels biliaires. Les acides cholique (CA) et chénodéoxycholique (CDCA) constituent les acides biliaires qui sont synthétisés en premier, et ils sont généralement conjugués à la glycine ou à la taurine. Suite à l'activité bactérienne anaérobie du côlon, les CA et CDCA sont transformés en acide déoxycholique (DCA) et en acide lithocholique, respectivement. Ces acides biliaires sont absorbés dans l'iléon par divers transporteurs et sont captés par le foie, conjugués puis redirigés vers la bile [32, 33].

1.3 Facteurs de transcription du métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol étant complexe et primordial pour la survie cellulaire, il doit être régulé finement. C'est grâce à divers facteurs de

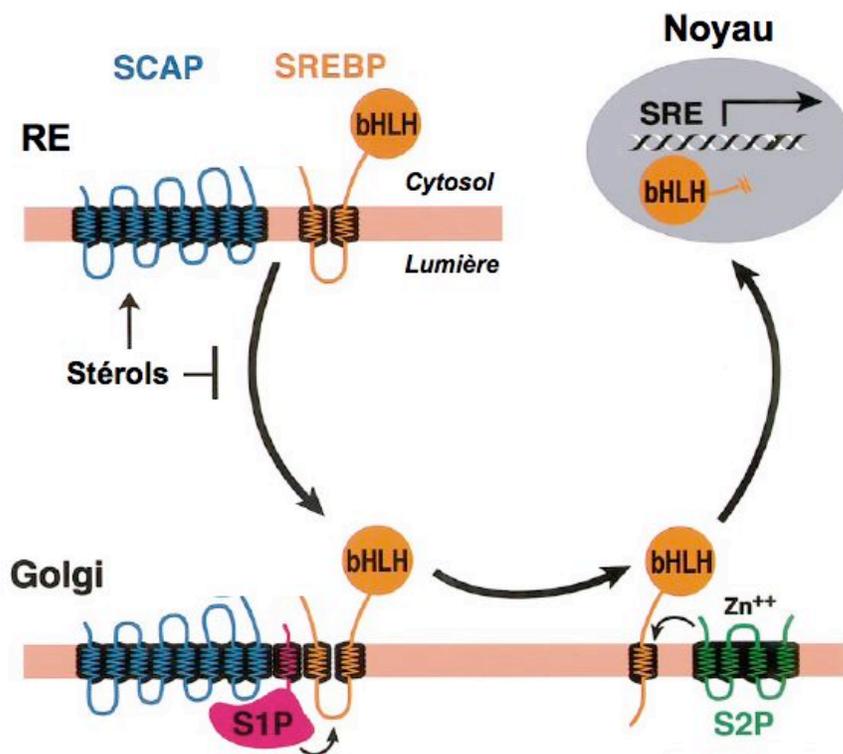
transcription qui sont activés ou réprimés selon les besoins de la cellule que des gènes responsables du métabolisme du cholestérol sont modulés.

1.3.1 Le SREBP

La protéine de liaison à l'élément de réponse aux stérols (SREBP) agit comme senseur intracellulaire des taux de cholestérol. Sa liaison à l'élément de réponse aux stérols (SRE) au noyau permet à l'organisme d'activer des mécanismes pour réguler les niveaux de cholestérol.

Lorsque la cellule manque de stérols, la protéine SCAP (SREBP cleavage-activating protein) amène le SREBP du RE vers le Golgi (voir figure 9).

Figure 9. Activation de SREBP.



bHLH : motif basique hélice-boucle-hélice; RE : réticulum endoplasmique; S1P : site 1 protéase; S2P : site 2 protéase; SCAP : SREBP cleavage-activating protein; SRE : élément de réponse aux stérols; SREBP : protéine de liaison au SRE.

Adapté de [34].

Ensuite, la protéase à sérine S1P (site 1 protéase) permet de dissocier SREBP de la membrane dans le Golgi [35]. Ensuite, la métalloprotéase S2P va la cliver en 2 fragments pour libérer le domaine N-terminal (contenant un motif basique hélice-boucle-hélice - bHLH) qui pourra transloquer au noyau et lier sa séquence SRE pour l'activation de ses gènes cibles. Dans la situation où la concentration de cholestérol est élevée, le complexe SCAP/SREBP ne sera pas incorporé dans des vésicules de transport pour être exporté hors du RE [34, 36]. Ce serait la protéine résidente du RE Insig-1 qui viendrait lier SCAP pour empêcher sa sortie du RE [37].

Deux gènes codent pour trois différents isoformes de SREBP. SREBP 1a et 1c proviennent du gène situé sur le chromosome 17p11.2. Leur différence provient d'un site d'initiation de transcription alternatif qui produit un exon 1 différent. Quant à SREBP-2, il est situé sur le chromosome 22q13. L'isoforme 1a est un activateur de tous les gènes répondant à SREBP. La forme 1c active la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (acétyl-CoA carboxylase et fatty acid synthase, par exemple), tandis que SREBP-2 régule plutôt les gènes reliés à la synthèse du cholestérol (entre autres LDLr, HMG coA réductase et synthase) [38].

1.3.2 Les PPAR

La famille des PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor) contient trois membres, codés par trois gènes, qui possèdent une grande homologie: α , β/δ et γ . Ces facteurs de transcription appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et forment des hétérodimères avec le RXR (retinoid X receptor) lorsqu'ils sont activés et lient leur élément de réponse spécifique sur leurs gènes cibles [39, 40].

Le PPAR- α est impliqué dans l'oxydation des acides gras (carnitine palmitoyltransferase I), le captage des acides gras (FAT/CD36), le métabolisme des lipoprotéines (LPL, ABCA1 et SR-BI), le métabolisme du

glucose hépatique et l'inflammation associée au développement de l'athérosclérose. Les fibrates constituent un médicament hypolipidémiant ciblant le PPAR- α [41].

Le PPAR- γ est plutôt impliqué dans les voies de signalisation de l'insuline et le métabolisme du glucose. La classe de médicaments antidiabétiques thiazolidinedione cible le PPAR- γ [39, 42].

Finalement, le PPAR- β/δ serait impliqué dans l'homéostasie lipidique des macrophages et serait pro-inflammatoire [42], en plus d'être possiblement associé au phénomène d'insulino-résistance musculaire [40].

1.3.3 Le LXR

Le LXR (liver X receptor) fait aussi partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Tout comme les PPAR, pour activer l'expression génique, le LXR doit hétérodimériser avec le RXR pour lier son élément de réponse nucléaire. Le LXR répond à des niveaux cellulaires élevés en cholestérol en activant des gènes impliqués dans le transport du cholestérol (ABCA1, ABCG1, ABCG5/G8), dans l'efflux du cholestérol et la synthèse des HDL (ABCA1, apo E, CETP), et le catabolisme des stérols (Cyp7a1). Le LXR peut aussi réguler les niveaux cellulaires de lipides par l'activation de SREBP-1c et être activé par des stérols oxydés [43, 44].

1.3.4 Les récepteurs nucléaires reliés aux acides biliaires

Les acides biliaires n'ont pas seulement comme fonction de faciliter l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. Il est maintenant établi qu'ils peuvent activer divers récepteurs nucléaires et différentes voies de signalisation. Leur principal récepteur nucléaire est le farnesoid X receptor (FXR) [45-48]. Ce récepteur agit comme facteur de transcription et est impliqué dans plusieurs voies métaboliques. Il contrôle l'expression génique de la Cyp7a1, en plus de réguler plusieurs gènes impliqués dans le transport,

la conjugaison et la détoxification des acides biliaires [49, 50]. Non moindre est le rôle du FXR dans le contrôle de l'homéostasie du glucose [51-53] et dans le métabolisme des lipoprotéines [54, 55], ce qui en fait une cible thérapeutique en vogue étant donné la prévalence grandissante du syndrome métabolique dans les sociétés industrialisées [56-58]. Le FXR serait aussi impliqué dans la régénération hépatique [59], dans la protection du foie, puisque les acides biliaires peuvent être toxiques en trop fortes concentrations [60-62], et dans la protection intestinale en contrôlant la croissance bactérienne [63]. Les acides biliaires ont aussi 3 autres récepteurs nucléaires avec lesquels ils peuvent interagir : le PXR (pregnane X receptor) [64, 65], le récepteur de la vitamine D [66] et le CAR (constitutive androstane receptor) [67, 68]. Les acides biliaires peuvent aussi activer les cascades de signalisation de la kinase c-Jun, de la MAP («mitogen activated protein») kinase et la protéine G TGR5 [55]. Par conséquent, les acides biliaires ont des fonctions similaires aux hormones, et doivent être considérés différemment qu'une simple voie d'excrétion du cholestérol, ou que des molécules favorisant seulement l'absorption et la digestion des lipides.

2- Hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie se caractérise par une concentration accrue de LDL-cholestérol (LDL-C) en circulation. La présence augmentée de LDL en circulation augmente le risque de déposition de graisses dans les tendons et la peau sous forme de xanthomes, ainsi que dans les artères (athéromes). Une quantité trop importante de dépôts graisseux entraîne une obstruction des vaisseaux sanguins et augmente les risques de troubles coronariens et de maladies cardiovasculaires (MCV). Une défaillance génétique et divers facteurs environnementaux (nutrition, sédentarité) peuvent entraîner une élévation des taux de cholestérol circulant.

2.1 Hypercholestérolémie autosomale dominante

L'hypercholestérolémie autosomale dominante (HAD) (OMIM #143890) réfère aux mutations provoquant une élévation de cholestérol circulant dans l'organisme. Cette maladie génétique ne se retrouve pas sur un chromosome sexuel et a besoin d'être présent seulement sur un seul allèle pour exprimer le phénotype.

Les premières associations entre les signes cliniques, xanthomes et athéromes furent évoquées au début du XX^e siècle. En 1967, Fredrickson proposa pour la première fois qu'un trouble dans le métabolisme des apos et du LDL pourrait être à l'origine de l'HAD [69]. Plusieurs années d'études plus tard, Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein ont identifié le LDLr et ont démontré que la première forme d'HAD impliquait une mutation dans le LDLr [16, 17]. Ces découvertes et les études sur la compréhension générale du métabolisme du cholestérol ont d'ailleurs valu à Brown et Goldstein le prix Nobel de Médecine en 1985.

2.1.1 Description clinique

La forme hétérozygote provoque l'apparition de dépôts graisseux vers l'âge de 40 ans, et a une prévalence d'une personne atteinte sur 500, ce qui en fait l'une des maladies génétiques les plus fréquentes. Les niveaux plasmatiques de cholestérol circulant sont deux fois plus élevés dès la naissance (350 à 550 mg/dL, ou 9 à 14 mmol/L). La forme homozygote frappe plus durement les personnes (1 sur 1 000 000) en provoquant l'apparition de xanthomes et d'athéromes lors des dix premières années de vie, avec des taux de cholestérol supérieurs à 500 mg/dL ou 13 mmol/L (voire jusqu'à 1000 mg/dL ou 25 mmol/L). La mort survient fréquemment avant l'âge de 20 ans des suites d'un infarctus du myocarde [70]. Les fréquences d'HAD peuvent être affectées par l'effet fondateur, comme par exemple au Québec où la fréquence d'homozygotes et d'hétérozygotes est plus élevée (1 par 100 000 et 1 par 150 respectivement) [71].

2.1.2 Gènes impliqués

Jusqu'à maintenant, des mutations dans 3 gènes peuvent provoquer l'apparition de l'HAD : le LDLr, l'apo B100 et la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9). La contribution de chaque gène à l'HAD reste difficile à déterminer, mais le gène du LDLr est de loin le principal responsable de l'HAD. Ce dernier serait responsable de 79% des cas d'HAD, 5,5% pour l'apo B et 1,5% pour la PCSK9 [72, 73]. Une équipe britannique a utilisé une technologie permettant d'étudier des mutations ponctuelles sur l'ADN génomique [74], et a mis au point un outil diagnostique pour détecter l'HAD à partir de mutations fréquentes [75]. Onze mutations dans le gène du LDLr, une dans celui de l'apo B et une pour la PCSK9 ont été sélectionnées [75].

2.1.2.1 Le LDLr

Jusqu'à maintenant, plus de 1000 mutations ont été répertoriées sur le gène du LDLr [76]. Plus de 90% des mutations retrouvées dans le LDLr seraient

des mutations ponctuelles [73]. La plupart d'entre elles sont présentes dans la partie codante du gène, et environ 20% se retrouvent sur le quatrième exon. Celui-ci constitue l'exon le plus grand et contient les régions critiques pour la liaison de son ligand. Cinq classes de mutations ont été déterminées selon les effets provoqués [70] :

1. Défaut de synthèse du récepteur, ou parfois absence de transcription du gène (mutation dans le promoteur).
2. Le transport du récepteur est bloqué entre le RE et le Golgi : forme la plus fréquente.
3. Le récepteur est transporté à la membrane, mais ne peut lier le LDL.
4. Le récepteur se lie au LDL, mais ne peut l'internaliser par endocytose : forme la plus rare.
5. Le LDL est internalisé avec son récepteur, mais celui-ci ne peut relâcher le LDL lors du passage du complexe dans l'endosome. Le LDLr ne peut retourner à la membrane.

L'HAD est couramment associé à l'hypercholestérolémie familiale (HF) puisque les mutations de l'apo B100 et de PCSK9 ont été découvertes plus récemment.

2.1.2.2 L'apo B100

Le second gène identifié comme responsable de l'HAD est l'apo B100 [77], le ligand présent sur le LDL pour permettre sa liaison au LDLr. Bien que ces mutations soient associées à un phénotype similaire à l'HF et non distincts cliniquement [78], l'appellation de « familial ligand-defective apolipoprotein B-100 », fut attribuée à ce trouble (OMIM # 144010). Jusqu'à maintenant, dix mutations ont été reliées à un défaut de liaison de l'apo B créant une hypercholestérolémie [73].

2.1.2.3 La PCSK9

Les premières évidences scientifiques d'un troisième locus impliqué dans l'HAD furent publiées en 1999. Une famille de 18 individus de l'Utah aux États-Unis a montré des caractéristiques similaires aux personnes atteintes d'HAD sans montrer de mutation dans le LDLr et l'apo B100 [79]. Une équipe française a identifié un intervalle de neuf centimorgan situé au locus 1p34.1-p32 comme étant responsable de l'HAD chez 13 familles présentant un phénotype d'HF sans qu'elles ne présentent de mutations reliées aux gènes LDLr ou l'apo B100 [80]. Une étude publiée l'année suivante sur la cohorte de l'Utah a corroboré les résultats du groupe français en localisant le gène responsable sur le chromosome 1p32 [81].

Quelques années plus tard, une publication dans *Nature Genetics* identifia le gène codant pour la PCSK9 comme étant le troisième locus responsable de l'HAD [82]. Les mutations dans les précédentes études étaient différentes entre les cohortes. Celles retrouvées en France correspondaient à des substitutions de la Ser¹²⁷ par une Arg (S127R) ou la F216L, tandis que la mutation retrouvée dans la cohorte de l'Utah était la D374Y [83] et a ensuite été retrouvée chez des sujets norvégiens [84]. Ces premières mutations ont toutes été associées à une hypercholestérolémie, étant donné leur caractère «gain de fonction».

Une étude subséquente a permis d'illustrer le caractère particulier de la PCSK9. Grâce à l'étude de patients possédant des faibles taux de LDL-C dans la cohorte multi-éthnique «Dallas Heart Study» en 2005, deux mutations non-sens ont été identifiées comme étant hypocholestérolémiantes en provoquant la troncation prématurée de la protéine par l'apparition d'un codon stop. Les mutations pertes de fonctions Y142X et C679X ont été détectées plus fréquemment chez les afro-américains que les caucasiens (2% vs 0,1%), et ont provoqué une réduction de 40% des LDL-C plasmatiques [85]. Puisque aucune mutation de PCSK9 n'est retrouvée chez

certaines populations [86, 87], il est fort probable qu'un lien existe entre l'ethnicité et la fréquence des mutations dans le gène de la PCSK9.

La PCSK9 peut provoquer une hausse ou une baisse du cholestérol total circulant selon la nature de la mutation. L'hypothèse voulant que la PCSK9 puisse être responsable de l'hypobêtalipoprotéïnémie familiale (OMIM %605019), une condition présentant une baisse des taux d'apo B et de LDL-C plasmatiques pouvant engendrer un foie gras lorsqu'aucune mutation n'est présente sur le gène de l'apo B, a été récemment soulevée [88].

Ainsi, des variations génétiques dans le gène de la PCSK9 peuvent engendrer des effets variables sur le métabolisme du cholestérol.

2.1.2.3.1 Mutations provoquant l'hypercholestérolémie

Différentes mutations de la PCSK9 provoquant l'HAD ont été identifiées dans diverses études à différents endroits (voir tableau I).

Une méta-analyse ayant pour objectif d'identifier de nouveaux SNP (single nucleotide polymorphism) associés à des variations dans les concentrations de lipides plasmatiques a permis la découverte d'une variante dans le promoteur de la PCSK9. Ce SNP a été relié à une légère augmentation du risque coronarien [89].

Bien que la mutation S127R provoque une réduction de la forme mature et sécrétée de la PCSK9 [90-92], elle présente tout de même le phénotype d'hypercholestérolémie [80, 82, 93]. Il est donc fort probable que cette mutation confère un gain de fonction important à la PCSK9, et que le même phénomène se produise pour D129G [94].

Tableau I. Liste des mutations de la PCSK9 provoquant l'hypercholestérolémie.

| Mutations | Domaine protéique | Origine | Effets connus sur la PCSK9 | Références |
|-----------|-------------------|--------------------------------------|---|----------------------|
| S127R | Prodomaine | France, Afrique du Sud | Réduction de la maturation et de la sécrétion; diminution accrue du LDLr | [80, 82, 93] |
| D129G | Prodomaine | Nouvelle-Zélande | Réduction de la maturation et de la sécrétion; diminution accrue du LDLr | [93] |
| R215H | Catalytique | Norvège | - | [95] |
| F216L | Catalytique | France | Dégradation par la furine et PC5/6A réduite | [80, 82] |
| R218S | Catalytique | France | Possible destruction du lien hydrogène nécessaire à la triade catalytique | [96] |
| R357H | Catalytique | France | Arg357 est située à côté de Cys358 impliqué dans un pont disulfure | [96] |
| D374Y | Catalytique | États-Unis, Norvège, Grande-Bretagne | Dégradation par la furine et PC5/6A réduite; affinité accrue pour le LDLr | [81, 83, 84, 97, 98] |
| D374H | Catalytique | Portugal | Possiblement similaire à D374Y | [99] |
| R469W | C-terminal | Cameroun | - | [96] |
| F515L | C-terminal | États-Unis | - | [100] |
| H553R | C-terminal | États-Unis | - | [100] |
| E670G | C-terminal | États-Unis, Allemagne | - | [101, 102] |

Il faut noter que l'association de la mutation E670G aux niveaux plus élevés de LDL-C circulant ne se retrouve que chez les hommes, car aucune corrélation n'a été observée chez les femmes dans une étude allemande [102]. Une étude réalisée dans une cohorte belge a montré un risque accru d'accident vasculaire-cérébral chez les porteurs de E670G et ce, indépendamment du sexe [103].

Étant donné que plus d'un gène peut provoquer l'HAD, il est possible qu'un patient présente une hypercholestérolémie explicable par des mutations sur deux gènes. Ces personnes hétérozygotes ayant deux mutations différentes ont un phénotype clinique plus sévère que les hétérozygotes, mais moins grave que les homozygotes [104]. L'effet additif de la mutation R469W sur la PCSK9 avec une mutation dans le LDLr (délétion d'un nucléotide provoquant l'apparition d'un codon stop) a d'ailleurs été rapporté [96]. La combinaison de mutations de la PCSK9 non responsable de l'HAD seule, mais en association avec une mutation non-sens dans le LDLr, provoque aussi un phénotype plus grave que la simple présence du défaut du gène de LDLr. Par exemple, les deux mutations R496W et N425S de la PCSK9 ont été répertoriées seulement dans une étude en association avec une mutation dans le LDLr (E228K et Y419X respectivement dans le LDLr) [105], tout comme pour A168E observée seulement en Nouvelle-Zélande (associée à un haplotype commun d'une famille possédant une hypercholestérolémie) [93].

La fréquence des mutations gain de fonction de la PCSK9 serait de 1 cas sur 50 d'HAD [95].

2.1.2.3.2 Mutations causant l'hypocholestérolémie

De nombreuses études ont répertorié plusieurs mutations caractérisées par une perte de fonction menant à une hypocholestérolémie marquée (voir tableau II). La diminution des LDL-C circulants varie selon la mutation, mais peut atteindre une chute de 30 à 40% pour les mutations Y142X et C679X [106].

Tableau II. Liste des mutations de la PCSK9 causant l'hypocholestérolémie.

| Mutations | Domaine protéique | Origines | Effets connus sur la PCSK9 | Références |
|------------------------------|-------------------|--|---|-------------------------|
| C(-161)T | <i>Intron</i> | Japon | - | [111] |
| c.43_44insCTG | Prodomaine | États-Unis | Insertion d'une Leu dans une séquence de 9 Leu | [112] |
| R46L | Prodomaine | États-Unis, Italie, Norvège, Grande-Bretagne, Pologne, Écosse/ Irlande/ Pays-Bas | Défaut possiblement impliqué dans l'interaction du prodomaine et du domaine catalytique suite à l'autoclivage | [100, 113-119] |
| c.202delG (délétion d'un AA) | Prodomaine | Italie | Délétion d'un acide aminé déplaçant le cadre de lecture et provoquant l'apparition prématurée d'un codon stop | [113] |
| R93C | Prodomaine | Japon | Missense | [120] |
| G106R | Prodomaine | Norvège | - | [115] |
| Y142X | Prodomaine | États-Unis | Troncation du ¼ de la protéine | [85, 100, 114, 119] |
| N157K | Catalytique | Norvège | Renverserait l'effet de D374Y | [115] |
| G236S | Catalytique | Norvège | Protéine séquestrée dans le RE | [95] |
| R237W | Catalytique | Norvège | Hausse d'activité de LDLr | [115] |
| L253F | Catalytique | États-Unis | Diminution de l'autoclivage et de la sécrétion | [100] |
| N354I | Catalytique | Norvège | Ne peut procéder à son autoclivage catalytique, mauvais repliement de son domaine catalytique | [95] |
| A443T | Catalytique | États-Unis, Italie | Hausse de la dégradation par la furine | [100, 113] |
| I474V | C-terminal | Japon | - | [111] |
| C679X | C-terminal | États-Unis, Zimbabwe, Afrique de l'ouest | Perte de 14 acides aminés; demeure séquestrée dans le RE | [85, 87, 114, 119, 121] |

Une nouvelle mutation responsable d'une délétion de 58 AA dans l'exon 8, située dans le domaine catalytique de la PCSK9, a été identifiée chez l'humain. Cette forme mutante a été retrouvée dans divers tissus (le foie, le tissu adipeux, le cerveau, le cœur, les reins, la prostate et l'intestin), et ce à des niveaux très inférieurs à la PCSK9 de type sauvage [107]. Selon l'étude, l'effet de cette mutation devrait provoquer une diminution du cholestérol circulant étant donné l'effet de cette mutation sur le LDLr.

La présence de mutations provoquant l'hypocholestérolémie de la PCSK9 a montré une diminution du risque de MCV plus importante que des patients ayant atteint les mêmes niveaux de cholestérol plasmatique par la prise de statines [108]. Ces résultats suggèrent que non seulement une faible concentration de cholestérol influence les MCV, mais aussi la durée pendant laquelle les niveaux de cholestérol circulant sont faibles [109]. Ainsi, les porteurs de mutations hypocholestérolémiantes sont mieux protégés des MCV étant donné la durée prolongée de leur hypocholestérolémie. Ce qui pourrait suggérer qu'une intervention clinique visant à réduire la cholestérolémie sanguine précocement pourrait ralentir le développement de l'athérosclérose [110].

2.1.2.4 Autres gènes

Il est possible que certaines mutations provoquant l'HAD dans les 3 gènes discutés précédemment restent à être découvertes. Cependant, il n'en demeure pas moins fort probable que de nouveaux loci soient impliqués dans l'HAD. Plusieurs patients présentant un phénotype d'HF, et ne possédant aucune mutation connue dans le LDLr, l'apo B100 et la PCSK9 ont été identifiés [72, 122, 123].

2.2 Hypercholestérolémie autosomale récessive

Une forme d'hypercholestérolémie provoquant des niveaux circulants de LDL-C intermédiaires entre les patients atteints d'HF homozygote et hétérozygote a été décrite : l'hypercholestérolémie autosomale récessive (HAR) (OMIM # 603813) [124]. Six mutations dans le gène codant pour l'ARH, une protéine adaptatrice dans la liaison du LDLr à la clathrine pour permettre son endocytose, ont été décrites en 2001 [26]. Jusqu'à présent, huit mutations différentes ont été répertoriées [125]. L'utilisation de lymphocytes de patients atteints a permis de montrer que le défaut n'altérait pas la liaison du LDL à son récepteur, mais plutôt l'internalisation du complexe [126]. La découverte de cette condition aura aussi permis de faire grandement avancer la compréhension du mécanisme d'endocytose du LDLr [127].

3- Description biochimique de la PCSK9

Les proprotéines convertases (PC) sont une famille d'enzymes sécrétées, ayant comme fonction d'activer des propeptides (hormones, facteurs de croissance, toxines bactériennes, glycoprotéines virales) en leur forme active. Elles sont pressenties pour avoir un rôle dans une foule de pathologies majeures comme le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer et les dislipidémies [128-130].

Les membres de cette famille se distinguent par leur site de clivage pour activer les propeptides. Les sept premiers membres identifiés des PC clivent à une séquence consensus d'AA basiques : (K, R)-(X)_n-(K, R)↓ (où n = 0, 2, 4 ou 6) [131]. Le huitième membre, S1P, impliqué dans le métabolisme du cholestérol, cible quant à lui une région non-basique : (R/K)-X-X-(L,T)↓. La PCSK9 correspond au neuvième membre de la famille des PC et, tout comme S1P, elle cible un site non-basique : (Y, I)-V-V(V, L)(L,M)↓(K,E)E. Les PC possèdent une homologie de leur domaine catalytique avec la protéase à sérine bactérienne subtilisine et appartiennent à la sous-famille de protéases de levures kexine. PCSK9 s'apparente à la sous-famille de la protéinase K des subtilases étant donné son homologie du site catalytique de 42% avec cette enzyme [132].

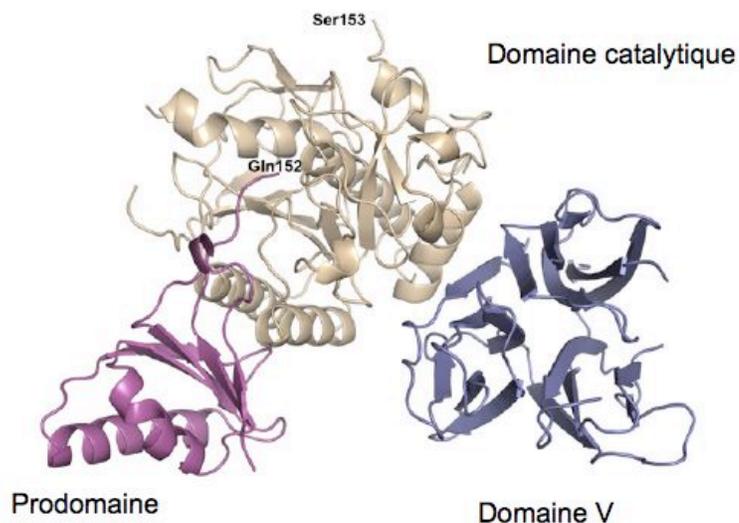
La PCSK9 se retrouve majoritairement dans le foie et l'intestin, et en moindre quantité dans les reins, les poumons, la rate et le thymus [132].

3.1 Domaines de la PCSK9

La PCSK9 possède quatre domaines. Les 30 premiers résidus du côté N-terminal constituent la séquence du peptide signal. Ensuite, le prodomaine est situé dans l'intervalle des résidus 31 à 152. Le domaine catalytique se

situe entre les AA 153 à 452. La dernière portion, le domaine V, se situe des AA 453 à 692 (voir figure 10).

Figure 10. Structures secondaires de la PCSK9.



Violet : prodomaine; doré : domaine catalytique; bleu : domaine V.

Adapté de [133].

Le prodomaine contient deux hélices α et quatre feuillets β antiparallèles, et ce sont ces derniers qui font l'interface avec le domaine catalytique [133]. Les quatre derniers AA du prodomaine forment un feuillet β recouvrant le domaine catalytique qui inhibe ce dernier. La Gln¹⁵² forme un lien hydrogène avec l'His²²⁶ et vient occuper le trou de l'oxyanion du domaine catalytique formé entre la Ser³⁸⁶ et l'Asn³¹⁷. Suite à l'autoclivage, la Gln¹⁵² demeure dans le trou de l'oxyanion et empêche l'accès à d'autres protéines par sa présence dans le sillon catalytique [134]. La présence d'une boucle contenant plusieurs résidus basiques permet aux PC classiques d'effectuer un second clivage dans leur prodomaine pour activer leur activité enzymatique [135]. Toutefois, la présence de trois résidus neutres dans la PCSK9 dans cette même boucle l'empêcherait d'effectuer une deuxième coupure. Même l'apparition de la mutation S127R dans ce site ne provoque pas de coupure [91].

La portion catalytique de la PCSK9 possède deux hélices α qui interagissent avec le prodomaine. Le cœur de ce domaine est formé par sept feuilletts β parallèles, entourés d'hélices α , ce qui correspond à la structure standard du domaine catalytique des protéases à sérine de la famille des subtilisines [136]. De plus, trois ponts disulfures se retrouvent dans la PCSK9. La triade catalytique est formée par l'Asp¹⁸⁶, l'His²²⁶ et la Ser³⁸⁶ [133] et elle correspond à une triade catalytique classique d'une protéase à sérine. Le site de liaison du site catalytique est formé principalement par des AA neutres, contrairement aux autres PC qui ont plutôt des résidus chargés négativement, ce qui pourrait expliquer la différence dans la spécificité des substrats [134]. Une très grande similarité est observée entre le domaine catalytique des formes de l'humain, de la souris et du rat [132]. La présence de la Leu²⁵³ serait primordiale pour permettre au domaine catalytique d'effectuer son autoclivage, étant donné sa proximité (quatre angstroms) de l'Asp de la triade catalytique [137].

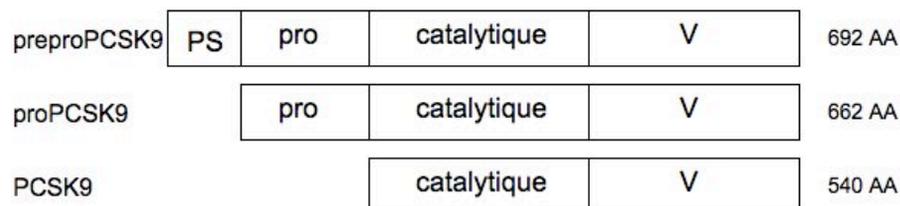
La séquence finale des résidus 453 à 692 constitue le domaine V. Celui-ci est formé par trois sous-domaines contenant chacun trois ponts disulfures. La présence d'une grande quantité de résidus histidines dans cette portion permet des interactions protéines-protéines dépendantes du pH [133]. Ce domaine V, quoique différent de par sa structure, aurait un rôle analogue au domaine P des autres PC. Ce domaine P, pour «processing», est une séquence commune aux PC et aurait comme fonction de participer au bon repliement de la protéine [138]. Le domaine V contient environ 90 AA de plus que les domaines P des autres PC, et ne contient pas d'hélices α . Le domaine V contient aussi plus de résidus cystéines [133]. Le seul site de N-glycosylation de la PCSK9 se situerait sur l'Asn⁵³³ [132]. Cette structure de domaine C-terminale ne ressemble qu'à un nombre très restreint de protéines, dont la résistine, qui a récemment été associée au diabète de type 2 et à la résistance à l'insuline. Certains auteurs suggèrent que la PCSK9 et la résistine proviendraient d'un gène commun ancestral [139]. Le bon

repliement de la portion C-terminale de la PCSK9 est cruciale pour la sécrétion de la protéine, et la perte de la Cys⁶⁷⁹ pourrait provoquer le mauvais repliement de la protéine car un pont disulfure ne pourrait plus se former [140].

3.2 Synthèse de la PCSK9

La PCSK9 sécrétée est une protéine formée par 692 acides aminés. Son gène est formé de 12 exons et se situe sur le chromosome 1 (1p32.3) [GenelD : 255738; NM_174936]. La PCSK9 est d'abord synthétisée sous la forme d'un zymogène soluble de 72 kDa qui subira un autoclivage catalytique (voir figure 11).

Figure 11. Maturation de la PCSK9.



PS : peptide signal; pro : prodomaine; catalytique : domaine catalytique; V : domaine V.

Cet autoclivage se déroule dans le RE, et le pro-segment demeure accroché à la protéine. Le pro-segment permet initialement le bon repliement de la protéine et de son domaine catalytique. La portion protéase à sérine de PCSK9 ne servirait qu'à s'autocliner pour permettre son relargage dans le milieu (ou sécrétion) puisque son prodomaine reste lié de façon covalente à la protéine dans son site catalytique, ce qui l'empêche probablement de lier une protéine exogène dans son site actif. Le clivage du pro-segment de la PCSK9 dans le RE serait un processus indépendant du calcium, contrairement aux huit autres PC qui le nécessitent [90]. La coupure survient entre les résidus Gln¹⁵² et Ser¹⁵³, et ce processus est intramoléculaire

seulement, et non intermoléculaire comme c'est parfois le cas avec les enzymes de la famille des subtilases [141].

La PCSK9, une fois sécrétée, se retrouve dans la circulation sanguine où elle est mesurable. Les niveaux de la PCSK9 mesurés par ÉLISA dans le plasma varient selon les études et le type d'anticorps utilisé. Les valeurs détectées oscillent entre 50 et 600 ng/mL [142], 11 et 115 ng/mL [143], 420 et 13 390 ng/mL [144], 100 et 9300 ng/mL [145] chez l'humain.

La production endogène de la PCSK9 dans les cellules hépatiques en culture HepG2 a montré que la quantité de la PCSK9 dans la cellule une heure post-synthèse représente exclusivement la forme mature qui commence aussi à se retrouver dans le milieu. À quatre heures, toute la PCSK9 synthétisée a été sécrétée [142]. Une fois dans la circulation sanguine, la PCSK9 aurait une demi-vie de cinq à 15 minutes [146, 147].

3.3 Modifications post-traductionnelles de la PCSK9

Suite à l'autoclivage, la protéine intracellulaire a une masse d'environ 63 kDa, et sera sécrétée à 65 kDa. Une mutagenèse dirigée sur l'Asn⁵³³ (N533A) a montré que la N-glycosylation n'est pas la modification post-traductionnelle requise pour l'autoclivage et la sécrétion de la protéine [132]. Les tyrosines 38 et 142 sont des sites de sulfatation dans le réseau trans-golgien [90, 148]. De plus, une phosphorylation survient sur les résidus Ser⁴⁷ dans le propeptide et sur la Ser⁶⁸⁸ dans le domaine riche en cystéine / histidine (CHRD). La phosphorylation dans le propeptide (Ser⁴⁷) est cellule-spécifique [148]. Ce site de phosphorylation pourrait être critique puisque les mutants R46L ont moins de PCSK9 en circulation [144]. La sulfatation et la phosphorylation de la PCSK9 seraient les modifications post-traductionnelles qui expliqueraient la hausse de la masse de 2 kDa.

En 2006, Benjannet a démontré que les PC furine et PC5/6 peuvent cliver la PCSK9 au site Arg²¹⁸ et ainsi provoquer la sécrétion d'une forme de la PCSK9 incapable de stimuler la dégradation du LDLr. Il semble que cette forme tronquée ne puisse rejoindre les endosomes [140].

3.4 Activité enzymatique de la PCSK9

Pour l'instant, aucun substrat autre qu'elle-même n'a été identifié pour l'activité protéase à sérine de la PCSK9. Son activité enzymatique est optimale à des pH basiques entre 8 et 11 et à une température de 37°C. Une première étude a proposé en 2003 que le fonctionnement de la protéase soit indépendante du calcium [141]. Cependant, quelques mois plus tard, une autre équipe a démontré que l'activité enzymatique de la PCSK9 serait dépendante du calcium [132], étant donné son altération en présence du chélateur d'ions Ca²⁺ EGTA. L'Asp³⁵⁹, la Pro³³⁰ et la Val³³² permettraient la liaison à l'ion Ca²⁺ [141]. La présence ou l'absence des ions Mg²⁺, Mn²⁺ ou Zn²⁺ ne semble pas modifier le fonctionnement de l'enzyme, tout comme le NaCl. Le chélateur d'ions métalliques EDTA, l'inhibiteur d'aminopeptidase bestatine et l'inhibiteur de protéases à cystéine E64 n'altèrent pas son fonctionnement. Cependant, des inhibiteurs de protéases à sérine (fluorure de phénylméthylsulfonyle et chymostatine) ont montré des inhibitions de 100% et 85%, respectivement [141].

4- Rôle et fonctionnement de la PCSK9

Étant donné le lien entre l'HAD et la PCSK9, les premières études sur la fonction de la PCSK9 ont été ciblées vers le métabolisme des lipides.

4.1 Rôle de la PCSK9 dans le métabolisme lipidique

Au même moment où l'on commence à associer la PCSK9 à l'HAD, diverses études, ayant pour but d'identifier des nouvelles cibles de SREBP, ont fait ressortir la relation entre la PCSK9 et le métabolisme des lipides. En 2003, deux publications identifièrent la PCSK9 comme une protéine impliquée dans le métabolisme du cholestérol grâce à la technologie des micropuces. Une équipe de l'Université Rockefeller à New York a utilisé l'ARN de foie de souris soumises à une diète riche en cholestérol pour identifier de nouveaux gènes régulés par cette condition. La PCSK9 est alors apparue comme faisant partie des 37 gènes modulés. De plus, la surexpression de SREBP-1a et SREBP-2 a produit une augmentation hépatique de l'expression génique de la PCSK9 [149]. Dans le laboratoire de l'Université Texas Southwestern, le groupe des prix Nobels Brown et Goldstein ont étudié, eux aussi par micropuces sur des ARN hépatiques, des modèles murins surexprimant les formes N-terminales de SREBP-1a et de SREBP-2, et des souris SCAP $-/-$. Ils ont montré une activation de la PCSK9 pour les souris transgéniques et une baisse pour les souris déficientes en SCAP [150]. Ces résultats, combinés aux études populationnelles impliquant la PCSK9 comme troisième gène de l'HAD, ont incité les groupes de recherche à tenter de comprendre le rôle et le mécanisme par lesquels la PCSK9 influence le métabolisme du cholestérol.

4.1.1 Effets sur la cholestérolémie par la dégradation du LDLr

Les premières études pour comprendre le rôle de la PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol ont été réalisées dans les mêmes laboratoires

oeuvrant sur les micropuces. L'équipe du Dr. Breslow à New York a surexprimé la PCSK9 dans des souris C57BL/6 grâce à des adénovirus injectés. Les résultats ont indiqué une hausse de LDL-C plasmatique coïncidant avec une diminution hépatique du LDLr protéique, sans modification de son expression génique. La surexpression de la PCSK9 dans la lignée cellulaire hépatique de rat McArdle-RH7777 a confirmé l'effet de la dégradation protéique du LDLr, ainsi que de la diminution de la liaison du LDL à son récepteur [151]. Le groupe du Texas a confirmé, quelques mois plus tard, l'effet post-transcriptionnel de la PCSK9 sur le LDLr hépatique par la surexpression de la forme humaine de PCSK9 dans la même souche de souris, en plus de constater la même hausse de LDL-C [152]. Une troisième étude de surexpression de la PCSK9 par la même méthode (adénovirus chez des souris C57BL/6) a montré une hausse de cholestérol total et de LDL-C plasmatiques [153]. L'étude du LDLr a montré une diminution protéique ainsi qu'une diminution de son activité dans le foie. L'utilisation des cellules d'hépatomes humains HuH7 surexprimant ou inhibant la PCSK9 a confirmé les effets sur la protéine et l'activité de liaison du LDL au LDLr [153]. Ces résultats sur la cholestérolémie circulante ont été confirmés dans deux autres études de surexpression de la PCSK9 chez la souris [90, 154].

Le groupe du Texas a produit la première étude animale où la PCSK9 était absente. L'inhibition totale de la PCSK9 dans le génome des souris a entraîné une baisse de 48% du cholestérol total circulant, des LDL-C et des HDL, sans changement dans les niveaux de TG [155]. Les études de surexpression n'ont toutefois pas observé de changement dans les HDL [151, 153]. Une hausse de près du triple des niveaux protéiques du LDLr hépatique a été remarquée, sans altération de son expression génique. Le contenu protéique hépatique de l'ARH, SREBP-1 et SREBP-2, le VLDLr et le SR-BI chez la souris PCSK9 $-/-$ n'a pas été altéré. Le SR-BI n'avait pas été affecté aussi par la surexpression du PCSK9 [153].

La production d'une souris déficiente en PCSK9 spécifique au foie a provoqué une chute de 27% du cholestérol plasmatique, comparativement à une diminution de 42% pour la souris PCSK9 avec une invalidation totale, suggérant que la PCSK9 hépatique est responsable du 2/3 du phénotype [156], et que d'autres tissus peuvent être impliqués. La présence de la PCSK9 hépatique serait toutefois primordiale dans le contrôle des LDLr des tissus extra-hépatiques puisque son absence exclusive au foie n'a pas modulé les LDLr des autres tissus [156]. Par contre, Schmidt a montré que la surexpression spécifique au foie peut provoquer une baisse des LDLr dans les poumons, les reins et l'iléon [147]. De plus, la diminution observée des LDLr dans les glandes surrénales (ayant très peu de PCSK9 endogène) suite à la surexpression de la PCSK9, suggère que la surproduction hépatique en est responsable [152].

Étant donné que la PCSK9 est présente dans le sang, une étude a montré que son ajout dans la circulation sanguine de souris provoque une hausse du LDL-C, en plus d'engendrer la dégradation des LDLr hépatiques, rénaux, pulmonaires et même au niveau du tissu adipeux [147]. Néanmoins, la PCSK9 circulante aurait comme lieu de synthèse principal les hépatocytes puisque l'inhibition totale et spécifique au foie de la PCSK9 chez des souris a provoqué une disparition de la PCSK9 plasmatique [156]. Il a aussi été montré dans une étude que les taux de la PCSK9 dans le plasma corrèle avec les concentrations sériques de cholestérol total et LDL-C circulant seulement chez les hommes [144], et dans les deux sexes dans une seconde étude [143]. Puisque le concept de la dégradation post-transcriptionnelle du LDLr par la PCSK9 était de plus en plus confirmé, les études voulant comprendre le mécanisme d'action ont été de plus en plus nombreuses.

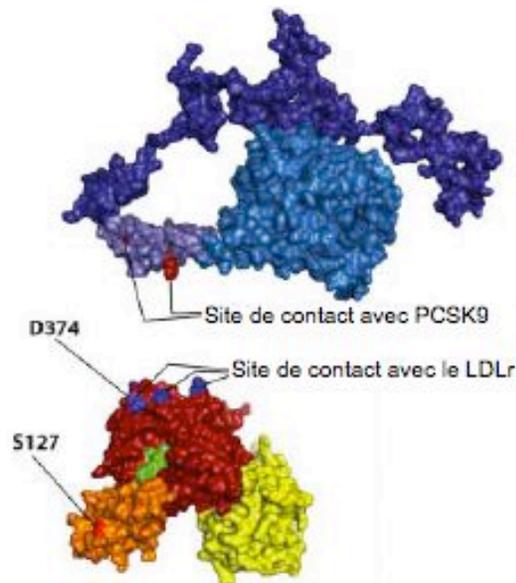
4.1.1.1 Liaison de la PCSK9 au LDLr

Pour promouvoir la dégradation du LDLr, la PCSK9 doit entrer en contact directement avec le récepteur ou agir via une protéine intermédiaire. Cette

dernière hypothèse fut soulevée en 2006 [91], toutefois ce même groupe norvégien a démontré qu'il n'y a pas de protéines intermédiaires, et que la PCSK9 agirait directement sur le LDLr [157]. La liaison de PCSK9 a lieu spécifiquement sur le domaine extracellulaire du LDLr [158].

Cette liaison est dépendante de la présence de la séquence EGF-A (EGF-like repeat A), car l'ajout de cette séquence permet la liaison à des récepteurs qu'elle était incapable de lier précédemment [159]. De plus, l'utilisation d'un peptide EGF-A a inhibé la dégradation du LDLr par la PCSK9, ceci ayant pour effet d'augmenter la captation de LDL radiomarqué [160] (voir figure 12).

Figure 12. Liaison de la PCSK9 au LDLr.



Violet foncé : Domaine de liaison au LDL; violet pâle : séquence EGF; orange et vert : prodomaine; rouge : domaine catalytique; jaune : domaine V.

Adapté de [161].

Cette liaison de la PCSK9 à l'EGF-A du LDLr serait dépendante du calcium [159]. Le domaine EGF-A est primordial pour le fonctionnement du LDLr car il participe à son recyclage et à sa stabilité [162].

Une compétition de liaison entre la PCSK9 et les lipoprotéines pour le LDLr serait possible, mais aucun consensus n'est encore établi étant donné la présence de résultats contradictoires [159, 163, 164].

4.1.1.2 La dégradation du LDLr survient dans une organelle à pH acide

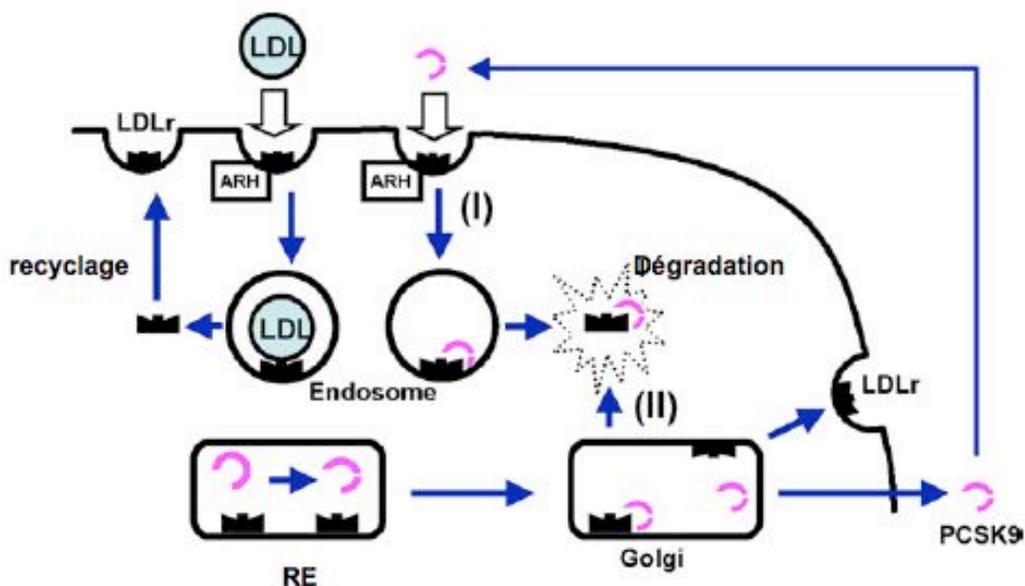
L'effet de la PCSK9 sur le LDLr a été rapidement identifié comme une dégradation accrue du récepteur dans un compartiment post-RE, comme les endosomes ou lysosomes, mais indépendant du protéasome [90, 165]. Plusieurs études ont confirmé par la suite l'implication d'une organelle à pH acide dans la dégradation du LDLr [140, 142, 157]. La présence d'une grande quantité de résidus histidines dans cette portion permet des interactions protéines-protéines dépendantes du pH qui feraient en sorte que l'association LDLr-PCSK9 serait plus forte à des pH acides, comme ceux retrouvés dans les endosomes [133].

Ainsi, l'affinité plus grande à pH acide de la PCSK9 pour le LDLr préviendrait son recyclage vers la surface entamé dans les endosomes, et provoquerait plutôt son envoi vers les lysosomes pour sa dégradation [134, 159, 164, 166]. Ce serait le LDLr qui dirigerait le «trafic» intracellulaire de la PCSK9 [167]. Le transport de la PCSK9 vers les endosomes et lysosomes serait indépendant de la N-glycosylation sur l'Asn⁵³³, mais dépendrait du CHR1 du prodomaine [167].

La localisation de la PCSK9 et du LDLr dans les endosomes et lysosomes débute 15 minutes après le début de l'internalisation du LDLr et devient très évidente à 30 minutes [168]. Ce qui explique la dégradation en 20 minutes du LDLr des cellules HepG2 ayant reçu de la PCSK9 exogène [91].

La PCSK9 pourrait dégrader le LDLr par 2 voies distinctes [142, 167], selon son origine (voir figure 13).

Figure 13. Les 2 voies de dégradation du LDLr par la PCSK9.



ARH : protéine adaptatrice du LDLR; LDL : lipoprotéine de faible densité; LDLr : récepteur du LDL; PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine / kexine type 9; RE : réticulum endoplasmique.

Traduit de [169].

La PCSK9 endogène agirait de façon intracellulaire directement à partir du réseau trans-golgien et n'impliquerait pas les mécanismes d'endocytose dépendant de la clathrine et de l'ARH [152, 157, 167]. La PCSK9 exogène aurait besoin quant à elle, d'être endocytée pour promouvoir la dégradation du LDLr dans les mêmes organelles [91, 142, 158, 166, 167]. Pour faciliter son captage lors du processus d'endocytose, la PCSK9 formerait des multimères avec elle-même à la surface de la cellule pour faciliter sa captation par la cellule et ce, *in vitro* et *in vivo*. La présence de plusieurs complexes PCSK9-LDLr-LDL lors de l'internalisation pourrait faciliter la dégradation des complexes dans les lysosomes [163].

Contrairement aux premières suggestions [152, 165], la présence de l'activité catalytique de la PCSK9 n'est pas requise pour promouvoir la dégradation du

LDLr *in vitro* et *in vivo* [146, 147, 170, 171]. De plus, la liaison entre la PCSK9 et le LDLr se situe loin du domaine catalytique de la protéase [162].

4.1.1.3 Effet cellule-spécifique de la PCSK9 sur le LDLr

Certains types cellulaires n'ont pas montré d'effets de la PCSK9 sur le LDLr similaires à ceux observés dans les animaux ou les cellules hépatiques [92, 142, 152, 172, 173]. Ce phénomène s'expliquerait probablement par le manque de certaines protéines cytosoliques ou trans-membranaires pour permettre l'interaction LDLr /PCSK9 et la dégradation du LDLr [146, 157], ou par le fait que le mode d'internalisation des LDLr diffère dans ces types cellulaires [110].

4.1.1.4 Mutations et dégradation du LDLr

Des cellules surexprimant des formes mutantes de la PCSK9 ont montré des localisations cellulaires en accord avec le phénotype. Dans les cellules mutantes montrant une hypercholestérolémie (S127R, F216L et R218), la PCSK9 se localise dans les endosomes tardifs, tandis que les mutations hypocholestérolémiantes (G106R, L253F, Q554E et C679X) obligent la PCSK9 à rester dans le RE [167]. De plus, l'ajout de la PCSK9 exogène mutée a montré une diminution du captage et de l'internalisation de LDL pour les mutants S127R et D374Y, tandis que R46L a provoqué une hausse de la captation et de l'internalisation des LDL [164]. Ces études *in vitro* permettent de suggérer une explication moléculaire propre au phénotype retrouvé chez certaines personnes atteintes de l'HAD attribuable à de mutations de la PCSK9.

4.1.2 Effets sur l'apo B

Aucun consensus ne semble encore établi quant au rôle de la PCSK9 dans la production d'apo B. Certains travaux semblent indiquer que la PCSK9 modulerait les taux de LDL-cholestérol en affectant le taux de sécrétion d'apo B100 de manière indépendante du LDLr et ce, *in vivo* et chez des porteurs de

mutations hypercholestérolémiantes [90, 97, 101, 174]. Une étude *in vitro* a permis d'observer une augmentation d'apo B sans obtenir une hausse dans sa synthèse. Les auteurs ont proposé que la PCSK9 serait impliquée dans son mécanisme de dégradation [173].

L'utilisation de la souris PCSK9 KO totale a quant à elle montré une baisse d'apo B qui pourrait être liée simplement à la diminution des LDL-C observée [155], ou elle pourrait être causée par une dégradation plus rapide de l'apo B via le LDLr [175].

L'étude de patients hypocholestérolémiques [100] et de modèles *in vivo* et *in vitro* [152, 153] n'a pas permis d'établir d'association entre les niveaux d'apo B circulants et de la PCSK9. La plus récente étude s'étant intéressée à la question suggère que la PCSK9 n'altère pas la synthèse de l'apo B [156]. La souris double KO (LDLr et PCSK9) n'a pas montré d'effet supplémentaire sur le cholestérol circulant, suggérant que l'effet de la PCSK9 serait exclusif au LDLr et n'affecterait pas directement la synthèse de l'apo B et son relargage dans le sang [156, 168].

4.1.3 Effets sur le VLDLr et l'apo ER2

La PCSK9 n'a pas démontré d'effets sur le récepteur LRP-1 [90, 152] qui appartient à la même famille du LDLr. Cependant, deux membres plus similaires au LDLr de par leur structure, soient le VLDLr et apo ER2, seraient des cibles de la PCSK9. La PCSK9 endogène ou exogène peut promouvoir leur dégradation indépendamment de la présence du LDLr. La dégradation du VLDLr et de l'apo ER2 dépendrait de la protéine adaptatrice Dab1 qui permet leur endocytose [176]. La dégradation du VLDLr et de l'apo ER2 serait cellule-spécifique, tout comme pour le LDLr, et nécessiterait Dab1 plutôt que l'ARH [176]. Une étude récente a d'ailleurs confirmé les effets de la PCSK9 sur le VLDLr et l'apo ER2 [160] préalablement démontrés par le groupe du Dr Seidah [176].

4.1.4 PCSK9 comme cible thérapeutique

La présence de mutations hypocholestérolémiantes chez des patients et le développement de souris déficientes en PCSK9 n'ont pas montré d'évidences jusqu'à maintenant quant aux effets délétères engendrés par la perte de fonction de la PCSK9 [110, 161, 169], bien que des rôles supplémentaires soient envisageables (voir section 4.2).

La découverte de l'activation de la PCSK9 par les traitements visant à diminuer les taux de LDL-C a grandement stimulé la recherche pour trouver un composé permettant d'inhiber la PCSK9 afin d'augmenter l'efficacité pharmacologique des traitements actuels [177-179]. Certaines études ont déjà montré que la réponse aux statines de certains patients avec des mutations dans la PCSK9 est affectée [95, 115], et l'inhibition complète de la PCSK9 dans des souris a aussi montré l'effet supérieur des statines sur le profil lipidique [155].

Diverses approches sont envisageables pour l'inhibition de la PCSK9. Par exemple, la voie de maturation dans le RE pourrait être bloquée pour éviter l'autoclivage de la protéase et enrayer sa sécrétion [170, 171]. L'inhibition spécifique de la PCSK9 par un traitement pharmacologique, comme l'ajout de fibrates pour augmenter sa dégradation par la furine et PC5A/6 serait possible [180]. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique antisens de seconde génération dirigé contre la PCSK9 chez des souris nourries avec une diète riche en gras, a montré une baisse du cholestérol total et du LDL-C ainsi qu'une augmentation des niveaux de LDLr hépatiques sans pour autant causer de dommages aux souris [181]. Ce genre d'inhibition pharmacologique est sécuritaire et a déjà montré des résultats positifs chez l'humain [182, 183]. L'approche des petits ARN d'interférence visant à dégrader l'ARNm de la PCSK9 a aussi montré des résultats prometteurs *in vivo* [184]. Finalement, un anticorps visant à bloquer l'interaction protéine-protéine entre la PCSK9 et le LDLr pourrait être élaboré [161, 169]. La

découverte de l'augmentation de la captation de LDL par l'inhibition de la liaison au domaine EGF-A du LDLr par la PCSK9 va d'ailleurs dans cette direction [160].

L'inhibition de la PCSK9 pourrait aussi conférer une protection contre le développement d'une stéatose hépatique [156]. Son implication possible dans le métabolisme des VLDL et de l'apo B pourrait suggérer une amélioration du syndrome métabolique par l'inhibition de la PCSK9 [185].

4.2 Autres rôles possibles de la PCSK9

Puisque la PCSK9, tout comme le LDLr, est sous le contrôle de SREBP, elle pourrait servir de frein pour éviter une trop grande accumulation de cholestérol dans les cellules en régulant le LDLr [152, 186]. Elle pourrait aussi être impliquée dans divers processus indépendants du métabolisme du cholestérol.

4.2.1 Différenciation cellulaire

Le degré d'expression de la PCSK9 varie selon les tissus et leur développement. Le profil d'expression de la PCSK9 a été étudié chez des rats, et des différences importantes ont été remarquées. Des variations d'expression selon le stade de développement embryonnaire et la maturation des tissus ont été constatées [132]. La présence de la PCSK9 a été aussi remarquée fortement dans les cellules intestinales de carcinome de côlon Caco-2 en différenciation, tandis qu'elle était absente dans des cellules intestinales n'ayant pas la capacité de se différencier [187]. Des souris déficientes pour la PCSK9 ayant subi une résection partielle du foie ont montré des ralentissements dans la régénération tissulaire hépatique et des lésions nécrotiques. Ce ralentissement semblait être attribuable à une réplication de l'ADN plus lente observée seulement chez les souris sans

PCSK9 [156]. Ces données suggèrent que la PCSK9 pourrait être impliquée dans la différenciation et la maturation cellulaire.

4.2.2 Développement du système nerveux central

L'utilisation de la lignée cellulaire pluripotente P19 de souris soumise à l'acide rétinoïque (AR) permet la différenciation de ces cellules en neurones et en cellules gliales [188]. L'étude du profil d'expression génique de la PCSK9 dans cette lignée cellulaire a permis d'observer un profil différent de la PC2 qui est reconnue pour être impliquée dans la différenciation neuronale [189]. PCSK9 a eu une expression maximale au jour 2 du traitement à l'AR, puis son expression a rapidement diminué, tandis que l'expression de PC2 n'a cessé d'augmenter entre les jours 0 et 10 (expression maximale). Les profils d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ont montré des profils différents de la PCSK9, et aucun effet sur le LDLr n'a été enregistré. Ceci suggère que son action serait indépendante des gènes impliqués dans la cholestérogénèse. De plus, l'inhibition de la PCSK9 dans le poisson-zèbre a provoqué une dégénérescence du système nerveux central entraînant la mort quelques jours après l'inhibition dans les œufs des poissons [190]. Ceci indique que la PCSK9 pourrait avoir un rôle différent des autres PC, principalement PC2, dans le développement du système nerveux central [190]. Toutefois la viabilité de souris déficientes en PCSK9 [155, 156] et leur développement cérébral normal [168] suggèrent que l'absence de la PCSK9 chez les mammifères n'altérerait pas le développement du cerveau, ce qui est confirmé par l'absence de la PCSK9 chez certains patients [121, 137].

4.2.3 Apoptose des neurones

Une culture cellulaire de neurones du cervelet soumise à des stress provoquant la mort cellulaire programmée a été étudiée. Une étude de micropuces a révélé un impact sur l'expression de la PCSK9, d'où sa première appellation de «neural apoptosis regulated convertase 1» [191]. La transfection de la PCSK9 pour sa surexpression dans cette même lignée

cellulaire a provoqué une hausse de la mort cellulaire qui n'a pas été complètement rétablie par l'ajout d'un agent inhibiteur des caspases. Ceci suggère que l'effet pro-apoptotique de la PCSK9 dans cette lignée cellulaire serait à la fois dépendante et indépendante des caspases [192], et que la PCSK9 pourrait avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée.

4.2.4 Cancer

Certaines études ont déjà montré un faible risque augmenté de cancer chez les personnes possédant des taux plus faibles de LDL-C [193-195]. Les patients porteurs des mutations causant l'hypocholestérolémie R46L, C142X et C679X de la PCSK9 dans la cohorte ARIC n'ont pas montré d'association avec le risque de cancer [196], contrairement aux autres PC qui sont pressenties pour jouer un rôle dans le développement du cancer.

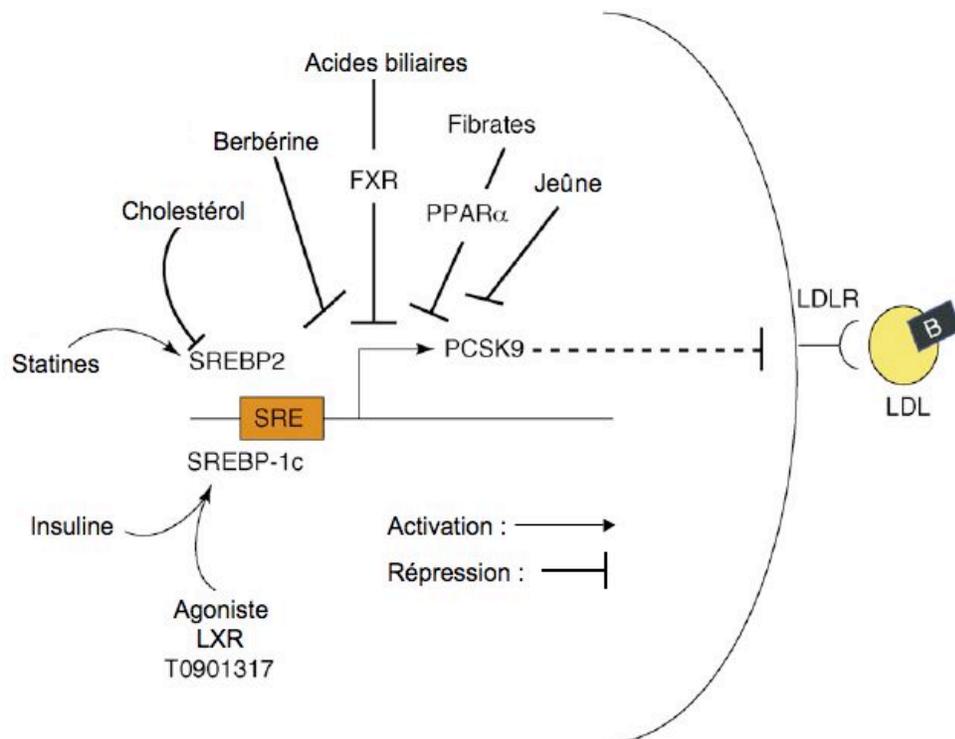
4.2.5 Protection contre les parasites

La prévalence de mutations provoquant une hypocholestérolémie est accrue dans les populations afro-américaines [85, 119]. Puisqu'aucune raison ne laisse présager une sélection positive de mutations protectrices contre l'athérosclérose dans les populations où les sujets décédaient plutôt d'infections dues à des parasites que de MCV [197], l'hypothèse voulant que certaines mutations de la PCSK9 aient plutôt un rôle protecteur contre les infections parasitaires a été proposée. Cette hypothèse est basée sur le fait que les parasites se nourrissent du cholestérol de l'hôte pour une infection efficace. Ainsi, des mutations engendrant l'hypocholestérolémie seraient avantageuses dans l'évolution de ces populations en les protégeant contre les infections de parasites [197] et de virus [110].

5- Régulation hépatique de la PCSK9

La principale investigation ayant pavé la voie à la majorité des études sur la régulation de la PCSK9 a été effectuée à Montréal et est parue en 2004 [177]. Elle a montré que les statines activent l'expression génique de la PCSK9 au niveau du foie, ce qui la rend encore plus attrayante comme cible pharmacologique dans le traitement des MCV. Il n'en demeure pas moins que cette étude pionnière a été réalisée exclusivement au niveau hépatique, comme toutes les études de régulation subséquente (voir figure 14).

Figure 14. Régulation hépatique de la PCSK9.



B : apolipoprotéine B100; FXR : farnesoid X receptor; LDL : lipoprotéine de faible densité; LDLR : récepteur du LDL; LXR : liver X receptor; PCSK9 : proprotéine convertase subtilisine / kexine type 9; PPAR- α : peroxyosome proliferator activated receptor α ; SRE : élément de réponse aux stéroïdes; SREBP : protéine de liaison au SRE.

Adapté de [198].

5.1 Statines

Les statines ont permis une avancée majeure dans le traitement des MCV en permettant de réduire les niveaux plasmatiques de cholestérol total et de LDL-C [199, 200]. Ces diminutions varient selon la statine utilisée, mais provoquent en moyenne une diminution de près de 2,0 mmol/L de LDL-C [201]. La diminution de LDL-C réduit le risque d'événements coronariens majeurs de 20% pour chaque tranche de 1,0 mmol/L de LDL-C obtenue [202]. Ces molécules inhibent l'enzyme permettant la synthèse du cholestérol, la HMG CoA réductase.

L'étude de Dubuc effectuée en 2004 a montré que l'incubation des cellules avec des statines a provoqué une hausse de l'ARNm du LDLr et de la PCSK9 [177]. L'utilisation de l'atorvastatine a montré une réponse dose-dépendante chez la PCSK9. L'ajout de mévalonate aux cellules a renversé l'effet des statines sur la PCSK9 et le LDLr, montrant que la modulation de la PCSK9 provient de l'effet inhibiteur des statines sur la synthèse du cholestérol, et que cet effet serait médié par SREBP-2 [177]. Une étude subséquente a confirmé l'effet des statines sur la PCSK9 et les LDLr hépatiques *in vitro* [203]. La prise de statines chez des patients hypercholestérolémiques a provoqué la diminution escomptée des LDL-C plasmatiques (42%), tout en augmentant de 34% la PCSK9 circulante [204], renforçant le concept qu'une inhibition de la PCSK9 combinée à la prise de statines aurait un effet bénéfique important dans le traitement des MCV.

Des études sur le promoteur de la PCSK9 ont révélé qu'une séquence SRE similaire à celle du gène du LDLr est à l'origine des effets des stérols et des statines sur la PCSK9 [203].

5.2 Ezétimibe

L'ézétimibe est un nouveau médicament permettant de réduire l'absorption du cholestérol en ciblant le NPC1L1 [6, 205]. Récemment, le même groupe ayant démontré pour la première fois l'augmentation de l'expression génique de la PCSK9 par les statines, a montré que l'ézétimibe provoquait aussi une hausse d'expression de la PCSK9 chez des patients hypercholestérolémiques [178]. De plus, la prise combinée de simvastatine et d'ézétimibe chez des hommes a provoqué une activation génique de la PCSK9 [179].

5.3 Agonistes LXR

L'utilisation de l'agoniste LXR TO901317 a montré l'activation de la PCSK9 chez des souris et chez les rats [149, 206]. Cette activation serait dépendante de SREBP-1c [206]. La combinaison du 22-hydroxycholestérol avec l'AR pour l'activation des facteurs de transcription LXR/RXR n'a pas eu d'effets sur la PCSK9 [177]. L'utilisation de 15-kétostérol (agoniste LXR) a permis de renverser l'activation du SREBP-2 et de ses gènes cibles induite par les stérols, dont la PCSK9, dans le modèle cellulaire HEK293 [207].

5.4 Fibrates

Les fibrates forment une famille de composés ciblant le facteur de transcription PPAR- α . L'activation de PPAR- α par ses ligands naturels (acides gras et dérivés) ou synthétiques (fibrates) diminue l'inflammation tout en améliorant le profil lipidique (hausse des HDL et baisse des TG) [208]. L'utilisation de ces composés semble démontrer des effets intéressants dans le traitement de l'hypercholestérolémie [209, 210], en combinaison avec les statines [211, 212], et surtout chez les personnes présentant un diabète de

type 2 [213, 214]. Cependant, des études supplémentaires semblent nécessaires pour démontrer la sécurité de l'utilisation des fibrates [215].

Une équipe française s'est intéressée à l'effet des fibrates sur la PCSK9. Le traitement des souris aux fénofibrates pendant sept jours a montré une baisse des expressions génique et protéique de la PCSK9 [154]. La mesure de la PCSK9 plasmatique chez des patients traités aux fibrates n'a indiqué qu'une diminution modeste de 8,5% de la PCSK9 circulante. L'utilisation des cellules hépatiques HuH7 recevant un fibrate a souligné le déclin de sécrétion de la PCSK9, et les auteurs suggèrent que c'est la diminution de la PCSK9 par les fibrates qui a entraîné la baisse du LDL-C [145]. La diminution de la PCSK9 serait attribuable à la hausse d'expression génique de la furine et de PC5A/6 qui constitueraient des cibles directes de PPAR- α . Ainsi, une plus grande quantité de la PCSK9 serait dégradée par ces PC. La combinaison de fibrates à une statine dans les cellules hépatiques a montré une hausse d'efficacité supplémentaire de 30% [180].

5.5 Acide zaragozique

La squalène synthase constitue une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol; elle convertit le farnésyl pyrophosphate en lanostérol. Les inhibiteurs de la squalène synthase constituent une nouvelle approche thérapeutique intéressante pour les patients réfractaires aux statines. De plus, ce nouveau médicament causerait moins d'effets secondaires que les statines [216, 217].

Il a été démontré que l'acide zaragozique (AZ), un inhibiteur de la squalène synthase, provoque une hausse d'ARNm du LDLr chez le rat [218], en plus d'élever les expressions génique et protéique, ainsi que l'activité de la HMG CoA réductase [219]. L'injection d'AZ à des rats a provoqué une chute du cholestérol total plasmatique de 38%, possiblement causée par

l'augmentation des expressions génique et protéique hépatique de la PCSK9 [220].

5.6 Berbérine

Un nouveau composé naturel, la berbérine, a montré des résultats intéressants en relation avec la diminution des niveaux de cholestérol total et de LDL-C circulants [221, 222], probablement via l'induction de l'expression génique du LDLr et également de sa stabilité [222-224]. Les auteurs ont voulu vérifier si la PCSK9 pourrait être impliquée dans l'effet hypocholestérolémiant de la berbérine. En fait, l'administration de la berbérine aux cellules HepG2 a entraîné une diminution proportionnelle à la dose de berbérine administrée sur l'expression génique de la PCSK9, en plus d'amoindrir la sécrétion protéique dans le milieu. La modulation à la baisse de la PCSK9 serait indépendante de SREBP-2, puisque la berbérine est connue pour activer l'AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) [225], qui régule le PPAR- α [226, 227], il ne serait pas impossible que l'effet inhibiteur de la transcription de la PCSK9 soit médié par le PPAR- α [180]. L'ajout de berbérine et de mévastatine à des cellules hépatiques a permis de renverser l'induction génique de la PCSK9 par la statine jusqu'au niveau basal, tout en augmentant l'expression protéique du LDLr. Ces données suggèrent que l'ajout de berbérine aux patients traités aux statines n'atteignant pas les cibles de réduction de CT et de LDL-C pourrait être envisageable [228].

5.7 Acides biliaires

L'utilisation d'échantillons de foie de patients présentant des calculs biliaires traités avec une résine (la cholestyramine) ou le CDCA a permis d'observer que la prise de la résine, qui a pour effet d'augmenter la synthèse des acides biliaires, a induit la hausse de l'expression de la PCSK9 hépatique [229].

L'utilisation de cellules hépatiques immortalisées a ensuite permis de montrer que le CDCA a provoqué une diminution de l'expression génique de la PCSK9 proportionnelle à la dose de CDCA utilisée (tout en provoquant une hausse du LDLr), tandis que le DCA a entraîné une hausse de la PCSK9 et du LDLr dans ce même modèle cellulaire. Le CDCA a provoqué une activation du FXR contrairement au DCA. L'utilisation de l'agoniste FXR GW4064 a montré des résultats similaires au CDCA. L'ajout de CDCA à la pravastatine a permis de réduire la quantité de la PCSK9 synthétisée (ARNm et protéine intracellulaire) et sécrétée, tout en augmentant l'ARNm du LDLr ainsi que sa liaison aux LDL marqués à l'iode¹²⁵ [230]. L'effet du DCA pourrait être attribuable aux autres récepteurs nucléaires des acides biliaires PXR et CAR, ainsi qu'au récepteur de la vitamine D. Les résultats obtenus indiquent tout de même un effet prometteur du CDCA en combinaison avec les statines [230].

5.8 Stérols

La présence de stérols a provoqué la baisse de l'expression génique de la PCSK9 dans plusieurs études [149, 166, 203, 207], et leur déplétion a conduit à l'effet inverse [166, 177, 203]. Ces effets seraient explicables par les modifications de SREBP-2 qui réagit différemment aux quantités de stérols, et qui représente un gène cible de la PCSK9 étant donné la présence d'un SRE sur son promoteur [203, 206].

5.9 Diabète

Une étude réalisée sur des rats diabétiques a révélé une diminution marquée (81%) de l'expression génique du LDLr hépatique, bien que l'expression protéique n'ait pas été affectée. Conséquemment, les niveaux de cholestérol plasmatiques ont été augmentés d'environ 20%. Cependant, le diabète induit chez les rats par la streptozotocine a provoqué une diminution très

importante du pro-PCSK9 et de sa forme mature. La modulation à la baisse de l'expression génique du LDLr et non de la quantité protéique serait attribuable à la diminution d'expression de la PCSK9, puisque cette dernière est reconnue pour dégrader post-transcriptionnellement le LDLr [231].

5.10 Glucose et insuline

La culture primaire d'hépatocytes de souris a été utilisée pour vérifier l'effet du glucose et de l'insuline sur l'expression de la PCSK9. L'incubation avec des doses élevées de glucose (25 mM) n'a pas altéré l'expression génique de la PCSK9, du LDLr et de SREBP-1c comparativement à la concentration physiologique de 5 mM. Par contre, l'ajout d'insuline (100 nM) à 5 mM de glucose a stimulé les expressions géniques de ces trois gènes. Un clamp hyperinsulinémique / euglycémique de six heures a été réalisé chez des souris pour vérifier l'effet de l'insuline *in vivo* : l'expression génique de la PCSK9 a doublé chez ces souris. L'effet de l'insuline sur la PCSK9 serait médié par le SREBP-1c [206].

5.11 Jeûne

Des souris soumises à un jeûne ont vu leurs niveaux d'ARNm et protéique de la PCSK9 hépatique diminués [154, 203, 206]. Les concentrations ont pu être rétablies par le retour à la diète normale [203, 206].

5.12 Inflammation

L'inflammation est connue pour altérer le métabolisme des lipoprotéines et diminuer l'expression du LDLr [232]. En induisant l'inflammation chez des souris au LPS, au zymosan ou au terpentine, l'expression protéique du LDLr a été diminuée et l'expression génique de la PCSK9 a été augmentée dans le foie et les reins de ces souris. Cette hausse est indépendante du SREBP.

Possiblement, l'augmentation de la PCSK9 serait induite par un autre facteur de transcription (FXR ou PPAR- α) [233].

II. PROJET DE RECHERCHE

1. Hypothèse et objectifs

La PCSK9 est une protéine qui a été récemment impliquée dans le métabolisme du cholestérol étant donné sa capacité à promouvoir la dégradation du LDLr. La découverte de son association aux statines a considérablement attiré l'attention des chercheurs et des cliniciens et a fait de cette protéine une cible thérapeutique sérieuse pour le traitement des MCV. Ce gain d'intérêt exceptionnel est compréhensif étant donné les nombreuses mutations de la PCSK9 menant à l'hypocholestérolémie. Actuellement, la communauté scientifique cherche à élaborer des stratégies efficaces pour neutraliser la PCSK9 afin de prévenir le développement de l'athérosclérose et diminuer ainsi la prévalence des MCV.

La cellule intestinale constitue un site primordial dans le métabolisme du cholestérol, étant donné sa capacité à absorber, synthétiser et diriger le cholestérol vers le foie sous forme de lipoprotéines. De plus en plus d'évidences militent en faveur de la contribution de l'entérocyte et le développement de l'athérosclérose. Il semble donc que la prévention des MCV doit prendre en considération les événements intestinaux, incluant la PCSK9 dont la régulation pourrait modifier l'apport du cholestérol et le devenir de la santé cardiovasculaire. Actuellement, on pense que la PCSK9 peut avoir d'autres fonctions que la dégradation du LDLr.

Plusieurs molécules sont connues pour affecter le métabolisme lipidique. En particulier, certaines hormones, divers nutriments et plusieurs médicaments modulent l'expression de plusieurs protéines clés reliées au métabolisme du cholestérol. Parce que la PCSK9 apparaît maintenant comme une protéine primordiale dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol, la détermination des facteurs régulateurs pourrait avancer notre compréhension

des mécanismes d'action. Cependant, peu d'études ont, à ce jour, tenté de définir la nature des effecteurs et la régulation de la PCSK9 dans le petit intestin. Les travaux se sont plutôt concentrés sur le foie sans faire cas du grêle.

Notre hypothèse est que la PCSK9 intestinale constitue une nouvelle molécule clé dans le métabolisme du cholestérol dans l'entérocyte, et que cette dernière doit être régulée par le cholestérol et ses métabolites.

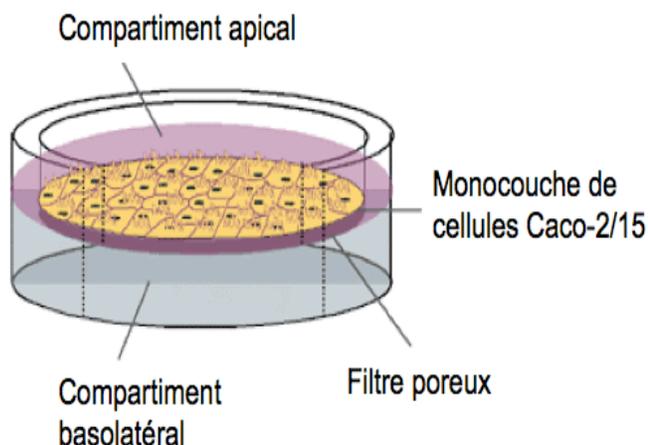
Par conséquent, notre projet de recherche a pour objectif principal d'étudier la régulation de la PCSK9 au niveau intestinal. Pour ce faire, l'impact de molécules (reconnues pour influencer le métabolisme du cholestérol) a été investigué sur les expressions génique et protéique de la PCSK9. Par la même occasion, le statut du LDLr a été évalué puisqu'il est reconnu comme une cible de la PCSK9 au niveau hépatique. Finalement, certains sentiers mécanistiques ont également été scrutés pour comprendre la modulation de la PCSK9.

2- Méthodologie

2.1 Culture cellulaire

Les cellules intestinales Caco-2/15 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂, et maintenues dans un milieu de culture contenant un minimum d'éléments essentiels (MEM) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY). Pour constituer le MEM «complet», 1% du mélange des antibiotiques pénicilline et streptomycine (GIBCO-BRL, Grand Island, NY), ainsi que 1% d'acides aminés non-essentiels (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) étaient ajoutés au MEM. Du sérum foetal bovin (FBS) (Flow, McLean, VA) décomplémenté et filtré était aussi ajouté au MEM «complet» à une concentration finale de 10%. Les cellules Caco-2/15, utilisées entre les passages 30 et 40, étaient maintenues dans des flasques de 75 cm² (Corning Glass Works, Corning, NY) lors de la prolifération cellulaire. Lorsque les cellules atteignaient 70 à 90% de confluence, les cellules étaient diluées 1:6 pour en augmenter la quantité en utilisant de la trypsine-0,5 mM EDTA (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) à 0,05%. Pour chacune des expériences, les cellules étaient déposées sur des plaques de 6 puits avec filtres (Corning Glass Works, Corning, NY) à une densité de 1×10^6 cellules / puits. Les filtres de 24,5 mm de polycarbonate avec des pores de 0,4 µm permettent la différenciation des cellules en monocouche selon les pôles apical et basolatéral des entérocytes (voir Figure 15).

Figure 15. Transwell permettant la différenciation des entérocytes.



Le système de transwell développé permet la différenciation des entérocytes de façon à ce que le pôle apical représente la lumière intestinale, et que le côté basolatéral corresponde à la circulation sanguine. Ce système permet d'obtenir un système représentant la physiologie de l'entérocyte et donne la possibilité de traiter indépendamment les compartiments avec les effecteurs de notre choix.

Les cellules sur filtres recevaient du MEM «complet» supplémenté de FBS à 5%. Le milieu de culture était changé aux 2 à 3 jours. Les cellules Caco-2/15 demeuraient sur filtre pour 21 jours, puisque les cellules ont atteint la différenciation recherchée suite à cette période [3, 234, 235].

2.2 Traitements cellulaires

Pour permettre l'entrée des stérols dans les entérocytes, le cholestérol et le 25-hydroxycholestérol (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) étaient présentés à la cellule sous une forme liée à l'albumine ou sous forme de micelles. Étant donné leur caractère hydrophobe, les stérols étaient dissous dans le chloroforme. Pour la liaison des stérols à l'albumine, du NaOH 0,1 N était ajouté, et ce dans un ratio 1 :1 avec les solutions de stérols, puis 3 mL d'albumine de sérum bovin 10% pH 7,4 étaient ajoutés pour permettre la

liaison. Le mélange était évaporé sous un jet d'azote, puis les stérols liés à l'albumine étaient dissous dans du milieu de culture MEM «complet». Les stérols sous forme de micelles étaient préparés par leur addition à une solution de 0,3 mM de mono-oléine et de 4,8 mM de taurocholate [236]. Le mélange était aussi évaporé sous azote puis resuspendu dans le MEM «complet».

L'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) était directement dissous dans le MEM «complet».

Le taurocholate (Calbiochem, Gibbstown, NJ) et le déoxycholate (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) étaient dissous dans l'éthanol 95% et évaporés sous azote avant d'être resuspendu dans le MEM «complet». Les concentrations utilisées étaient respectivement de 4,8 mM et 250 μ M.

Les cellules étaient traitées pendant 24 heures dans le compartiment apical selon les concentrations décrites précédemment. Une pré-incubation de 16 à 20 heures dans du MEM «complet» précédait systématiquement les traitements.

2.3 Immunobuvardage

Pour quantifier l'expression des protéines d'intérêts dans l'étude, des immunobuvardages de type Western Blot étaient réalisés. Suite aux incubations, les cellules Caco-2/15 traitées étaient récupérées dans un tampon de lyse et les protéines étaient préparées pour les immunobuvardages selon un protocole couramment utilisé dans notre laboratoire [237]. Les protéines étaient quantifiées selon la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Les protéines étaient ensuite dénaturées dans un tampon contenant du SDS et du DTT (Thermo Scientific, Rockford, IL) et séparées sur un gel dénaturant de polyacrylamide

SDS-PAGE de 7,5%. Le gel était ensuite transféré vers une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Pour éviter la liaison non-spécifique des anticorps primaires, les membranes étaient incubées avec du lait écrémé 5% (dissous dans du tampon TBS tween 0,05%) à température ambiante pendant une heure avec agitation. Les membranes étaient ensuite incubées avec agitation toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires spécifiques dirigés vers les différentes protéines d'intérêts: β -actine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), LDLr (Research Diagnostic Inc. Flanders, NJ), PCSK9 (dirigés vers les AA 31 à 454) (généreusement donné par Geneviève Dubuc et le Dr Jean Davignon, Institut de recherches cliniques de Montréal, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada) et SREBP-2 (Cayman, Ann Arbor, MI). Les membranes étaient ensuite rincées, puis incubées une heure à température ambiante avec agitation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (ou «horseradish peroxidase») spécifique à l'espèce de l'hôte où l'anticorps primaire avait été développé. Bien que 25 μ g de protéines étaient chargées dans chacun des puits des gels, la β -actine a été utilisée comme protéine contrôle pour rapporter le niveau d'expression protéique. Ainsi, chaque bande d'intérêt retrouvée sur le film suite à la révélation et l'exposition des membranes était rapportée au niveau d'expression de la β -actine. Pour la quantification de l'expression protéique, les films étaient numérisés grâce au numériseur HP Scanjet scanner puis le logiciel Un-Scan-it (Silk Scientific Inc., Orem, UT) était utilisé pour quantifier l'intensité des bandes.

2.4 Expression génique par RT-PCR

L'ARN des cellules Caco-2/15 traitées était récupérée suite aux traitements avec le tampon Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) selon les recommandations du fabricant. L'ADN complémentaire était ensuite obtenu grâce à l'enzyme M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON,

Canada) à partir de l'ARN préalablement isolée. Une fois l'ADN complémentaire obtenu, l'expression des gènes d'intérêts était déterminée par PCR. Des amorces spécifiques à la forme humaine des gènes d'intérêts ont été préparées et utilisées. Pour éviter des résultats erronés suite à une contamination d'ADN génomique, les amorces étaient sélectionnées pour que les amorces sens et antisens se situent sur des exons différents, et que les exons choisis soient séparés par un intron d'une taille supérieure à 500 paires de bases. Les séquences utilisées sont présentées au Tableau 3.

Tableau III. Séquences des amorces utilisées pour les PCR.

| Gènes | # de référence (NCBI) | Sens | Antisens |
|--------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| FXR | NM_005123 | CATGCGAAGAAAGTGTC AAGAGTGTCG | CTTTGTTGTCGAGGTCACCTG TCGCA |
| GAPDH | NM_002046 | GTCCACTGGCGTGTT CACCA | GTGGCAGTGATGGCATG GAC |
| HMG CoA réductase | NM_000859 | ACCCTTAGTGGCTGAAA CAGATACCC | AACTGTCGGCGAATAGATAC ACCACG |
| LDLr | NM_000527 | TGAGAGGACCACCCTGA GCAAT | TTACGGCTGTGGAGCTGACC TTTA |
| PCSK9 | NM_174936 | AGGACTGTATGGTCAGCA CACT | CGGGATTCCATGCTCCTTGAC TTT |

Les réactions de PCR étaient réalisées avec l'appareil Eppendorf Mastercycler Gradient PCR (Eppendorf, Westbury, NY). Une première étape de dénaturation de 10 minutes était réalisée à 95°C. Ensuite, 30 à 40 cycles de dénaturation de 30 secondes à 95°C étaient effectués, suivis de 30 secondes d'hybridation à 58°C et de 30 secondes d'élongation à 72°C. Finalement, une période d'élongation finale de 10 minutes à 72°C terminait chacune des réactions. Les amplicons obtenus étaient ensuite chargés sur gel d'agarose 1,5% et visualisés à la lampe ultraviolet grâce à la présence de bromure d'éthidium. Une image du gel était ensuite enregistrée pour permettre la quantification des bandes grâce au logiciel Un-Scan-it (Silk

Scientific Inc., Orem, UT). Bien que la même quantité des produits de PCR étaient déposés sur gel d'agarose, l'expression des gènes d'intérêts était systématiquement rapportée à l'expression du GAPDH qui servait de gène rapporteur. Des études précédentes dans notre laboratoire avaient déjà permis de mettre au point cette méthode de quantification de l'expression génique [3, 238].

2.5 Analyses statistiques

Toutes les valeurs présentées représentent la valeur moyenne \pm erreur-type. Les études statistiques ont été réalisées avec un test t bilatéral de Student lors de la comparaison de 2 groupes. Lorsque plus de 2 groupes étaient comparés, un test ANOVA suivi d'un post-test de Tukey étaient réalisés. Les valeurs des groupes traités étaient comparées à la moyenne des groupes contrôles dont la valeur a été rapportée à 1,0. Une différence statistique était considérée lorsque la probabilité «p» était inférieure à 5%, ou 0,05.

3- Article scientifique

3.1 Rédaction du mémoire par article



Faculté de médecine
Département de nutrition

Le 18 août 2008

Monsieur François Leblond
3280, Laurier Est, App. 7
Montréal, Québec
H1X 1T9

Objet : Autorisation de déposer votre mémoire de maîtrise sous forme d'article

Monsieur,

Suite à votre demande, j'ai le plaisir de vous autoriser à présenter votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles. Il est entendu que vous devrez vous soumettre aux conditions minimales de dépôt décrites dans le «Guide de présentation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat», édition de mars 2001. Ce document est disponible sur le site de la FES. Vous pouvez également vous le procurer à la Librairie de l'Université de Montréal.

Cependant, afin de respecter la loi canadienne sur les droits d'auteurs, vous devrez, au moment du dépôt de votre mémoire, remettre, avec les formulaires de reproduction et diffusion dûment complétés et signés, les déclarations écrites de tous les coauteurs des articles inclus dans votre mémoire autorisant la reproduction et la diffusion de votre mémoire de maîtrise.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de mes sentiments les meilleurs.

Olivier Receveur, Dt.P., M.P.H., Ph.D.
Responsable des études supérieures
Département de nutrition
Faculté de médecine
Université de Montréal

Olivier.receveur@umontreal.ca
Tél. : (514) 343-6111 poste 28841

c.c. : Dr Emile Levy, directeur de recherche
Dr André Ferron, Faculté de médecine

DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES

1. Identification de l'étudiant

FRANÇOIS LEBLOND

2. Nom de l'unité académique

DÉPARTEMENT DE NUTRITION, FACULTÉ DE MÉDECINE

3. Nom du programme

MAÎTRISE EN NUTRITION –AVEC MÉMOIRE / RECHERCHE, 2-320-1-0

4. Article proposé :

FRANÇOIS LEBLOND, NABIL G. SEIDAH, EDGARD DELVIN, MICHEL DOMINGUEZ et EMILE LEVY, Regulation of proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 in intestinal epithelial cells. Sera soumis à l'American Journal of Physiology (Liver and Gastrointestinal Physiology).

5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles

J'ai produit les résultats qui seront inclus dans l'article, en plus de participer au processus de rédaction.

FRANÇOIS LEBLOND

Signature

10-7-8

Date

6. Avis et signature du directeur de recherche

DR EMILE LEVY

Signature

10-7-08

Date

7. Décision ou recommandation et signature du directeur de programme

DR OLIVIER RECEVEUR

Signature

18-8-08

Date

3.2 Apport original et contribution des co-auteurs

Ma contribution en tant que premier auteur est majeure puisque j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans le manuscrit. De plus, j'ai participé à la révision de l'article. Le Dr Nabil G. Seidah a participé à la révision du manuscrit. Le Dr Edgard Delvin a co-supervisé le projet, en plus de réviser le manuscrit. Le Dr Michel Dominguez a fourni une aide technique dans la réalisation des expériences. Finalement, le Dr Levy a rédigé et révisé le manuscrit, en plus de superviser l'étude.

3.3 Accord des co-auteurs

ACCORD DES CO-AUTEURS

Pour l'insertion de l'article dans le mémoire de Maîtrise en Nutrition (recherche) de François Leblond (M.Sc. Nutrition –recherche avec mémoire, 2-320-1-0).

Titre : **Regulation of proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 in intestinal epithelial cells**

François Leblond¹, Nabil G. Seidah², Edgard Delvin³, Michel Dominguez¹, and Emile Levy^{1*}

Départements de ¹Nutrition, et ³Biochimie, et ²Biochimie Neuroendocrinienne, Institut de Recherche Clinique de Montréal, *Université de Montréal*, Centre de Recherche, *CHU Sainte Justine*, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

L'article sera soumis au journal American Journal of Physiology (Liver and Gastrointestinal Physiology).

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que FRANÇOIS LEBLOND inclue cet article dans SOM MÉMOIRE DE MAÎTRISE qui a pour titre RÉGULATION INTESTINALE DE LA PROPROTÉINE CONVERTASE SUBTILISIN/ KEXIN TYPE 9 (PCSK9).

DR NABIL G. SEIDAH

Signature

22-08-2008

Date

DR EDGARD DELVIN

Signature

10-7-2008

Date

DR MICHEL DOMINGUEZ

Signature

10-07-2008

Date

DR EMILE LEVY

Signature

10-7-2008

Date

Regulation of the proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 in intestinal epithelial cells

François Leblond¹, Nabil G. Seidah², Edgard Delvin³, Michel
Dominguez¹, and Emile Levy^{1*}

From the Departments of ¹Nutrition, and ³Biochemistry, and ²Biochemical
Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, *Université de
Montréal*, Research Centre, *CHU Sainte Justine*, 3175 Côte Ste-Catherine,
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Running Head: Modulation of PCSK9

Address for correspondence: * Dr. Emile Levy
GI-Nutrition Unit
CHU Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Tel.: (514) 345-7783
Fax: (514) 345-4999
E-mail: emile.levy@recherche-ste-
justine.qc.ca

ABSTRACT

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) posttranslationally promotes the degradation of the low-density lipoprotein receptor (LDLr) in hepatocytes and increases plasma LDL cholesterol. It is not clear, however, whether PCSK9 plays a role in the small intestine. Here, we characterized the patterns of variations of PCSK9 and LDLr in fully differentiated Caco-2/15 cells as a function of various potential effectors. Cholesterol (100 μ M) solubilised in albumin or micelles significantly down-regulated PCSK9 gene (30%, $p < 0,05$) and protein expression (50%, $p < 0,05$), surprisingly in concert with a decrease in LDLr protein levels (45%, $p < 0,05$). 25-hydroxycholesterol (50 μ M) treated cells also displayed significant reduction in PCSK9 gene (37%, $p < 0,01$) and protein (75% $p < 0,001$) expression, while LDLr showed a decrease at the gene (30%, $p < 0,05$) and protein (57%, $p < 0,01$) levels, respectively. The amounts of PCSK9 mRNA and protein in Caco-2/15 cells were associated to the regulation of HMG-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) that can transcriptionally activate PCSK9 via sterol-regulatory elements located in its proximal promoter region. On the other hand, depletion of cholesterol content by hydroxypropyl- β -cyclodextrine up-regulated PCSK9 transcripts (20%, $p < 0,05$) and protein mass (540%, $p < 0,001$), in parallel with SREBP-2 protein levels. The addition of bile acids, taurocholate and deoxycholate, to the apical culture medium lowered PCSK9 gene expression (30%, $p < 0,01$) and raised PCSK9 protein expression (43%, $p < 0,01$) respectively, probably via the modulation of farnesoid X receptor. Combined, these data indicate that PCSK9 functions as a sensor of sterol in the small intestine.

Keywords: Enterocyte, PCSK9, cholesterol, regulation, FXR, SREBP-2

ABREVIATION LIST

| | |
|-------|--|
| FBS | fetal bovine serum |
| FXR | farnesoid X receptor |
| LDL | low-density lipoprotein |
| LDLr | LDL receptor |
| MEM | minimal essential medium |
| PCSK9 | proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 |
| PPAR | peroxisome proliferator activated receptor |
| SRE | sterol-regulatory elements |
| SREBP | sterol regulatory element binding proteins |

INTRODUCTION

Familial hypercholesterolemia is characterized by elevated plasma low-density lipoprotein (LDL) and deposition of LDL in arteries, leading to premature cardiovascular events (14). This genetically dominant hypercholesterolemia is related to molecular aberrations in the LDL receptor (LDLr) or its ligand apolipoprotein B. Recently, mutations in a third gene, proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 (*PCSK9*), were associated to this disease (1). Human *PCSK9* gene is approximately 22 kb long, comprising the promoter region and 12 exons and it is located on chromosome 1p32 (42). The gene produces an mRNA of 3636 bp encoding a 692-aa protein. Although it is proposed that secreted *PCSK9* interacts with LDLr, enters the endocytic recycling pathway with LDLr and impairs LDLr pathway by increasing the degradation of the receptor (4, 33), the precise molecular basis has yet to be determined.

PCSK9 is mainly expressed in the liver. It is thought to be involved in liver regeneration, neuronal differentiation/apoptosis and cortical neurogenesis (42), but its primary function apparently consists in negatively regulating LDLr, likely by a posttranscriptional manner, e.g. degradation of LDLr in acidic subcellular compartments, possibly endosomes/lysosomes (4, 20, 27, 43). Even though *PCSK9* has been found to be expressed substantially in intestine (42), studies have been mostly restricted to the liver (20, 27, 43). However, maintaining cholesterol homeostasis in the body requires accurate metabolic cross-talk between hepatic and intestinal processes to adequately cope with large fluctuations in dietary cholesterol intake (46), whereas imbalance may lead to elevated LDL-cholesterol levels and increased risks for coronary heart disease, the main cause of death in Western societies. Notably, the intestine plays a key role in cholesterol balance in animals and humans, constitutes the only site for absorption of dietary sterols, quantitatively represents the single active location for cholesterologenesis, and remains the second most important organ for the uptake and degradation of

circulating LDL. Whether PCSK9 reduces the number of LDLr in the enterocyte basolateral membrane is not known. This information is crucial since LDLr behaviour in absorptive cells does not necessarily reflect that in hepatocytes (26, 34, 39, 45).

Poor information is available about the regulation of PCSK9 even though it seems to be an attractive target for lowering LDL-cholesterol (1). In mice, PCSK9 is down-regulated by dietary cholesterol (35). Conversely, PCSK9 gene expression is up-regulated in mice overexpressing sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1 α and SREBP-2 (two transcription factors activated by low levels of intracellular cholesterol) (21). The nutritional status also modulates PCSK9 expression. For example, 24-h fasting in mice dramatically decreased hepatic PCSK9 mRNA and protein levels, which were progressively restored by carbohydrate refeeding (8). Similarly, statins have been shown to lower LDL by inducing SREBP-2, which enhances LDLr expression. Moreover, the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α agonist fenofibrate downregulates PCSK9 gene expression and protein synthesis in controls and not, as expected, in PPAR α -deficient mice (28). Most of the work on PCSK9 regulation has been performed in relation to the liver, but it must be extended to the small intestine, an important site for cholesterol homeostasis. Therefore, the purpose of the present study was to examine the regulation of PCSK9 in an established Caco-2/15 enterocyte cell line. An additional aim of the present work was to determine the expression profile of LDLr and various nuclear transcription factors.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Caco-2/15 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO₂ in minimal essential medium (MEM) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL) and supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS) (Flow, McLean, VA). Caco-2/15 cells (passages 30–40) were maintained in T-75-cm² flasks (Corning Glass Works, Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70–90% confluence, by use of 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 1 x 10⁶ cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as described above) supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cells were cultured for various periods, including 21 days, at which the Caco-2/15 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis (15, 32, 41). The medium was refreshed every second day.

Cell treatments

Cholesterol and 25-hydroxycholesterol (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) were dissolved in chloroform, mixed with NaOH 0,1N (ratio 1:1 with sterol/chloroform) and 3ml of 10% BSA pH 7,4, then placed under a strain of nitrogen for albumin binding. Micellar sterols were prepared with the addition of 0,3 mM monoolein and 4,8 mM of taurocholate, then the mixture were evaporated under a strain of nitrogen. Albumin or micelle bound sterols were mixed to MEM without FBS (18 h) before being added to the apical compartment. Hydroxypropyl-β-cyclodextrine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) was directly dissolved in MEM at a 25 mM concentration then added to the apical compartment. Taurocholate (Calbiochem, Gibbstown, NJ) and deoxycholate (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) were dissolved in 95%

ethanol and evaporated under nitrogen before being mixed with MEM at the final concentrations of 4,8 mM and 250 μ M, respectively.

Antibodies against PCSK9

The specificity of the antibodies (38, 40) was evaluated by various methods, which exclusively recognized human PCSK9 among various proteins, Western blotting following the incubation of the Abs in the presence or absence of specific antigens, the omission of the primary PCSK9 Ab in Western blot and the identification of the human PCSK9 sequences following immunoprecipitation and SDS-PAGE.

Western Blots

To assess the presence and regulation of PCSK9, LDLR and SREBP-2, Caco-2/15 cells were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (31). The Bradford assay (BioRad), was used to estimate protein concentration. Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and DTT (Thermo Scientific, Rockford, IL), separated on a 7.5% SDS-PAGE and electroblotted onto Hybond-C extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Non specific binding sites of the membranes were blocked using defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against the targeted proteins: β -actin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), LDLR (Research Diagnostic Inc., Flanders, NJ), PCSK9 (amino acids 31-454) (kind gift of G. Dubuc and J. Davignon, Clinical Research Institute of Montreal, University of Montreal, Montreal, QC, Canada) and SREBP-2 (Cayman, Ann Arbor, MI). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Even if identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the β -actin protein was used as a reference protein. Molecular size markers were simultaneously loaded on gels (data not shown on the figures). Blots were developed and the mass of proteins were quantified using an HP Scanjet scanner equipped with

a transparency adapter and software. Importantly, the utilization of differential loading and quantification suggested a dynamic range of densitometric measurements.

RT-PCR

Experiments for mRNA quantification as well as for GAPDH (as a control gene) were performed using the Eppendorf Mastercycler Gradient PCR machine (Eppendorf, Westbury, NY) as reported previously (37, 41). Approximately 30–40 cycles of amplification were used at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The following primer sequences were used: FXR forward (5'-CATGCGAAGAAAGTGTC AAGAGTGTCG-3') and reverse (5'-CTTTGTTGTGCGAGGTC ACTTGTGCGCA-3'); GAPDH forward (5'-GTCCACTGGCGTGTT CACCA-3') and reverse (5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'); HMG-CoA reductase forward (5'-ACCCTTAGTGGCTGAAACAGATACCC-3') and reverse (5'-AACTGTCGGCGAATAGATACACCACG-3'); LDLr forward (5'-TGAGAGGACCACCCTGAGCAAT-3') and reverse (5'-TTACGGCTGTGGAGCTGACCTTTA-3'); and PCSK9 forward (5'-AGGACTGTATGGTCAGCACACT-3') and reverse (5'-CGGGATTCCATGCTCCTTGACTTT-3'). Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. Under these experimental conditions relative to RT-PCR, 34–36 cycles corresponded to the linear portion of the exponential phase. Pilot and previous studies in our laboratories showed that the RT-PCR, under our experimental conditions, is quantitative employing different amounts of RNA. Fold induction was calculated using GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as the reference gene.

Statistical Analysis

All values were expressed as the mean \pm SEM. The data were evaluated by ANOVA (followed by a Tukey post-test), where appropriate, and the differences between the means were assessed using the two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered to be statistically significant when the *P*-value was $<0,05$. All mean values were compared to the control group (the mean of the control group was adjusted at 1,0).

RESULTS

The first issue addressed by our studies was to explore whether a difference could be noted in the expression of PCSK9 under the influence of sterols. The incubation of fully differentiated Caco-2/15 cells with various concentrations of cholesterol solubilised in albumin resulted in a decrease in the mRNA and protein levels of PCSK9. At 100 μ M cholesterol, decreases of 25% ($p < 0.001$) and 55% ($p < 0.05$) were significantly recorded in mRNA and protein mass levels, respectively (Figure 1A). When the regulation of LDLr was investigated, a lower protein expression ($\sim 60\%$, $p < 0.001$) along with not significantly changed mRNA levels was noted (Figure 1B). Since bile acid-facilitated cholesterol absorption occurs in the small intestine in physiological conditions, solutions containing either micelles alone or micelles together with cholesterol were added to the apical media. Again, a micellar cholesterol-mediated drop (30-50%) was recorded in the mRNA and protein expression of PCSK9 (Figure 2A), accompanied with a similar reduction in LDLr protein expression (Figure 2B). Finally, the substitution of cholesterol by 25-hydroxycholesterol produced a similar results on PCSK9 (Figure 3A) and on both mRNA and protein levels of LDLr (Figure 3B).

In view of these findings, we assessed protein expression of nuclear SREBP-2 with an antibody that distinguished the truncated active nuclear form from its membrane linked precursor. Also, since LDLr and HMG-CoA reductase, the limiting enzyme in cholesterol synthesis, are sensitive to SREBP-2 and sterol in the small intestine, we determined HMG-CoA reductase transcription. As illustrated in Figure 4A, the administration of micellar cholesterol or 25-hydroxycholesterol to Caco-2/15 cells lowered HMG-CoA reductase transcripts (30% and 55%, respectively). Moreover, measurement of SREBP-2 revealed a lessening in its protein expression (Figure 4B).

We next evaluated how depletion of cholesterol cell content modulates PCSK9 and LDLr. The extraction of cholesterol was achieved with

hydroxypropyl- β -cyclodextrin that has been shown to selectively eliminate cholesterol from the plasma membrane, in preference to other lipids (24). As illustrated in Figures 5A and 5B, hydroxypropyl- β -cyclodextrin markedly increased the mRNA and protein expression of PCSK9 and LDLr. The expression of HMG-CoA reductase and SREBP-2 was upregulated as well (Figure 5C). To determine whether this impact is mainly due to cholesterol extraction, Caco-2/15 cells were supplemented with a combination of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and micellar cholesterol. The mixture largely restored the control levels.

We subsequently tested the specific effects of bile acids. Taurocholate (4.8 mM) reduced mRNA level of PCSK9 by 25% without affecting LDLr expression (Figure 6). On the other hand, the addition of deoxycholate (250 μ M) enhanced the protein expression of PCSK9 by 30% (Figure 7A). LDLr was more responsive to deoxycholate by showing a \sim 70% and 2-fold increase in mRNA and protein expression, respectively (Figure 7B). As noted in Figure 8, taurocholate slightly diminished the transcripts of HMG-CoA reductase without affecting SREBP-2 and farnesoid X receptor (FXR) gene expression. On the other hand, deoxycholate decreased FXR mRNA expression, enhanced the protein expression of SREBP-2 and remained without effect on HMG-CoA reductase (Figure 8).

DISCUSSION

Despite valuable advances, additional studies are clearly warranted to understand the complex molecular mechanisms that orchestrate cholesterol homeostasis in the small intestine. A tremendous opportunity is offered by the recent discovery of PCSK9, which displays various functions, including hepatic LDLr degradation. In view of the small intestine's high capacity to absorb lipids and elaborate most of the major lipoprotein classes and considering the well-known actions of a number of nutrients and hormones on lipid metabolism and transport at the intestinal level, the lack of knowledge about the modulation of PCSK9 in the gut is puzzling. For the first time, the present work attempted to detail the modulation of PCSK9 in intestinal cells. According to our data, there is a discrete regulation of PCSK9 from stimuli, originating from apical media, such as sterols, bile acids, and cyclodextrin. Apparently, PCSK9 does not interfere with the well-established PCSK9-mediated reduction in LDLr. Furthermore, in our experiments, we have supplemented Caco-2/15 cells with sterols or caused the depletion of cholesterol cell content using hydroxypropyl- β -cyclodextrin, an approach that is both rapid and highly efficient (17, 18). In addition, hydroxypropyl- β -cyclodextrin is entirely surface acting, so, apart from removing cholesterol, it has a minimal effect on cell membranes (22). Our findings clearly showed that provision of sterols to enterocytes down-regulated the mRNA and protein expression of PCSK9. Conversely, the lessening of cholesterol cell content enhanced PCSK9 transcription. In similar fashion, PCSK9 expression was highly downregulated by dietary cholesterol in mouse liver (35). This is also consistent with the demonstration that PCSK9 expression was strongly induced by statins in a dose-dependent manner in HepG2 cells and in human primary hepatocytes, likely a result of the cholesterol-lowering effect of the drug, and that this induction was efficiently reversed by mevalonate (10). Altogether, these studies pointed out that (i) the regulation of PCSK9 expression is dependent on the presence or absence of sterols not only in hepatocytes, but also in intestinal epithelial cells; and (ii) the modulation of

PCSK9 by sterols, which are supplied either exogenously or endogenously, is achieved at the transcription level.

PCSK9 is able to critically modulate LDLr protein expression and plasma LDL cholesterol levels. It has been reported that gain-of-function mutations in PCSK9 have a 23% decreased level of cell surface expression of LDL receptors and a 38% decrease in internalization of LDL, while loss-of-function mutations are associated with a 16% increased level of cell surface LDLr and a 35% increased internalization of LDL (6). Apparently, the catalytic activity of PCSK9 appears not to be required for LDLr degradation, but it is essential for activation and secretion of PCSK9 (9, 19, 36). In our work, the protein expression of LDLr showed similar changes to PCSK9 in Caco-2/15 cells with sterol supplementation or under the sterol-depleted conditions. Considering that the function of PCSK9 is to promote the degradation of LDLr (20), as noted before (2), the parallel change in LDLr to PCSK9 by sterols is somewhat surprising. However, previous studies have reported a similar behavior of the two proteins in HepG2 cells (23). One might consider that these cells lack a component or machinery necessary for the coordination of the expression of these proteins, but other research groups have not found a reciprocal regulation of PCSK9 and LDLr. For example, inhibition of squalene synthase upregulates PCSK9 and LDLr expression in rat liver (3) and there was no reverse relation of PCSK9 and LDLr in rat liver cell line (16). *PCSK9* was identified as one of the genes that are regulated by SREBPs (21, 35). The SREBPs are members of the basic helix-loop-helix leucine zipper family of transcription factors that regulate the expression of the target genes by binding to the sterol-regulatory elements (SRE) in their promoter regions (5). Dubuc et al. (10) reported that the transcription of *PCSK9* was increased by statins, most likely through SREBP-2 activation in primary human hepatocytes, and proposed the importance of conserved SRE in the promoter region of mouse, rat, and human *PCSK9* genes. Thereafter, the expression of PCSK9 was found dependent on the absence or presence of sterols via SRE

in the minimal promoter region of the human *PCSK9* gene by both SREBP-1 and SREBP-2 in HepG2 cells, and it was proposed that the predominant transcriptional regulator of *PCSK9* by cholesterol is SREBP-2 *in vivo* (23). Accordingly, our data on intestinal epithelial cells showed that the administration of sterols reduced SREBP-2 transcripts while decreasing *PCSK9* mRNA and protein expression. On the other hand, depletion of cholesterol content in Caco-2/15 cells by cyclodextrin raised the levels of mRNA and protein mass of *PCSK9* and LDLr. As expected, the changes of SREBP-2 and *PCSK9* in Caco-2/15 cells paralleled the alterations in mRNA encoding HMG-CoA reductase, the key cholesterol biosynthetic enzyme. These results might suggest that *PCSK9* would be under the control of SREBP-2 in Caco-2/15 cells, as is the case for LDLr and HMG CoA reductase (11-13).

Bile acids are amphiphilic molecules synthesized from cholesterol exclusively in the liver, represent the major route for removal of excess cholesterol from the body and are essential for effective absorption of dietary fat (25). In addition to their classical role, bile acids modulate the transcription of many genes partly via the activation of the nuclear FXR (7,30). In the current experiments, we employed taurocholate and deoxycholate, two important bile acids. According to our data in Caco-2/15 cells, taurocholate brought about a decrease in the mRNA expression of *PCSK9*, whereas deoxycholate enhanced that of *PCSK9* and LDLr along with a lessening of FXR mRNA. The distinct effects of bile acids on *PCSK9* mRNA expression were also noted in another study on human hepatocytes that showed a repression by chenodeoxycholic acid, an induction by deoxycholic acid and no influence with cholic acid and ursodeoxycholic acid (29). Further work is needed to explore whether these separate impacts on *PCSK9* may be due to the potential activation by bile acids of other nuclear receptors such as pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and vitamin D receptor in addition to FXR (44, 47).

AKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grants MOP 49433 to EL and 36496 to NGS). The authors thank Mrs. Schohraya Spahis for her technical assistance.

REFERENCES

1. **Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, and Boileau C.** Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34: 154-156, 2003.
2. **Attie AD, and Seidah NG.** Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab* 1: 290-292, 2005.
3. **Bedi M, Niesen M, and Lopez D.** Inhibition of squalene synthase upregulates PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 470: 116-119, 2008.
4. **Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie AD, Rader DJ, Boileau C, Brissette L, Chretien M, Prat A, and Seidah NG.** NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* 279: 48865-48875, 2004.
5. **Brown MS, and Goldstein JL.** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340, 1997.
6. **Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, and Leren TP.** Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* 15: 1551-1558, 2006.
7. **Cariou B, and Staels B.** FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol Sci* 28: 236-243, 2007.
8. **Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, Staels B, and Krempf M.** Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory elementbinding protein 1c. *J Biol Chem* 281: 6211-6218, 2006.

9. **Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, and Qiu X.** Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14: 413-419, 2007.
10. **Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, and Prat A.** Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1454-1459, 2004.
11. **Field FJ, Born E, Murthy S, and Mathur SN.** Regulation of sterol regulatory element-binding proteins by cholesterol flux in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 42: 1687-1698, 2001.
12. **Field FJ, Fujiwara D, Born E, Chappell DA, and Mathur SN.** Regulation of LDL receptor expression by luminal sterol flux in CaCo-2 cells. *Arterioscler Thromb* 13: 729-737, 1993.
13. **Field FJ, Shreves T, Fujiwara D, Murthy S, Albright E, and Mathur SN.** Regulation of gene expression and synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 32: 1811-1821, 1991.
14. **Goldstein JL, and Brown MS.** The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu Rev Genet* 13: 259-289, 1979.
15. **Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E, Sane A, Tremblay E, Garofalo C, and Levy E.** Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1178-1189, 2007.
16. **Grozdanov PN, Petkov PM, Karagyozov LK, and Dabeva MD.** Expression and localization of PCSK9 in rat hepatic cells. *Biochem Cell Biol* 84: 80-92, 2006.

17. **Hansen GH, Immerdal L, Thorsen E, Niels-Christiansen LL, Nystrom BT, Demant EJ, and Danielsen EM.** Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J Biol Chem* 276: 32338-32344, 2001.
18. **Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Thorsen E, Immerdal L, and Danielsen EM.** Cholesterol depletion of enterocytes. Effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J Biol Chem* 275: 5136-5142, 2000.
19. **Homer VM, Marais AD, Charlton F, Laurie AD, Hurndell N, Scott R, Mangili F, Sullivan DR, Barter PJ, Rye KA, George PM, and Lambert G.** Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis* 196: 659-666, 2008.
20. **Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH.** Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 32: 71-77, 2007.
21. **Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, and Goldstein JL.** Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12027-12032, 2003.
22. **Ilangumaran S, and Hoessli DC.** Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335 (Pt 2): 433-440, 1998.
23. **Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, and Park SW.** Steroldependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res* 49: 399-409, 2008.
24. **Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, and Rothblat GH.** Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-17256, 1995.

25. **Kuipers F, Stroeve JH, Caron S, and Staels B.** Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Curr Opin Lipidol* 18: 289-297, 2007.
26. **Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, and Horton JD.** Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 116: 2995-3005, 2006.
27. **Lambert G.** Unravelling the functional significance of PCSK9. *Curr Opin Lipidol* 18: 304-309, 2007.
28. **Lambert G, Jarnoux AL, Pineau T, Pape O, Chetiveaux M, Laboisie C, Krempf M, and Costet P.** Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology* 147: 4985-4995, 2006.
29. **Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, and Cariou B.** Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett* 582: 949-955, 2008.
30. **Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, and Zhang Y.** FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 31: 572-580, 2006.
31. **Levy E, Menard D, Suc I, Delvin E, Marcil V, Brissette L, Thibault L, and Bendayan M.** Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci* 117: 327-337, 2004.
32. **Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, and Bendayan M.** Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem* 277: 16470-16477, 2002.
33. **Maxwell KN, and Breslow JL.** Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7100-7105, 2004.

34. **Maxwell KN, and Breslow JL.** Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol* 16: 167-172, 2005.
35. **Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, and Breslow JL.** Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res* 44: 2109-2119, 2003.
36. **McNutt MC, Lagace TA, and Horton JD.** Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem* 282: 20799-20803, 2007.
37. **Montoudis A, Seidman E, Boudreau F, Beaulieu JF, Menard D, Elchebly M, Mailhot G, Sane AT, Lambert M, Delvin E, and Levy E.** Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. *J Lipid Res* 49: 961-972, 2008.
38. **Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, McPherson PS, Attie AD, Prat A, and Seidah NG.** The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* 8: 718-732, 2007.
39. **Park SW, Moon YA, and Horton JD.** Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem* 279: 50630-50638, 2004.
40. **Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, and Seidah NG.** The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem* 283: 2363-2372, 2008.
41. **Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D, Beaulieu JF, and Levy E.** Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 47: 2112-2120, 2006.

42. **Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, and Chretien M.** The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 928-933, 2003.
43. **Seidah NG, and Prat A.** The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 85: 685-696, 2007.
44. **Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, and Kliewer SA.** The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3369-3374, 2001.
45. **Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, and Soutar AK.** Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet* 14: 1161-1169, 2005.
46. **Turley SD, and Dietschy JM.** Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol* 14: 233-240, 2003.
47. **Zollner G, Marschall HU, Wagner M, and Trauner M.** Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3: 231-251, 2006.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Influence of cholesterol (solubilised in albumin) incubated for 24 hours on gene and protein expressions of PCSK9 and LDLr in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of cholesterol on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting, respectively. The control cells were incubated with albumin only. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controls.

Figure 2 Effect of cholesterol (solubilised in bile acid micelles) incubated for 24 hours on gene and protein expressions of PCSK9 and LDLr intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of micellar cholesterol on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting, respectively. The control cells were incubated with bile acid micelles only. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments. * $p < 0,05$ vs micelles.

Figure 3 Effect of 25-hydroxycholesterol (solubilised in albumin) incubated for 24 hours on gene and protein expressions of PCSK9 and LDLr in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of 25-hydroxycholesterol on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting,

respectively. The control cells were incubated with albumin only. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controls.

Figure 4

Impact of micellar cholesterol and 25-hydroxycholesterol incubated for 24 hours on HMG-CoA reductase and SREBP-2 expression in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of cholesterol and 25-hydroxycholesterol on transcript levels of HMG-CoA reductase by RT-PCR and SREBP-2 by Western blot. The control cells were incubated with bile acid micelles. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs micelles.

Figure 5

Regulation of PCSK9, LDLr, HMG-CoA reductase and SREBP-2 expression by hydroxypropyl- β -cyclodextrine in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of hydroxypropyl- β -cyclodextrine on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting, respectively. The transcripts of HMG-CoA reductase and protein mass of SREBP-2 were also assessed. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controls. † $< 0,05$; ‡ $< 0,01$ vs cyclodextrin.

- Figure 6** Modulation of PCSK9 and LDLr gene and protein expression by 4,8mM taurocholate incubated for 24 hours in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of taurocholate on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting, respectively. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments. ** $p < 0,01$ vs controls.
- Figure 7** Modulation of PCSK9 and LDLr gene and protein expression by 250 μ M deoxycholate incubated for 24 hours in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of deoxycholate on transcript levels and protein mass of PCSK9 and LDLr by RT-PCR and Western blotting, respectively. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controls.
- Figure 8** Modulation of HMG-CoA reductase, FXR and SREBP-2 expression by 4,8mM taurocholate and 250 μ M deoxycholate incubated for 24 hours in intestinal epithelial cells. Caco-2/15 cells were incubated with fresh medium, allowed to grow and differentiate, and tested for the effects of taurocholate and deoxycholate on HMG-CoA reductase and FXR transcript levels by RT-PCR, as well as on SREBP-2 protein mass by Western blot. Values are expressed as means \pm SEM for 3 different experiments. * $p < 0,05$ vs controls.

Figure 1

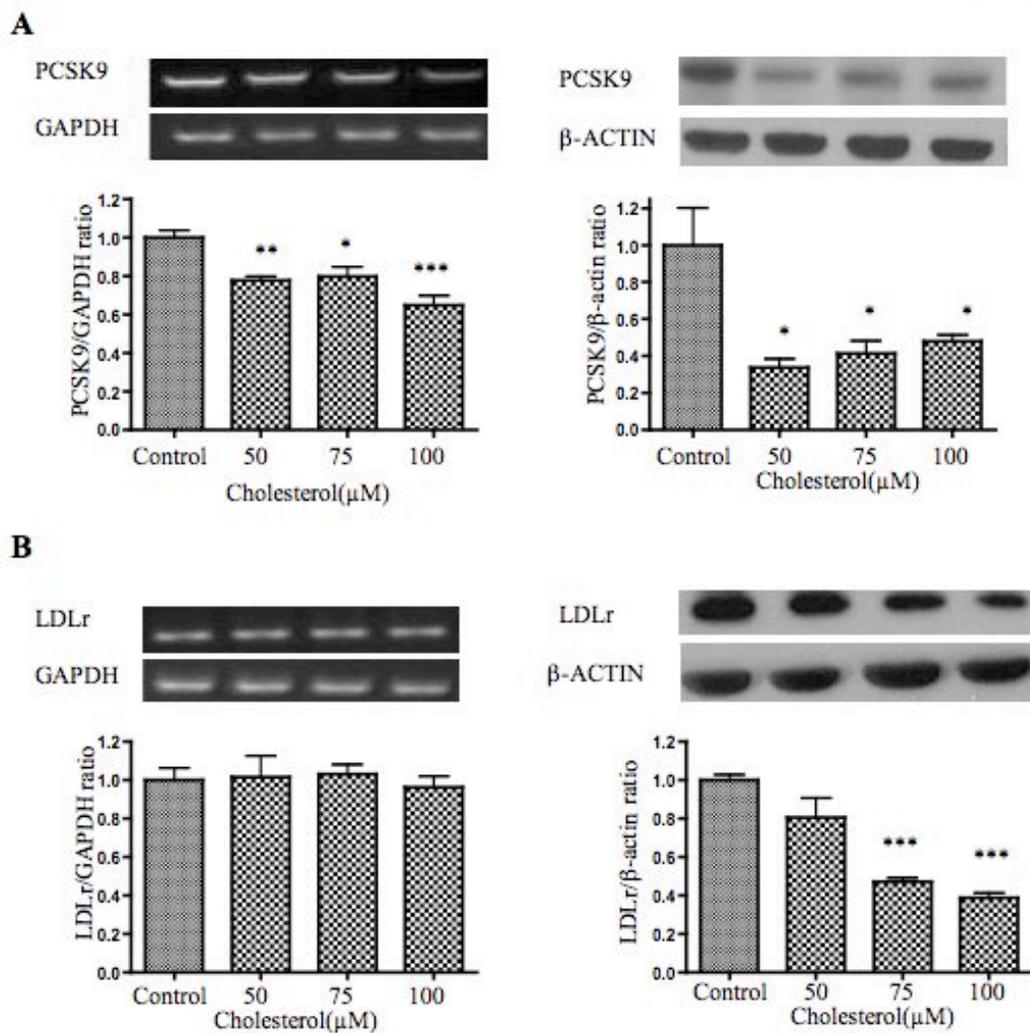


Figure 2

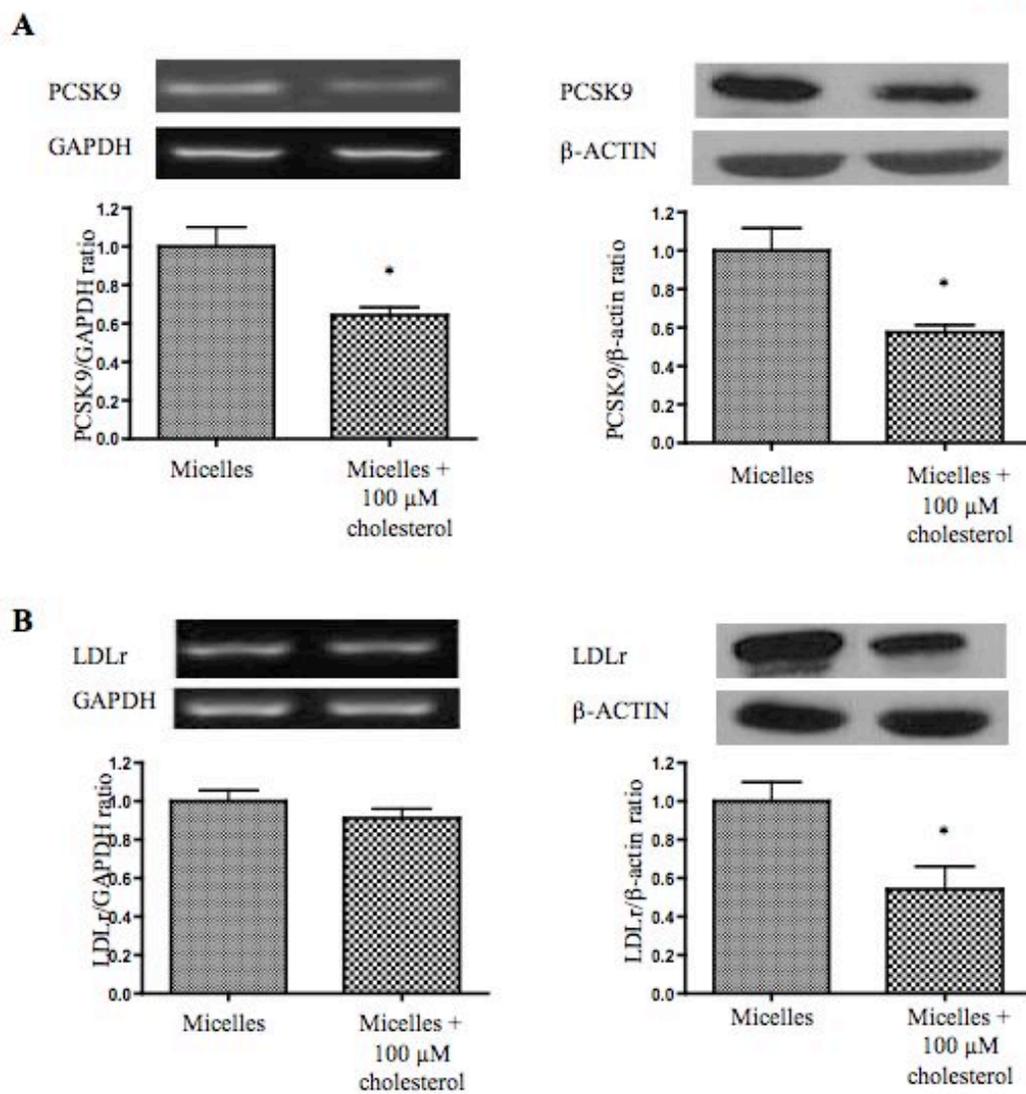


Figure 3

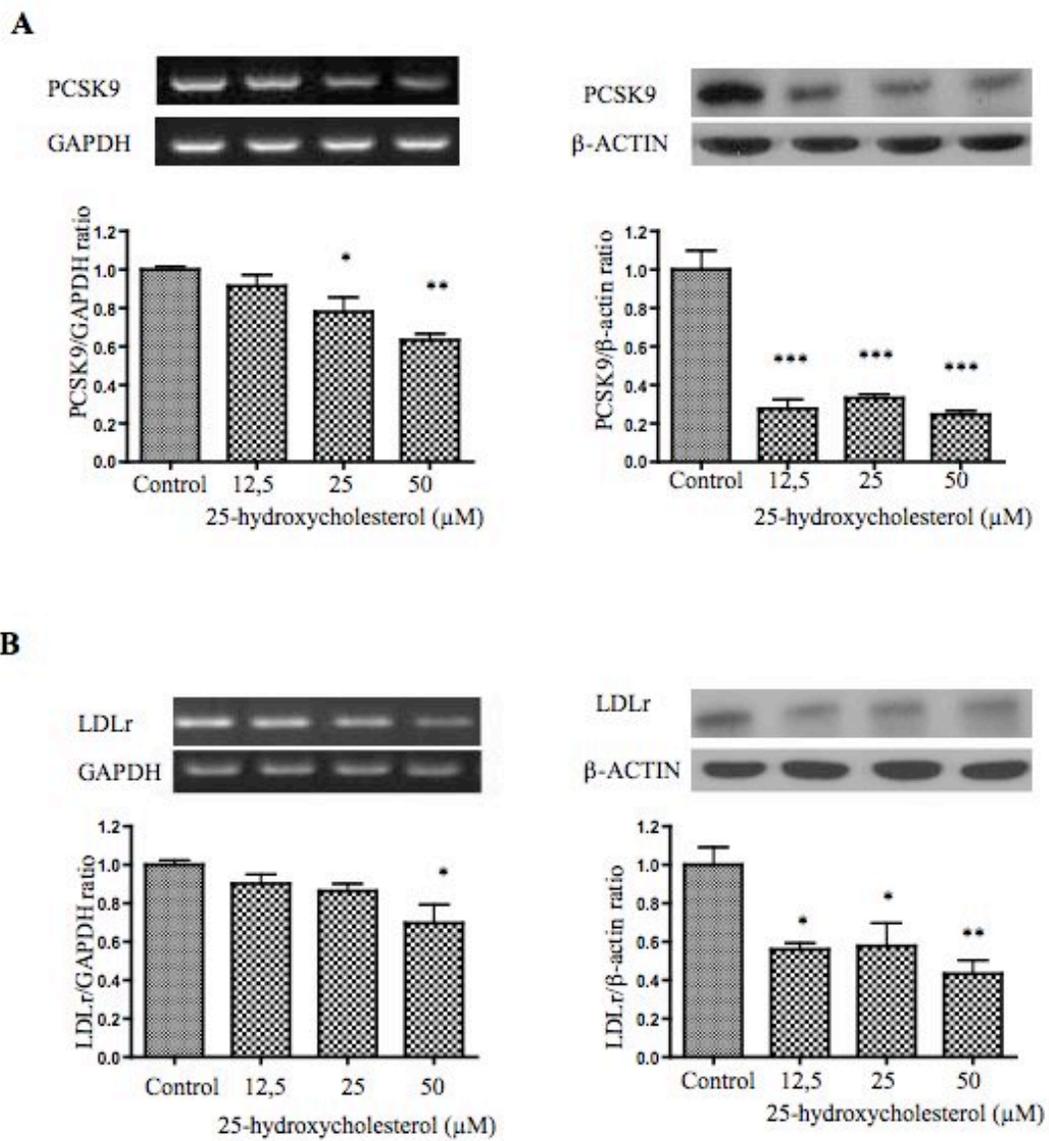


Figure 4

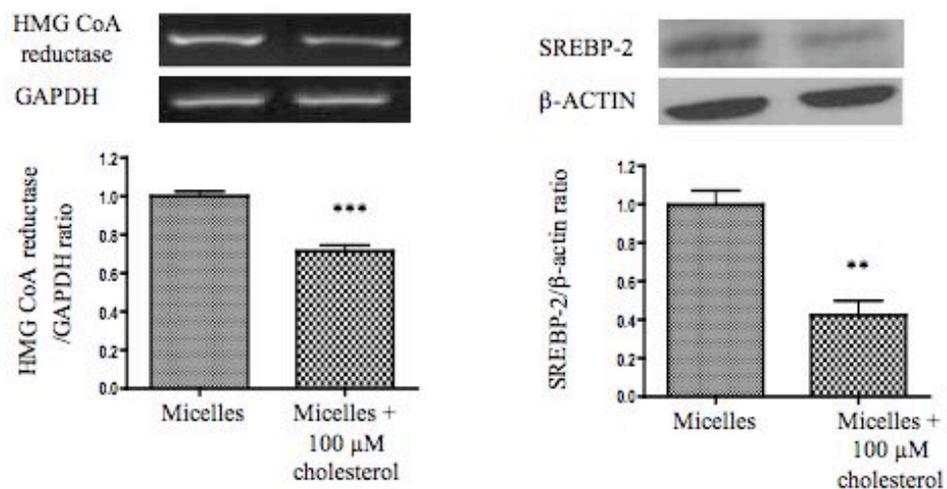
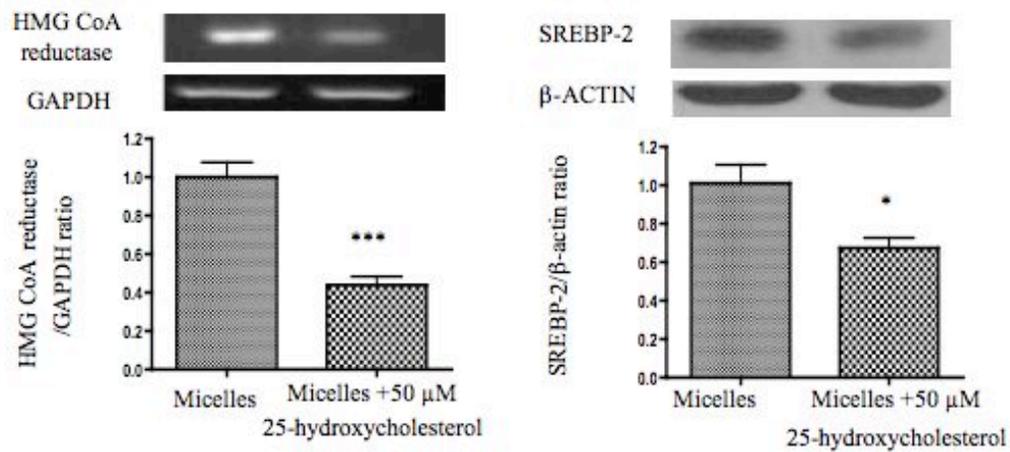
A: Effect of cholesterol**B: Effect of 25-hydroxycholesterol**

Figure 5

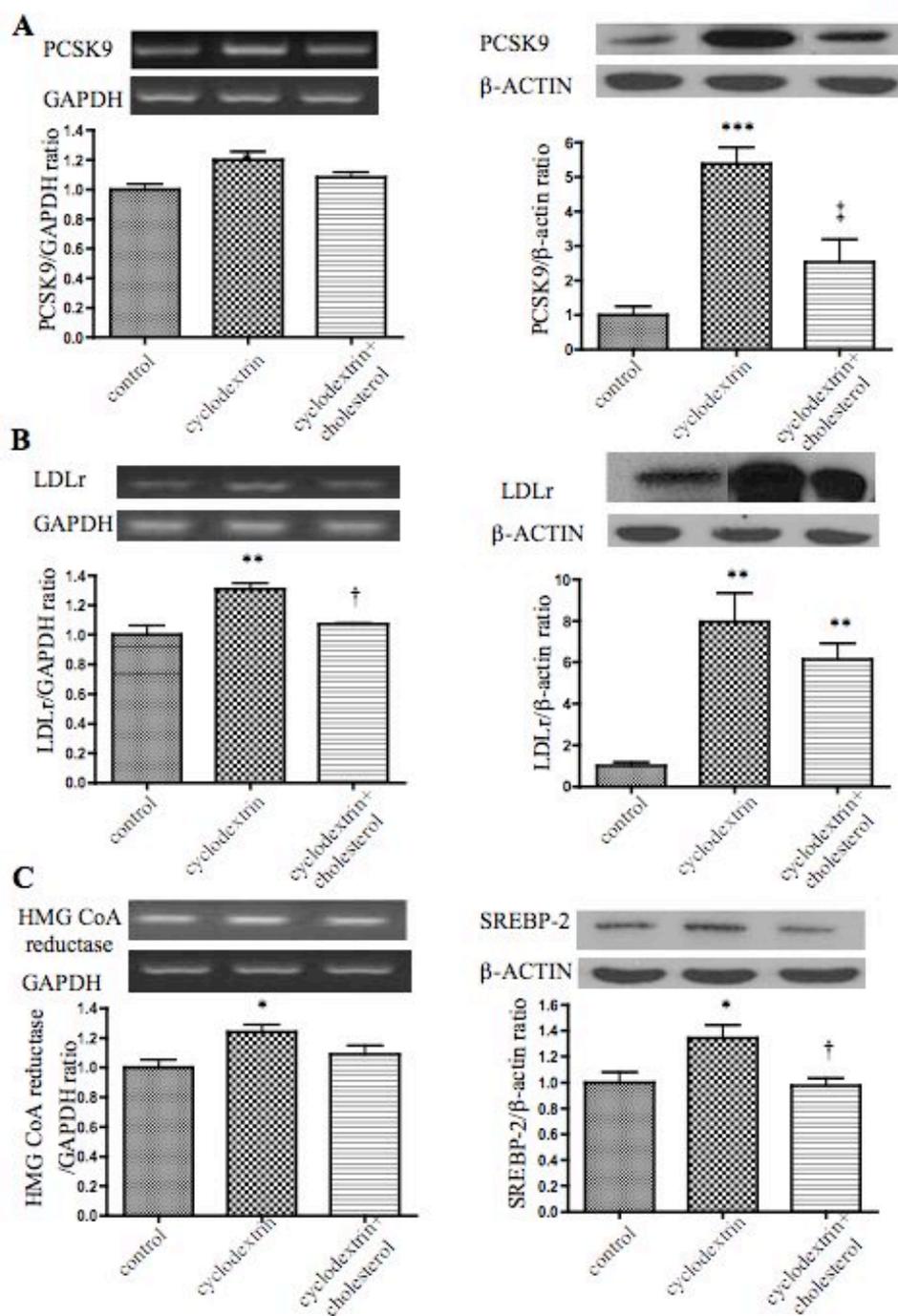


Figure 6

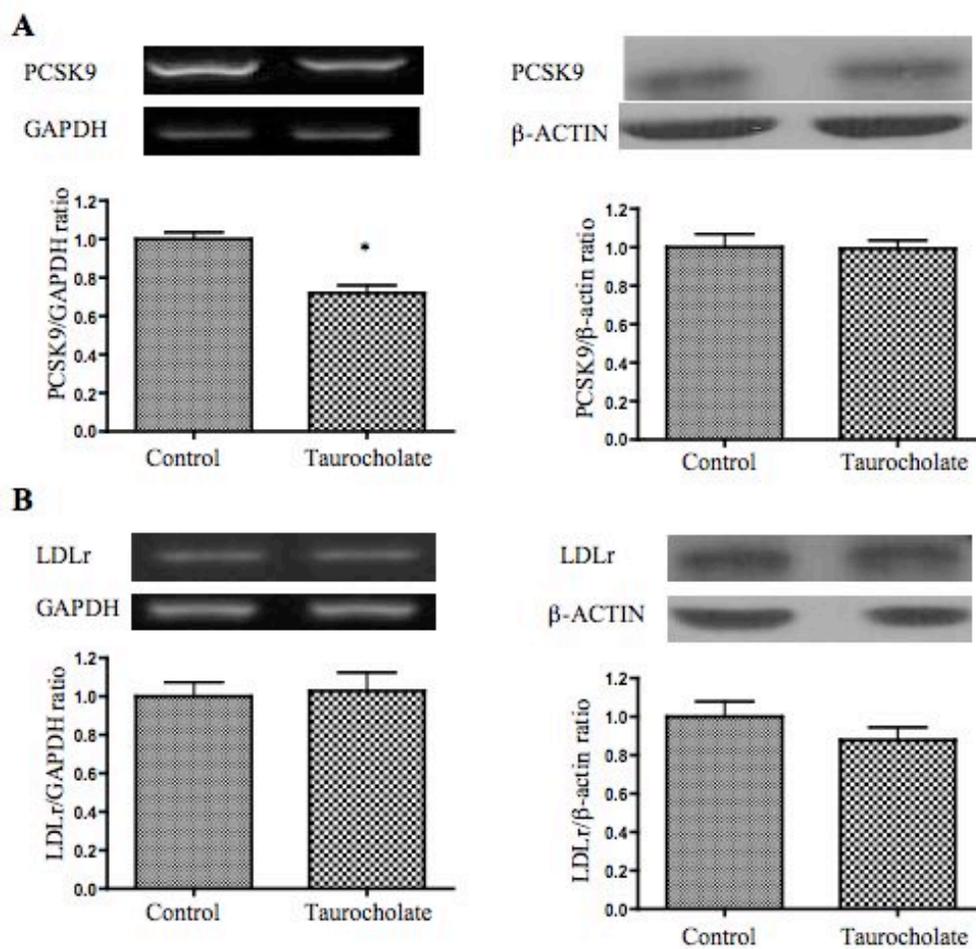


Figure 7

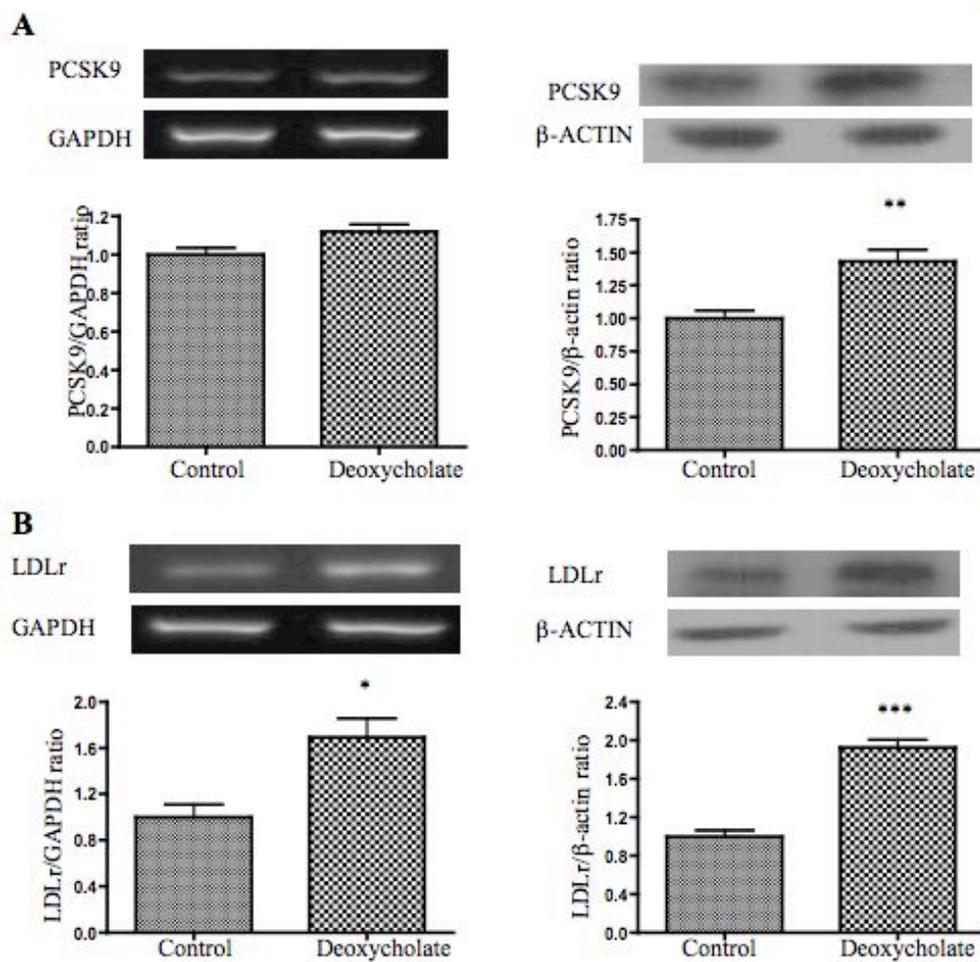
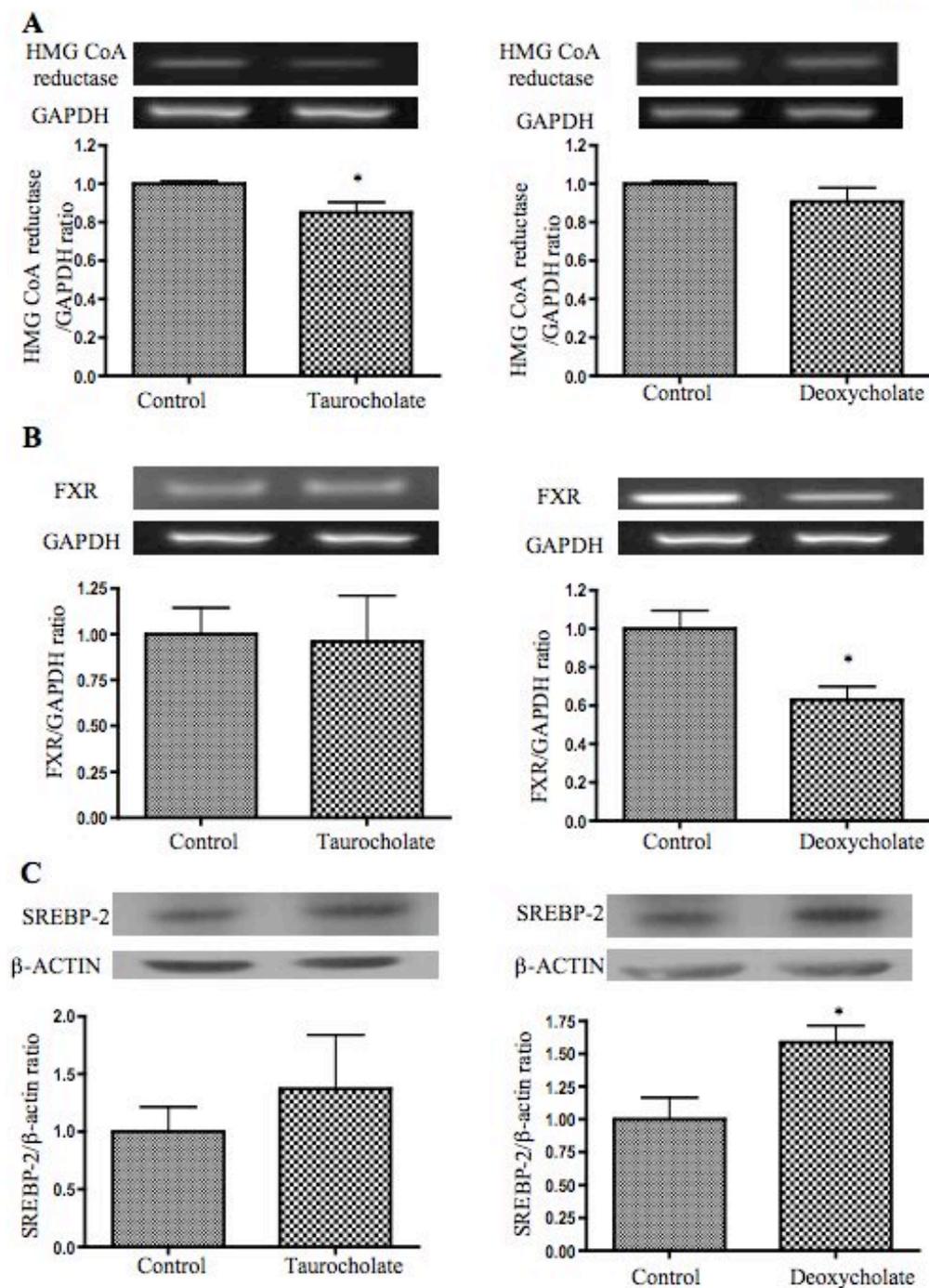


Figure 8



III. DISCUSSION

Malgré des avancées importantes, des études supplémentaires sont encore nécessaires pour bien comprendre les mécanismes moléculaires complexes qui contrôlent l'homéostasie du cholestérol particulièrement dans l'intestin. Une opportunité remarquable a été récemment offerte par la découverte de la PCSK9 qui montre des fonctions variées, incluant la dégradation du LDLr hépatique. Étant donné que, d'un côté, l'intestin grêle possède une grande capacité d'absorption des lipides tout en étant en mesure d'élaborer la majorité des lipoprotéines, et, d'un autre côté, il subit l'action de divers hormones et nutriments pour le contrôle du métabolisme des lipides, le manque de données sur la régulation de la PCSK9 dans le tractus gastro-intestinal demeure déconcertant.

L'objectif de cette étude était d'étudier la régulation de la PCSK9 au niveau intestinal. Pour ce faire, nous avons utilisé un clone de la lignée cellulaire Caco-2, soit les cellules Caco-2/15, pour effectuer nos expériences. La lignée intestinale Caco-2 a été produite à partir d'adénocarcinomes de côlon en 1977 [239], et constitue depuis un modèle idéal de cellules intestinales épithéliales différenciées largement utilisé [3, 234, 236, 240, 241]. D'autres lignées intestinales existantes auraient pu être utilisées (HIEC ou HT-29 par exemple), cependant, il a été montré que la lignée Caco-2 est un excellent modèle pour l'étude du métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol dans l'intestin [242]. Étant donné que la PCSK9 est impliquée dans ces processus, la lignée Caco-2 apparaissait donc comme le choix privilégié pour la réalisation de cette étude. Le clone numéro 15 de la lignée Caco-2 a montré une expression accrue de certaines enzymes clés utilisées pour étudier la différenciation des cellules épithéliales intestinales (lactase, sucrase / isomaltase et la phosphatase alcaline) [243]. La lignée Caco-2/15 a d'ailleurs été utilisée récemment dans notre laboratoire pour une autre étude sur le

métabolisme intestinal du cholestérol [244], c'est pourquoi nous l'avons choisi.

Puisque la PCSK9 est connue pour jouer un rôle dans le métabolisme du cholestérol, nous avons voulu déterminer l'impact de la présence de cholestérol et de molécules dérivées sur son expression. Tout d'abord, nous avons choisi le cholestérol et le 25-hydroxycholestérol. Ce dernier constitue un métabolite naturel dans la formation des acides biliaires à partir du cholestérol [245], et le 25-hydroxycholestérol a la capacité de moduler le SREBP par un mécanisme légèrement différent du cholestérol [246]. Le 25-hydroxycholestérol est couramment utilisé dans des études *in vitro* étant donné son efficacité à diminuer le SREBP [236, 240, 241, 247, 248]. Ensuite, l'utilisation de la cyclodextrine a permis de montrer l'effet inverse du cholestérol puisque cette molécule est reconnue pour séquestrer le cholestérol des cellules grâce à la présence de grandes cavités lipophiles permettant d'y loger les molécules hydrophobes [249]. La cyclodextrine constitue une approche rapide et hautement efficace pour extraire le cholestérol de la membrane plasmique [250, 251], sans pour autant affecter le profil des autres composantes externes et internes [252]. Finalement, les acides biliaires, qui représentent la voie d'excrétion du cholestérol (voir section 1.1.2.4), ont récemment montré un effet sur la PCSK9 hépatique [230]. Nous avons donc choisi d'investiguer aussi ces dérivés du cholestérol dans notre modèle intestinal.

D'après nos résultats, la PCSK9 répond à un éventail de stimuli émanant du pôle apical, à savoir les stérols, les acides biliaires et la cyclodextrine. Nos données ont clairement démontré que la présence de stérols dans l'entérocyte engendre la diminution des expressions génique et protéique de la PCSK9. Inversement, la perte du contenu cellulaire en cholestérol provoquée par la cyclodextrine a activé sa transcription. De façon analogue, la littérature rapporte la diminution de l'expression de la PCSK9 par le

cholestérol alimentaire au niveau du foie de souris [149]. Réciproquement, la neutralisation de la synthèse du cholestérol par les statines dans les cellules hépatiques a produit une induction marquée de l'expression de la PCSK9, et cette induction a par contre été renversée efficacement par l'ajout de mévalonate [177]. Ces observations combinées suggèrent que (i) la régulation de l'expression de la PCSK9 est dépendante de la présence ou l'absence de stérols non seulement dans les hépatocytes, mais aussi dans les cellules intestinales épithéliales; et (ii) la modulation de la PCSK9 par les stérols, autant par l'apport endogène qu'exogène, prend place au niveau transcriptionnel.

La PCSK9 est capable de moduler de façon majeure l'expression protéique du LDLr et les niveaux de LDL-C dans le plasma. Il a été démontré que des mutations de la PCSK9 avec gain de fonction provoquent une diminution de 23% de l'expression protéique des LDLr de surface et d'environ 38% de l'internalisation des LDL, contrairement aux mutations pertes de fonction qui sont associées à des hausses de 16% des LDLr à la surface cellulaire et de 35% de l'internalisation des LDL [91]. Apparemment, l'activité catalytique de la PCSK9 ne serait pas requise pour la dégradation du LDLr, mais serait essentielle pour l'activation et la sécrétion de la PCSK9 [93, 134, 171]. Dans nos travaux avec les cellules Caco-2/15, l'expression protéique du LDLr a montré les mêmes tendances que la PCSK9 dans des conditions de surplus ou de déficience de stérols. En considérant que la fonction primaire de la PCSK9 est de promouvoir la dégradation du LDLr [110], l'analogie de la modulation de la PCSK9 et du LDLr par les stérols est étonnante. Effectivement, peu de travaux antérieurs ont rapporté un comportement similaire des deux protéines dans les cellules HepG2 [186, 203]. Il est possible de proposer qu'un facteur intracellulaire coordonne la régulation réciproque et que son absence des cellules HepG2 et Caco-2 élimine les différences. Néanmoins, d'autres groupes de recherche n'ont pas retrouvé une régulation réciproque de la PCSK9 et du LDLr. Par exemple, l'inhibition

de la squalène synthase augmente autant l'expression hépatique de la PCSK9 que du LDLr chez des rats [220] et aucune relation inverse n'a été observée entre la PCSK9 et le LDLr dans une lignée hépatique de rat [166].

La PCSK9 a été identifiée comme étant un gène activé par les SREBP [149, 150]. Les SREBP sont membres de la famille des facteurs de transcription avec des motifs basiques hélice-boucle-hélice et «zipper» à leucine qui régulent l'expression de leurs gènes cibles par la liaison au SRE de leur promoteur [253]. Dubuc et al. [177] ont démontré que la transcription de la PCSK9 était augmentée par les statines, possiblement via l'activation de SREBP-2 dans des cultures primaires d'hépatocytes humains. Les chercheurs ont proposé l'importance de la conservation du SRE dans le promoteur du gène de la PCSK9 chez l'humain, la souris et le rat. Par la suite, son expression a été trouvée dépendante de l'absence ou la présence de stérols via le SRE du promoteur, et ce pour SREBP-1 et SREBP-2 dans les cellules HepG2. C'est le SREBP-2 qui est proposé comme déterminant pour la régulation du métabolisme du cholestérol *in vivo* [203]. En accord avec ces études, nos résultats sur les cellules épithéliales intestinales ont montré que l'administration de stérols a réduit SREBP-2 tout en diminuant la PCSK9 (gène et protéine). Inversement, la déplétion de cholestérol dans les cellules Caco-2/15 par la cyclodextrine a haussé les quantités d'ARNm et de protéines de la PCSK9 et du LDLr. Comme prévu, les changements de SREBP-2 et de la PCSK9 dans le modèle Caco-2/15 ont corrélé avec les modifications de l'expression génique de la HMG CoA réductase, l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol. La PCSK9, comme le LDLr et la HMG CoA réductase, semble donc sous le contrôle de SREBP-2 dans les cellules intestinales Caco-2/15 [236, 240, 241].

Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles synthétisées à partir du cholestérol exclusivement dans le foie, et constituent la voie majeure pour l'élimination de l'excès de cholestérol dans l'organisme [58]. En plus de leur

rôle classique dans l'absorption des lipides alimentaires, les acides biliaires modulent la transcription de plusieurs gènes, en partie par l'activation du récepteur nucléaire FXR [55, 56]. Dans les présentes expériences, nous avons utilisé le taurocholate et le DCA, deux acides biliaires importants. D'après nos résultats, le taurocholate a montré une diminution de l'expression génique de la PCSK9, tandis que le DCA a activé la PCSK9 et le LDLr tout en diminuant l'ARNm du FXR. Ces effets distincts des acides biliaires sur l'expression de la PCSK9 ont été dernièrement rapportés dans des hépatocytes humains, à savoir une répression par le CDCA, une induction par le DCA et aucune influence par les acides CA et ursodéoxycholique [230]. Des études supplémentaires sont requises pour explorer si ces effets distincts sur la PCSK9 sont dus à l'activation potentiel d'autres récepteurs nucléaires tels que le PXR, le CAR et le récepteur de la vitamine D, en plus du FXR [65, 254].

Bien que la PCSK9 hépatique semble avoir une fonction des plus importantes dans l'organisme [156, 168], il n'en demeure pas moins que sa présence dans d'autres tissus reflète un rôle non négligeable. Par exemple, sa présence marquée au niveau de l'intestin [132] suggère une forte implication dans le métabolisme lipidique. La localisation particulière de l'entérocyte, qui lui permet d'interagir avec la lumière intestinale et la circulation sanguine, laisse présager une interaction possible avec certaines molécules apicales comme les transporteurs de cholestérol. Actuellement, aucune information n'est disponible sur la localisation intracellulaire de la PCSK9 dans l'entérocyte, des informations sur ce sujet permettraient de mieux comprendre son rôle dans l'intestin. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* où la PCSK9 sera inhibée ou surexprimée au niveau intestinal amèneront beaucoup de données sur le rôle de la PCSK9 intestinale. Par exemple, l'étude de protéines clés impliquées dans le métabolisme du cholestérol et le bilan sanguin de souris transgéniques surexprimant la PCSK9 intestinale ou présentant une inactivation spécifique à l'intestin de la PCSK9 pourraient

aider grandement à élucider son rôle et sa contribution systémique. L'utilisation de modèles *in vitro*, comme les cellules Caco-2, présentant une inhibition de l'expression de la PCSK9 par la technologie des ARN d'interférence seraient des plus utiles pour la compréhension mécanistique du fonctionnement de la PCSK9 intestinale. L'implication de la PCSK9 dans la différenciation et la maturation cellulaire a été démontrée à quelques reprises dans certains organes [132, 156, 168, 190]. Mais les informations demeurent limitées au niveau intestinal et des investigations sont requises pour élucider cet aspect. L'utilisation des modèles décrits plus haut pourrait s'avérer fort important dans l'étude du rôle de la PCSK9 dans la différenciation cellulaire.

Finalement, depuis la découverte de l'effet activateur des statines sur l'expression de la PCSK9 en 2004 [177], la majorité des efforts des groupes de recherche ont été consacrés à la compréhension des mécanismes d'action de cette convertase, ce qui permettrait ultimement d'inhiber son fonctionnement et de prévenir les MCV. Déjà des études *in vivo* ont montré des résultats prometteurs du côté du foie [181, 184]. Néanmoins, il demeure primordial de garder en tête que le foie et l'intestin, tous deux importants dans le métabolisme du cholestérol, sont différents dans leur comportement métabolique. On ne peut donc extrapoler les résultats du foie vers l'intestin quant à la PCSK9 sans en faire la preuve expérimentale.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. Stryer, L., J.M. Berg, and J.L. Tymoczko, Biochimie, Chapitre 26. 5e ed. 2003, Paris: Flammarion Médecine-Sciences.
2. Levy, E., et al., Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol*, 2007. 18(3): p. 310-8.
3. Sane, A.T., et al., Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*, 2006. 47(10): p. 2112-20.
4. Turley, S.D., The role of Niemann-Pick C1 - Like 1 (NPC1L1) in intestinal sterol absorption. *J Clin Lipidol*, 2008. 2(2): p. S20-S28.
5. Altmann, S.W., et al., Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 2004. 303(5661): p. 1201-4.
6. Davis, H.R., Jr., et al., Cholesterol homeostasis by the intestine: Lessons from Niemann-Pick C1 Like 1 [NPC1L1]. *Atheroscler Suppl*, 2008. 26: p. 26.
7. Kruit, J.K., et al., Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(40): p. 6429-39.
8. Hui, D.Y., E.D. Labonte, and P.N. Howles, Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. 294(4): p. G839-43.
9. Hussain, M.M., et al., Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol*, 2005. 16(3): p. 281-5.
10. Marcil, V., et al., [Digestive and absorptive processes of lipids]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2004. 28(12): p. 1257-66.
11. Tall, A.R., Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*, 2008. 263(3): p. 256-73.
12. Scriver, C.R., et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. 2001, New York: McGraw-Hill.
13. Oram, J.F. and A.M. Vaughan, ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2006. 99(10): p. 1031-43.
14. Davidson, M.H. and P.P. Toth, High-density lipoprotein metabolism: potential therapeutic targets. *Am J Cardiol*, 2007. 100(11 A): p. n32-40.
15. Yamamoto, T., et al., The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, 1984. 39(1): p. 27-38.

16. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, 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*, 1974. 249(16): p. 5153-62.
17. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986. 232(4746): p. 34-47.
18. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, 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 U S A*, 1973. 70(10): p. 2804-8.
19. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, 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 U S A*, 1974. 71(3): p. 788-92.
20. Brown, M.S., S.E. Dana, and J.L. Goldstein, Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 1974. 249(3): p. 789-96.
21. Russell, D.W., et al., Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, 1984. 37(2): p. 577-85.
22. Jeon, H. and S.C. Blacklow, Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*, 2005. 74: p. 535-62.
23. Francke, U., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(9): p. 2826-30.
24. Gent, J. and I. Braakman, Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2461-70.
25. Maurer, M.E. and J.A. Cooper, The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 20): p. 4235-46.
26. Garcia, C.K., et al., Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, 2001. 292(5520): p. 1394-8.
27. Traub, L.M., Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol*, 2003. 163(2): p. 203-8.

28. Pearse, B.M., Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *Embo J*, 1988. 7(11): p. 3331-6.
29. Ungewickell, E.J. and L. Hinrichsen, Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. 19(4): p. 417-25.
30. Beglova, N., et al., Cooperation between fixed and low pH-inducible interfaces controls lipoprotein release by the LDL receptor. *Mol Cell*, 2004. 16(2): p. 281-92.
31. Davis, C.G., et al., Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, 1987. 326(6115): p. 760-5.
32. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol*, 2008. 93(1): p. 27-42.
33. Lo Sasso, G., M. Petruzzelli, and A. Moschetta, A translational view on the biliary lipid secretory network. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(3): p. 79-96.
34. Goldstein, J.L., R.B. Rawson, and M.S. Brown, Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2002. 397(2): p. 139-48.
35. Sakai, J., et al., Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell*, 1998. 2(4): p. 505-14.
36. Yang, T., et al., Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, 2002. 110(4): p. 489-500.
37. Feramisco, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): p. 8487-96.
38. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002. 109(9): p. 1125-31.
39. Chinetti-Gbaguidi, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. *Curr Opin Pharmacol*, 2005. 5(2): p. 177-83.
40. Vidal, H., [PPAR receptors: recent data]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2005. 66(2 Pt 2): p. 1S5-9.

41. Lefebvre, P., et al., Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*, 2006. 116(3): p. 571-80.
42. Marx, N., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*, 2004. 94(9): p. 1168-78.
43. Edwards, P.A., M.A. Kennedy, and P.A. Mak, LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol*, 2002. 38(4): p. 249-56.
44. Ory, D.S., Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res*, 2004. 95(7): p. 660-70.
45. Makishima, M., et al., Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 1999. 284(5418): p. 1362-5.
46. Parks, D.J., et al., Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 1999. 284(5418): p. 1365-8.
47. Wang, H., et al., Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, 1999. 3(5): p. 543-53.
48. Sinal, C.J., et al., Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*, 2000. 102(6): p. 731-44.
49. Davis, R.A., et al., Regulation of cholesterol-7alpha-hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res*, 2002. 43(4): p. 533-43.
50. Russell, D.W., The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2003. 72: p. 137-74.
51. Duran-Sandoval, D., et al., Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*, 2004. 53(4): p. 890-8.
52. Ma, K., et al., Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*, 2006. 116(4): p. 1102-9.
53. Zhang, Y., et al., Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(4): p. 1006-11.
54. Lambert, G., et al., The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*, 2003. 278(4): p. 2563-70.
55. Lee, F.Y., et al., FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(10): p. 572-80.
56. Cariou, B. and B. Staels, FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(5): p. 236-43.
57. Fiorucci, S., et al., Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med*, 2007. 13(7): p. 298-309.

58. Kuipers, F., et al., Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Curr Opin Lipidol*, 2007. 18(3): p. 289-97.
59. Huang, W., et al., Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*, 2006. 312(5771): p. 233-6.
60. Chen, F., et al., Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology*, 2004. 126(3): p. 756-64.
61. Liu, Y., et al., Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*, 2003. 112(11): p. 1678-87.
62. Moschetta, A., A.L. Bookout, and D.J. Mangelsdorf, Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med*, 2004. 10(12): p. 1352-8.
63. Inagaki, T., et al., Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(10): p. 3920-5.
64. Goodwin, B., et al., Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(1): p. 223-8.
65. Staudinger, J.L., et al., The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(6): p. 3369-74.
66. Makishima, M., et al., Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*, 2002. 296(5571): p. 1313-6.
67. Guo, G.L., et al., Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem*, 2003. 278(46): p. 45062-71.
68. Zhang, J., et al., The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem*, 2004. 279(47): p. 49517-22.
69. Fredrickson, D.S., R.I. Levy, and R.S. Lees, Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*, 1967. 276(1): p. 34-42 contd.
70. Goldstein, J.L., H.H. Hobbs, and M.S. Brown, *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Chapter 120. 8 ed. Vol. 2. 2001: McGraw-Hill.

71. Moorjani, S., et al., Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. *Arteriosclerosis*, 1989. 9(2): p. 211-6.
72. Tosi, I., et al., Genetic defects causing familial hypercholesterolaemia: identification of deletions and duplications in the LDL-receptor gene and summary of all mutations found in patients attending the Hammersmith Hospital Lipid Clinic. *Atherosclerosis*, 2007. 194(1): p. 102-11.
73. Varret, M., et al., Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*, 2008. 73(1): p. 1-13.
74. Newton, C.R., et al., Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(7): p. 2503-16.
75. Taylor, A., et al., Multiplex ARMS analysis to detect 13 common mutations in familial hypercholesterolaemia. *Clin Genet*, 2007. 71(6): p. 561-8.
76. Leigh, S.E., et al., Update and Analysis of the University College London Low Density Lipoprotein Receptor Familial Hypercholesterolemia Database. *Ann Hum Genet*, 2008. 3: p. 3.
77. Innerarity, T.L., et al., Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(19): p. 6919-23.
78. Defesche, J.C., et al., Familial defective apolipoprotein B-100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med*, 1993. 153(20): p. 2349-56.
79. Haddad, L., et al., Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred. *J Lipid Res*, 1999. 40(6): p. 1113-22.
80. Varret, M., et al., A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*, 1999. 64(5): p. 1378-87.
81. Hunt, S.C., et al., Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(4): p. 1089-93.
82. Abifadel, M., et al., Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003. 34(2): p. 154-6.
83. Timms, K.M., et al., A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*, 2004. 114(4): p. 349-53.

84. Leren, T.P., Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*, 2004. 65(5): p. 419-22.
85. Cohen, J., et al., Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*, 2005. 37(2): p. 161-5.
86. Yang, K.C., et al., LDLR and ApoB are major genetic causes of autosomal dominant hypercholesterolemia in a Taiwanese population. *J Formos Med Assoc*, 2007. 106(10): p. 799-807.
87. Sirois, F., et al., Ethnic Differences in the Frequency of the Cardioprotective C679X PCSK9 Mutation in a West African Population. *Genet Test*, 2008. 24: p. 24.
88. Tarugi, P., et al., Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis*, 2007. 195(2): p. e19-27.
89. Willer, C.J., et al., Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet*, 2008. 40(2): p. 161-9.
90. Benjannet, S., et al., NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*, 2004. 279(47): p. 48865-75.
91. Cameron, J., et al., Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(9): p. 1551-8.
92. Holla, O.L., et al., Low-density lipoprotein receptor activity in Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes from heterozygotes for the D374Y mutation in the PCSK9 gene. *Scand J Clin Lab Invest*, 2006. 66(4): p. 317-28.
93. Homer, V.M., et al., Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis*, 2008. 196(2): p. 659-66.
94. Pandit, S., et al., Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, 2008. 49(6): p. 1333-43.
95. Cameron, J., et al., Characterization of novel mutations in the catalytic domain of the PCSK9 gene. *J Intern Med*, 2008. 263(4): p. 420-31.
96. Allard, D., et al., Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, 2005. 26(5): p. 497.

97. Naoumova, R.P., et al., Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(12): p. 2654-60.
98. Humphries, S.E., et al., Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet*, 2006. 43(12): p. 943-9.
99. Bourbon, M., et al., Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis*, 2008. 196(2): p. 633-42.
100. Kotowski, I.K., et al., A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*, 2006. 78(3): p. 410-22.
101. Chen, S.N., et al., A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(10): p. 1611-9.
102. Evans, D. and F.U. Beil, The E670G SNP in the PCSK9 gene is associated with polygenic hypercholesterolemia in men but not in women. *BMC Med Genet*, 2006. 7(1): p. 66.
103. Abboud, S., et al., Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Gene Is a Risk Factor of Large-Vessel Atherosclerosis Stroke. *PLoS ONE*, 2007. 2(10): p. e1043.
104. Tai, E.S., et al., Compound heterozygous familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100 produce exaggerated hypercholesterolemia. *Clin Chem*, 2001. 47(3): p. 438-43.
105. Pisciotta, L., et al., Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2006. 186(2): p. 433-40.
106. Burnett, J.R. and A.J. Hooper, Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL Cholesterol. *Clin Biochem Rev*, 2008. 29(1): p. 11-26.
107. Schmidt, R.J., et al., A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *DNA Cell Biol*, 2008. 27(4): p. 183-9.
108. Cohen, J.C., et al., Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*, 2006. 354(12): p. 1264-72.

109. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Biomedicine*. Lowering LDL--not only how low, but how long? *Science*, 2006. 311(5768): p. 1721-3.
110. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism*. *Trends Biochem Sci*, 2007. 32(2): p. 71-7.
111. Shioji, K., et al., Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese. *J Hum Genet*, 2004. 49(2): p. 109-14.
112. Yue, P., et al., The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum Mutat*, 2006. 27(5): p. 460-6.
113. Fasano, T., et al., A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(3): p. 677-81.
114. Hallman, D.M., et al., Relation of PCSK9 mutations to serum low-density lipoprotein cholesterol in childhood and adulthood (from The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol*, 2007. 100(1): p. 69-72.
115. Berge, K.E., L. Ose, and T.P. Leren, Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(5): p. 1094-100.
116. Scartezini, M., et al., The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men. *Clin Sci (Lond)*, 2007. 113(11): p. 435-41.
117. Kostrzewa, G., et al., Effect of protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 46L gene polymorphism on LDL cholesterol concentration in a Polish adult population. *Mol Genet Metab*, 2008. 13: p. 13.
118. Polisecki, E., et al., Genetic variation at the PCSK9 locus moderately lowers low-density lipoprotein cholesterol levels, but does not significantly lower vascular disease risk in an elderly population. *Atherosclerosis*, 2008. 7: p. 7.
119. Cohen, J.C., et al., Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med*, 2006. 354(12): p. 1264-72.
120. Miyake, Y., et al., Genetic variants in PCSK9 in the Japanese population: rare genetic variants in PCSK9 might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis*, 2008. 196(1): p. 29-36.

121. Hooper, A.J., et al., The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*, 2007. 193(2): p. 445-8.
122. Damgaard, D., et al., 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*, 2004. 177(2): p. 415-22.
123. Chater, R., et al., Mutational heterogeneity in low-density lipoprotein receptor gene related to familial hypercholesterolemia in Morocco. *Clin Chim Acta*, 2006. 16: p. 16.
124. Cohen, J.C., et al., Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*, 2003. 14(2): p. 121-7.
125. Wilund, K.R., et al., Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet*, 2002. 11(24): p. 3019-30.
126. Eden, E.R., et al., Restoration of LDL receptor function in cells from patients with autosomal recessive hypercholesterolemia by retroviral expression of ARH1. *J Clin Invest*, 2002. 110(11): p. 1695-702.
127. Soutar, A.K., R.P. Naoumova, and L.M. Traub, Genetics, clinical phenotype, and molecular cell biology of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(11): p. 1963-70.
128. Khatib, A.M., et al., Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, 2002. 160(6): p. 1921-35.
129. Scamuffa, N., et al., Proprotein convertases: lessons from knockouts. *Faseb J*, 2006. 20(12): p. 1954-63.
130. Seidah, N.G. and A. Prat, The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med*, 2007. 85(7): p. 685-96.
131. Seidah, N.G. and M. Chretien, Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, 1999. 848(1-2): p. 45-62.
132. Seidah, N.G., et al., The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(3): p. 928-33.
133. Piper, D.E., et al., The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure*, 2007. 15(5): p. 545-52.

134. Cunningham, D., et al., Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. 14(5): p. 413-9.
135. Henrich, S., et al., Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol*, 2005. 345(2): p. 211-27.
136. Jain, S.C., et al., The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, 1998. 284(1): p. 137-44.
137. Zhao, Z., et al., Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(3): p. 514-23.
138. Rovere, C., et al., The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *J Biol Chem*, 1999. 274(18): p. 12461-7.
139. Hampton, E.N., et al., The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(37): p. 14604-9.
140. Benjannet, S., et al., The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem*, 2006. 281(41): p. 30561-72.
141. Naureckiene, S., et al., Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 420(1): p. 55-67.
142. Lagace, T.A., et al., Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*, 2006. 116(11): p. 2995-3005.
143. Alborn, W.E., et al., Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem*, 2007. 53(10): p. 1814-9.
144. Mayne, J., et al., Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 361(2): p. 451-6.
145. Lambert, G., et al., Plasma PCSK9 Concentrations Correlate with LDL and Total Cholesterol in Diabetic Patients and Are Decreased by Fenofibrate Treatment. *Clin Chem*, 2008. 24: p. 24.

146. Grefhorst, A., et al., Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res*, 2008. 49(6): p. 1303-11.
147. Schmidt, R.J., et al., Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 370(4): p. 634-40.
148. Dewpura, T., et al., PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *Febs J*, 2008. 275(13): p. 3480-93.
149. Maxwell, K.N., et al., Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*, 2003. 44(11): p. 2109-19.
150. Horton, J.D., et al., Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(21): p. 12027-32.
151. Maxwell, K.N. and J.L. Breslow, Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(18): p. 7100-5.
152. Park, S.W., Y.A. Moon, and J.D. Horton, Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*, 2004. 279(48): p. 50630-8.
153. Lallanne, F., et al., Wild-type PCSK9 inhibits LDL clearance but does not affect apoB-containing lipoprotein production in mouse and cultured cells. *J Lipid Res*, 2005. 46(6): p. 1312-9.
154. Lambert, G., et al., Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology*, 2006. 147(10): p. 4985-95.
155. Rashid, S., et al., Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(15): p. 5374-9.
156. Zaid, A., et al., Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*, 2008. 48(2): p. 646-654.
157. Holla, O.L., et al., Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol*, 2007. 8(9): p. 9.

158. Qian, Y.W., et al., Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*, 2007. 48(7): p. 1488-98.
159. Zhang, D.W., et al., Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*, 2007. 282(25): p. 18602-12.
160. Shan, L., et al., PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 30: p. 30.
161. Peterson, A.S., L.G. Fong, and S.G. Young, PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res*, 2008. 49(7): p. 1595-9.
162. Kwon, H.J., et al., Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(6): p. 1820-5.
163. Fan, D., et al., Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*, 2008. 47(6): p. 1631-9.
164. Fisher, T.S., et al., Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem*, 2007. 282(28): p. 20502-12.
165. Maxwell, K.N., E.A. Fisher, and J.L. Breslow, Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(6): p. 2069-74.
166. Grozdanov, P.N., et al., Expression and localization of PCSK9 in rat hepatic cells. *Biochem Cell Biol*, 2006. 84(1): p. 80-92.
167. Nassoury, N., et al., The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic*, 2007. 8(6): p. 718-32.
168. Seidah, N.G., et al., The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(6-7): p. 1111-25.
169. Lambert, G., et al., Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis*, 2008. 20: p. 20.
170. Li, J., et al., Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J*, 2007. 406(2): p. 203-7.
171. McNutt, M.C., T.A. Lagace, and J.D. Horton, Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 2007. 282(29): p. 20799-803.

172. Maxwell, K.N. and J.L. Breslow, Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*, 2005. 16(2): p. 167-72.
173. Sun, X.M., et al., Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(9): p. 1161-9.
174. Ouguerram, K., et al., Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1448-53.
175. Twisk, J., et al., The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest*, 2000. 105(4): p. 521-32.
176. Poirier, S., et al., The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*, 2008. 283(4): p. 2363-72.
177. Dubuc, G., et al., Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1454-9.
178. Dubuc, G., et al. Statins and ezetimibe upregulate plasma PCSK9. in *European Atherosclerosis Society*. 2008. Istanbul, Turkey.
179. Gouni-Berthold, I., et al., Effects of ezetimibe and/or simvastatin on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase gene expression: a randomized trial in healthy men. *Atherosclerosis*, 2008. 198(1): p. 198-207.
180. Kourimate, S., et al., Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem*, 2008. 283(15): p. 9666-73.
181. Graham, M.J., et al., Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res*, 2007. 48(4): p. 763-7.
182. Crooke, S.T., Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, 2004. 55: p. 61-95.
183. Kastelein, J.J., et al., Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*, 2006. 114(16): p. 1729-35.

184. Frank-Kamenetsky, M., et al., Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 11: p. 11.
185. Lambert, G., M. Krempf, and P. Costet, PCSK9: a promising therapeutic target for dyslipidemias? *Trends Endocrinol Metab*, 2006. 17(3): p. 79-81.
186. Attie, A.D. and N.G. Seidah, Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab*, 2005. 1(5): p. 290-2.
187. Tremblay, E., et al., Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem*, 2006. 99(4): p. 1175-86.
188. McBurney, M.W., P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 1993. 37(1): p. 135-40.
189. Scopsi, L., et al., Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(1): p. 294-301.
190. Poirier, S., et al., Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem*, 2006. 98(3): p. 838-50.
191. Chiang, L.W., et al., An orchestrated gene expression component of neuronal programmed cell death revealed by cDNA array analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(5): p. 2814-9.
192. Bingham, B., et al., Proapoptotic effects of NARC 1 (= PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase. *Cytometry A*, 2006. 69(11): p. 1123-31.
193. Schatzkin, A., et al., Serum cholesterol and cancer in the NHANES I epidemiologic followup study. National Health and Nutrition Examination Survey. *Lancet*, 1987. 2(8554): p. 298-301.
194. Jacobs, D., et al., Report of the Conference on Low Blood Cholesterol: Mortality Associations. *Circulation*, 1992. 86(3): p. 1046-60.
195. Knekt, P., et al., Serum cholesterol and risk of cancer in a cohort of 39,000 men and women. *J Clin Epidemiol*, 1988. 41(6): p. 519-30.
196. Folsom, A.R., J.M. Peacock, and E. Boerwinkle, Sequence variation in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease gene, low LDL cholesterol, and cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(11): p. 2455-8.

197. Mbikay, M., et al., Of PCSK9, cholesterol homeostasis and parasitic infections: possible survival benefits of loss-of-function PCSK9 genetic polymorphisms. *Med Hypotheses*, 2007. 69(5): p. 1010-7.
198. Costet, P., M. Krempf, and B. Cariou, PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*, 2008. 29: p. 29.
199. Endo, A., The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*, 1992. 33(11): p. 1569-82.
200. Endo, A., M. Kuroda, and K. Tanzawa, Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*, 1976. 72(2): p. 323-6.
201. Law, M.R., N.J. Wald, and A.R. Rudnicka, Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2003. 326(7404): p. 1423.
202. Baigent, C., et al., Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 2005. 366(9493): p. 1267-78.
203. Jeong, H.J., et al., Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res*, 2008. 49(2): p. 399-409.
204. Careskey, H.E., et al., Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res*, 2008. 49(2): p. 394-8.
205. Garcia-Calvo, M., et al., The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(23): p. 8132-7.
206. Costet, P., et al., Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*, 2006. 281(10): p. 6211-8.
207. Schmidt, R.J., et al., A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity. *J Lipid Res*, 2006. 47(5): p. 1037-44.
208. Zandbergen, F. and J. Plutzky, PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): p. 972-82.
209. Bouhlel, M.A., B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi, Peroxisome proliferator-activated receptors--from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease. *J Intern Med*, 2008. 263(1): p. 28-42.

210. Frick, M.H., et al., 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*, 1987. 317(20): p. 1237-45.
211. Cannon, C.P., Combination therapy in the management of mixed dyslipidaemia. *J Intern Med*, 2008. 263(4): p. 353-65.
212. Grundy, S.M., et al., Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). *Am J Cardiol*, 2005. 95(4): p. 462-8.
213. Keech, A., et al., Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*, 2005. 366(9500): p. 1849-61.
214. Derosa, G., et al., Comparison of fluvastatin + fenofibrate combination therapy and fluvastatin monotherapy in the treatment of combined hyperlipidemia, type 2 diabetes mellitus, and coronary heart disease: a 12-month, randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Ther*, 2004. 26(10): p. 1599-607.
215. Colhoun, H., After FIELD: should fibrates be used to prevent cardiovascular disease in diabetes? *Lancet*, 2005. 366(9500): p. 1829-31.
216. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, Squalene synthase inhibitors : clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. *Drugs*, 2007. 67(1): p. 11-6.
217. Sharma, A., et al., Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new squalene synthase inhibitor, BMS-188494, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 1998. 38(12): p. 1116-21.
218. Ness, G.C., Z. Zhao, and D. Lopez, Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation. *Arch Biochem Biophys*, 1996. 325(2): p. 242-8.
219. Ness, G.C., Z. Zhao, and R.K. Keller, Effect of squalene synthase inhibition on the expression of hepatic cholesterol biosynthetic enzymes, LDL receptor, and cholesterol 7 alpha hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 311(2): p. 277-85.
220. Bedi, M., M. Niesen, and D. Lopez, Inhibition of squalene synthase upregulates PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 470(2): p. 116-9.
221. Cicero, A.F., L.C. Rovati, and I. Setnikar, Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural

- cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation. *Arzneimittelforschung*, 2007. 57(1): p. 26-30.
222. Kong, W., et al., Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*, 2004. 10(12): p. 1344-51.
 223. Abidi, P., et al., Extracellular signal-regulated kinase-dependent stabilization of hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA by herbal medicine berberine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(10): p. 2170-6.
 224. Lee, S., et al., Berberine-induced LDLR up-regulation involves JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 362(4): p. 853-7.
 225. Lee, Y.S., et al., Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes*, 2006. 55(8): p. 2256-64.
 226. Burns, K.A. and J.P. Vanden Heuvel, Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): p. 952-60.
 227. Bronner, M., R. Hertz, and J. Bar-Tana, Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *Biochem J*, 2004. 384(Pt 2): p. 295-305.
 228. Cameron, J., et al., Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis*, 2008. 15: p. 15.
 229. Nilsson, L.M., et al., Bile acids and lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on human hepatic mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 357(3): p. 707-11.
 230. Langhi, C., et al., Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett*, 2008. 582(6): p. 949-955.
 231. Niesen, M., M. Bedi, and D. Lopez, Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 470(2): p. 111-5.
 232. Khovidhunkit, W., et al., Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*, 2004. 45(7): p. 1169-96.
 233. Feingold, K.R., et al., Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 15: p. 15.
 234. Grenier, E., et al., Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and

- apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(6): p. G1178-89.
235. Levy, E., et al., Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 16470-7.
236. Field, F.J., et al., Regulation of gene expression and synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res*, 1991. 32(11): p. 1811-21.
237. Levy, E., et al., Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 2): p. 327-37.
238. Montoudis, A., et al., Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. *J Lipid Res*, 2008. 49(5): p. 961-72.
239. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 1977. 59(1): p. 221-6.
240. Field, F.J., et al., Regulation of sterol regulatory element-binding proteins by cholesterol flux in CaCo-2 cells. *J Lipid Res*, 2001. 42(10): p. 1687-98.
241. Field, F.J., et al., Regulation of LDL receptor expression by luminal sterol flux in CaCo-2 cells. *Arterioscler Thromb*, 1993. 13(5): p. 729-37.
242. Levy, E., M. Mehran, and E. Seidman, Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Faseb J*, 1995. 9(8): p. 626-35.
243. Beaulieu, J.F. and A. Quaroni, Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J*, 1991. 280 (Pt 3)(Pt 3): p. 599-608.
244. Ravid, Z., et al., Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. 295(5): p. G873-85.
245. Javitt, N.B., Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 292(5): p. 1147-53.
246. Adams, C.M., et al., Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem*, 2004. 279(50): p. 52772-80.

247. Srivastava, R.A., et al., Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 and Caco2 cells by palmitate, oleate, and 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res*, 1995. 36(7): p. 1434-46.
248. Alrefai, W.A., et al., Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 292(1): p. G369-76.
249. Rodal, S.K., et al., Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(4): p. 961-74.
250. Hansen, G.H., et al., Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J Biol Chem*, 2001. 276(34): p. 32338-44.
251. Hansen, G.H., et al., Cholesterol depletion of enterocytes. Effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J Biol Chem*, 2000. 275(7): p. 5136-42.
252. Ilangumaran, S. and D.C. Hoessli, Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J*, 1998. 335 (Pt 2)(Pt 2): p. 433-40.
253. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997. 89(3): p. 331-40.
254. Zollner, G., et al., Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm*, 2006. 3(3): p. 231-51.

